

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“Efecto de la suplementación con L-arginina y L-serina
sobre el perfil de citocinas de los neonatos nacidos por parto
vaginal y cesárea”

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO

DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Lic. en C. Ingrid Yaritzit Carreón Cortés

Director de Tesis: Dr. Otoniel Rodríguez Jorge (CIDC, UAEM)

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2026

COMITÉ EVALUADOR DE SEGUIMIENTO TUTORAL

Director de tesis: Dr. Otoniel Rodríguez Jorge (CIDC, UAEM).

Sinodal: Dra. Delia Vanessa López Guerrero (Facultad de Nutrición, UAEM).

Sinodal: Dr. Ismael Mancilla Herrera (INPER).

JURADO REVISOR DE TESIS

Presidente: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama (Facultad de Medicina, UAEM).

Secretario: Dra. Gabriela Rosas Salgado (Facultad de Medicina, UAEM).

Vocal: Dra. Leonor Pérez Martínez (Instituto de Biotecnología, UNAM).

Suplente: Dra. Delia Vanessa López Guerrero (Facultad de Nutrición, UAEM).

Suplente: Dra. Linda Aimara Kempis Calanis (Centro de Investigación en Dinámica Celular,
UAEM).

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Gracias a mi madre y a mi padre; podré concluir esta tesis, pero jamás terminar de escribir lo agradecida que estoy con Dios de ser su hija. A ambos mucho, mucho por siempre.

Gracias a mi hermana y a mi hermano; ser la de en medio siempre me dio soporte a cada lado. A ambos mucho, mucho por siempre.

Gracias a la Dra. María Angélica Santana; a través de sus clases y su laboratorio de Inmunología Celular y de Sistemas, descubrí que quiero ser *inmunóloga*. Por tanta comprensión y cariño.

Gracias al Dr. Otoniel Rodríguez Jorge, mi asesor de tesis de maestría; su manera única de interpretar resultados me enseñó a apreciar que lo valioso, muchas veces, está en los pequeños detalles, tanto en la investigación como en las personas. Me siento totalmente orgullosa de él.

Gracias a Carlos Ventura Martínez; desde que nos hicimos amigos, nunca más me sentí sola.

Gracias a mis amigas Joseline Gutiérrez, Karla Martínez, Alejandra Cedillo, Lizbeth Hernández, Fernanda Mata, Mariel Castañeda, Mariel Rossano y Carolina Bautista, porque este recorrido por la maestría también se trató mucho de la amistad.

Gracias a mi familia de laboratorio: mi corazón es como la puerta del refrigerador del laboratorio, donde están las sonrisas de cada uno de ustedes.

Gracias a mis mejores amigas Isabel Eugenio y Karen Martínez, del Museo de Ciencias de Morelos, por demostrarme que el presente es un lugar seguro. Por enseñarme a detenerme, a sentir y a vivir cada momento, recordándome que la felicidad está en las pequeñas cosas compartidas día a día.

Muchas gracias a Dios y a la vida, soy muy afortunada.

AGRADECIMIENTOS DE PROYECTO

Gracias a la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI); por haberme otorgado la beca de maestría 1257943.

Gracias a las autoridades y personal de Servicios de Salud de Morelos, de las unidades: Hospital General de Dr. José G. Parres, Mor y Hospital General de Temixco.

Gracias a las madres y bebés que permitieron la captura de las muestras.

Gracias al Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas.

Gracias al Centro de Investigación en Dinámica Celular.

RESUMEN

En las diferentes etapas que comprenden el desarrollo temprano, el sistema inmunológico es regulado para mantener una transición y adaptación adecuada de un entorno intrauterino casi estéril a uno entorno extrauterino rico en antígenos. La regulación del sistema inmune es sensible a los cambios que puedan presentarse al nacer, tales como el modo de parto, la edad gestacional, el inicio de la lactancia materna, la colonización microbiana inicial, la exposición a antibióticos, entre otros factores ^[1]. El nacimiento por cesárea es una intervención quirúrgica que pone a salvo la salud de la madre y la del bebé, cuando es necesaria ^[2]. Sin embargo, el nacimiento por cesárea no reproduce el conjunto de señales celulares que se generan de manera secuencial durante el parto vaginal y que participan en la modulación de la respuesta inmune neonatal ^[3]. En nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que las células T CD4⁺ neonatales presentan una menor facilidad de activación, una producción reducida de citocinas efectoras y, al mismo tiempo, una expansión clonal activa ^[4]. Adicionalmente, sin todavía recibir señales de activación, el metabolismo de estas células se encuentra sostenido principalmente por la glucólisis anaeróbica, evidenciado por la sobreexpresión de genes que codifican a las enzimas hexoquinasas (1 y 2) y a la lactato deshidrogenasa A (LDHA), las cuales participan en esta vía anaeróbica ^[5]. No obstante, estas características no son homogéneas entre los neonatos, sino que varían según el modo de nacimiento. En particular, las células T CD4⁺ provenientes de neonatos nacidos por cesárea exhiben una producción de citocinas más baja y funcionalmente menos competente en comparación con aquellas derivadas de neonatos nacidos por parto vaginal, las cuales parecen encontrarse más preparadas para desarrollar respuestas efectoras mejor definidas ^[4].

Considerando que la funcionalidad de las células T CD4⁺ depende de una reprogramación metabólica que involucra procesos de transporte, detección y señalización de nutrientes, la disponibilidad de L-arginina y L-serina está vinculada directamente a su respuesta. La L-arginina interviene en la producción de óxido nítrico, poliaminas y en el metabolismo energético, mientras que la L-serina contribuye al metabolismo de un carbono, la síntesis de nucleótidos, la regulación redox y el soporte bioenergético celular ^[6] ^[7]. La L-arginina es un aminoácido no esencial en condiciones normales; sin embargo, durante el embarazo y el desarrollo neonatal se vuelve condicionalmente esencial debido al aumento de los requerimientos metabólicos ^[8]. De manera similar, la L-serina incrementa sus niveles durante la lactancia materna, mientras que la mayoría de los aminoácidos permanecen estables, lo que sugiere su relevancia en el periodo neonatal ^[9]. El periodo neonatal es la etapa más vulnerable de la vida humana, representando aproximadamente el 2.3 millones de defunciones al año, equivalente a cerca del 48% de la mortalidad en niños menores de cinco años. Se estima que alrededor del 24% de estas defunciones están asociadas con infecciones ^[10].

En este contexto, y considerando que, en México, para el año 2020, los nacimientos por cesárea (508,402) superaron a los de parto vaginal (498,748) ^[11], resulta de gran importancia comprender cómo el modo de nacimiento impacta la regulación inmunológica temprana.

El presente panorama nos llevó a evaluar estrategias de modulación del sistema inmune neonatal mediante la suplementación con L-arginina y L-serina en concentraciones superiores a las del medio de cultivo. Se analizaron perfiles funcionales de citocinas efectoras, citocinas innatas y moléculas citotóxicas producidas por células T CD4⁺ de neonatos nacidos por vía vaginal y cesárea, tras estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. Interesantemente, bajo condiciones de exceso de L-arginina, la activación y producción de citocinas de la mayoría de los perfiles, con excepción del Th1, disminuyeron en comparación con el control y con la suplementación con L-serina. En conjunto, estos resultados sugieren que, a altas concentraciones, la L-arginina podría ejercer un efecto supresor sobre las células T CD4⁺, posiblemente asociado a una reprogramación del metabolismo celular.

INDICE GENERAL

1. Introducción	8
1.1 Sistema inmunitario	8
1.2 Sistema inmune innato	9
1.3 Sistema inmune adaptativo	12
1.4 Maduración de linfocitos T	13
1.5 Linfocitos T CD4 ⁺ o Linfocitos T CD8 ⁺	14
1.6 Activación de linfocitos T	15
1.7 Metabolismo de linfocitos T	17
1.8 Microambiente de citocinas	19
1.9 Inmunidad neonatal	22
1.10 Inmunidad de neonatos nacidos por cesárea	24
1.11 Los aminoácidos	27
1.12 Absorción de los aminoácidos	29
1.13 Metabolismo de los aminoácidos	30
1.14 Inmunonutrientes	31
1.15 L-arginina y L-serina como inmunonutrientes	34
1.15.1 L-arginina	34
1.15.2 L-serina	38
2. Antecedentes	41
3. Planteamiento del problema	46
4. Justificación	48
5. Objetivos	50
6. Hipótesis	50
7. Metodología	51
7.1 Obtención de muestra de sangre de cordón	51
7.2 Purificación de células mononucleadas	52
7.3 Purificación de linfocitos T CD4 ⁺	52
7.4 Ensayo de estimulación a través de CD3/CD28	53
7.5 Tinción multiparamétrica de marcadores extracelulares	53
7.6 Cuantificación de citocinas	54
7.7 Evaluación de la activación por citometría de flujo	55
8. Resultados	56
9. Discusión de resultados	87
10. Conclusión	92

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema inmunitario

El sistema inmunitario se conforma por un amplio grupo de moléculas, células, tejidos y órganos con funciones especializadas que, en conjunto, interaccionan entre sí para integrar una respuesta inmunitaria. Su función principal es mantener el equilibrio del huésped al establecer mecanismos de defensa frente a patógenos invasores, así como contra células infectadas, neoplásicas o dañadas. No obstante, estas no son las únicas dianas capaces de inducir una respuesta inmunitaria, ya que, en ocasiones, elementos extraños no dañinos también pueden activar las funciones inmunológicas ⁽¹⁾.

El sistema inmunitario también es multidisciplinario, mantiene una estrecha comunicación y actividad con otros sistemas del organismo, incluyendo el nervioso, digestivo, endocrino y cardiovascular. Aunado a esto, sus funciones son requeridas en procesos fisiológicos como el desarrollo, la reproducción, el embarazo, la cicatrización de heridas, entre otros ⁽¹⁾.

El sistema inmunitario puede organizar la respuesta inmunitaria en dos partes: a partir del sistema inmunitario innato o del sistema inmunitario adaptativo, que presentan una distinta velocidad y especificidad en sus respuestas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, ambos sistemas actúan de forma coordinada ⁽¹⁾.

En términos generales, tanto las células del sistema innato como las células del sistema adaptativo están equipadas con una variedad de receptores de reconocimiento que, al activarse, inducen la expresión de genes relacionados con la amplificación y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria, sostenida por procesos moleculares y metabólicos ⁽¹⁾.

1.2 Sistema inmune innato

A diferencia del sistema adaptativo, el sistema innato opera de forma constante, incluso en ausencia de señales de alarma. Cualquier elemento ajeno que se acerque o ingrese al huésped es detectado y evaluado por este sistema, que constituye la primera línea de defensa y determina si puede atravesarla ⁽²⁾.

Las barreras físicas y químicas, como los epitelios y las mucosas, cubren amplios perímetros, tanto externos como internos, formando parte de esta defensa inicial y dificultando la penetración de los microorganismos patógenos. Adicionalmente, la producción de sustancias antimicrobianas por las células epiteliales también contribuye a impedir su ingreso ⁽²⁾.

El sistema inmune innato dispone de diversos mecanismos de protección, entre los cuales destaca la fagocitosis, proceso mediante el cual se engullen y digieren elementos de más de 0,5 μm de diámetro. Este mecanismo es activado principalmente por neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, conocidos como fagocitos profesionales, que actúan sobre microorganismos, sustancias extrañas y células apoptóticas. Para desempeñar esta función, dichas células requieren señales de citocinas y quimiocinas, aunque también son capaces de producirlas. Dichas moléculas promueven la quimiotaxis y la adhesión celular, facilitando el reclutamiento de los fagocitos hacia el sitio de infección ⁽²⁾.

Las citocinas, en su mayoría proteínas solubles de bajo peso molecular, son designadas las moléculas de comunicación del sistema inmunológico. Se clasifican en factores de crecimiento, interleucinas, interferones, quimiocinas y monocinas ⁽³⁾. A través de estas, las células inmunitarias regulan y estimulan procesos esenciales como la activación, diferenciación, proliferación o muerte celular ⁽³⁾.

Además de su función defensiva, la fagocitosis posibilita la presentación de antígenos y la depuración de restos celulares en el huésped ⁽⁴⁾.

Los neutrófilos y macrófagos, por otra parte, pueden activar otros mecanismos dependiendo de las condiciones del entorno. Un ejemplo es el estallido respiratorio, que genera especies reactivas de oxígeno mediante la conversión de oxígeno molecular en superóxido, reacción catalizada por el macrocomplejo enzimático NADPH oxidasa ⁽⁵⁾.

En el caso de los neutrófilos, estos también pueden liberar trampas extracelulares (NETs) compuestas por redes de su propio material genético para inmovilizar y neutralizar patógenos ⁽⁶⁾.

Otro grupo celular que integra el sistema innato son las células granulocíticas: eosinófilos, basófilos, mastocitos y, nuevamente, neutrófilos, que son capaces de liberar mediadores inflamatorios almacenados en gránulos como parte de su estrategia defensiva. Esta liberación ocurre ya sea mediante desgranulación fragmentada, en la que los mediadores son liberados a través de vesículas, o por ruptura de la membrana celular ⁽⁷⁾.

Además, el sistema inmune innato cuenta con sus propias células citotóxicas, denominadas células natural killer (NK). A diferencia de las células T CD8⁺ citotóxicas del sistema adaptativo, las NK carecen del complejo CD3 y del receptor de células T (TCR), lo que les permite atacar sin requerir el reconocimiento de un antígeno específico. A pesar de esta diferencia, ambas comparten la capacidad de destruir células tumorales y células infectadas por virus en etapas tempranas de la infección ^{(8) (9)}.

Por último, dentro del repertorio celular del sistema innato, las células dendríticas destacan por ser las principales responsables en iniciar una respuesta más robusta, al inducir la activación de linfocitos T y B del sistema adaptativo mediante la presentación de antígenos. Para ello, capturan e internalizan elementos ajenos, los procesan y luego aumentan la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que exhiben los péptidos derivados. Posteriormente, migran hacia los ganglios linfáticos, donde establecen contacto con los linfocitos T, ya sea cooperadores (Th) o citotóxicos (Tc), favoreciendo así el reconocimiento específico del antígeno ^{(10) (11)}.

El sistema inmune innato tiene la capacidad de distinguir entre moléculas propias y ajenas, reconociendo firmas moleculares y cambios en la expresión de moléculas en la superficie celular. Una de sus estrategias más importantes es la vigilancia de las moléculas del MHC de clase I, expresadas de manera casi universal en células somáticas. En condiciones normales, su presencia actúa como una señal inhibidora para células como las NK, evitando su activación. En cambio, la pérdida o alteración de su expresión constituye una señal de alarma que permite a las NK reconocer y eliminar células infectadas o transformadas ⁽¹²⁾.

Los patógenos expresan ligandos moleculares conservados, clasificados como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores, codificados en la línea germinal y preservados a lo largo de la evolución, permiten al sistema innato reconocer lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, exclusivos de los patógenos y ausentes en el huésped. A diferencia del sistema adaptativo, el sistema innato no genera memoria inmunológica frente a estos componentes ⁽¹³⁾ ⁽¹⁴⁾. El reconocimiento de los PAMP por los PRR activa rápidamente una cascada de respuestas antimicrobianas, incluyendo la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas e interferones tipo I. Estas señales contribuyen al inicio del desarrollo de la defensa adaptativa ⁽¹³⁾ ⁽¹⁴⁾.

Aunque el sistema innato cuenta con una amplia gama de componentes y mecanismos celulares que le posibilitan desencadenar una respuesta de manera inmediata o en las primeras horas, la diversidad de patrones moleculares que reconoce es limitada y, en consecuencia, la respuesta también lo es. No obstante, la defensa innata cumple la función de coordinar la llegada del sistema adaptativo y actúa como precursora de este último, induciendo, entre otros factores, una respuesta más robusta ⁽¹⁵⁾.

1.3 Sistema inmune adaptativo

A diferencia del sistema innato, el sistema adaptativo se moviliza solo cuando es indispensable intensificar y especializar la respuesta inmunitaria, actuando como un refuerzo capaz de generar defensas más específicas, potentes y duraderas, a través de su capacidad de recordar el encuentro con patógenos específicos. A este fenómeno se le conoce como memoria inmunológica ⁽¹⁶⁾.

Las células que reorganizan esta respuesta inmunitaria más específica son los linfocitos B y los linfocitos T.

Los linfocitos B son los principales mediadores de la respuesta inmunitaria humoral. De manera general, a través del receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés), reconocen directamente antígenos de diversa naturaleza, como proteínas, lípidos y carbohidratos. Tras su activación, estos linfocitos se diferencian en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, también conocidas como anticuerpos, las cuales permiten una respuesta más rápida y eficiente frente a un antígeno previamente encontrado, conocida como respuesta inmunitaria secundaria ⁽¹⁷⁾.

Por su parte, los linfocitos T controlan la respuesta inmunitaria celular mediante la detección y eliminación de células infectadas o dañadas, además de participar en la coordinación y regulación de otras respuestas inmunes. A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T no reconocen antígenos en forma libre, sino fragmentos peptídicos específicos derivados de elementos ajenos que son presentados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por células presentadoras de antígeno. Este proceso de activación está finamente regulado y, de manera general, conduce a la diferenciación de los linfocitos T en subpoblaciones funcionales, principalmente linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y linfocitos T CD4⁺ auxiliares ⁽¹⁸⁾.

1.4 Maduración de linfocitos T

Los linfocitos T, al igual que otras del sistema inmunitario, se originan a partir de una célula madre hematopoyética multipotencial, específicamente del precursor linfoide común y sus derivados. Sin embargo, los linfocitos T siguen un camino único: migran hacia el timo para completar su maduración antes de incorporarse a la circulación periférica ⁽¹⁹⁾.

Inicialmente, los timocitos doble negativos (DN) corresponden a linfocitos T inmaduros que se caracterizan por la ausencia de los correceptores CD4 y CD8 en su superficie. Durante esta etapa, se expanden en número cuando reciben señales de IL-7. Posteriormente, tras una serie de reordenamientos en los genes del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) y el ensamblaje del complejo TCR, estas células pueden sufrir apoptosis si el reordenamiento es defectuoso, o bien diferenciarse en timocitos doble positivos (DP), que expresan simultáneamente CD4, CD8 y un TCR funcional ⁽²⁰⁾.

El proceso de selección positiva es la siguiente etapa que enfrentan los timocitos dobles positivos, en la cual el tiempo y la afinidad de interacción con las moléculas MHC que presentan antígenos determinan su supervivencia o apoptosis. En este proceso, existen dos escenarios que conducen a la muerte celular: la incapacidad de reconocer el MHC o una unión excesivamente fuerte del TCR con el MHC presentador de antígenos, lo cual indica reconocimiento de autoantígenos y corresponde a la selección negativa. Por el contrario, una afinidad moderada permite que las células dobles positivas sobrevivan a este proceso y se diferencien en células T CD4⁺ o CD8⁺ individuales, un compromiso de linaje que depende también de su reconocimiento de moléculas MHC de clase II o clase I, respectivamente, así como de la actividad de los factores de transcripción ThPOK y RUNX3, considerados reguladores principales de este compromiso. La expresión de ThPOK en células positivas simples que reconocen MHC de clase II es esencial para su diferenciación hacia el linaje auxiliar CD4⁺, o grupo de linfocitos T auxiliares (Th). De manera similar, la activación de RUNX3 en los timocitos que interactúan con MHC de clase I promueve su diferenciación hacia un linaje citotóxico CD8⁺, o linfocitos T citotóxicos (CTL) ⁽²¹⁾.

El receptor de células T, tras el reconocimiento específico del antígeno, desencadena una serie de eventos de transducción de señales hacia el interior de la célula. Este receptor, localizado en la membrana plasmática, está conformado generalmente por un heterodímero de dos cadenas polipeptídicas transmembranas denominadas α y β , unidas covalentemente mediante puentes disulfuro. Las porciones extracelulares de ambas cadenas contienen un dominio variable (V) en la región N-terminal y una región constante (C). Las regiones V de estas cadenas exhiben secuencias altamente variables entre los diferentes clones de linfocitos T, siendo partes involucradas directamente con el reconocimiento específico del antígeno ⁽²²⁾.

En contraste, las regiones intracelulares de las cadenas α y β poseen cortas colas citoplasmáticas C-terminales, de entre 5 y 12 aminoácidos, que actúan como puntos de anclaje para proteínas asociadas al TCR y participan en la transducción de señales, funcionando como antenas satelitales. La activación del TCR requiere de la asociación con el complejo CD3, formado por los heterodímeros ϵ - γ y ϵ - δ , así como por el homodímero ζ - ζ . Las regiones citoplasmáticas de estas cadenas contienen motivos de activación basados en tirosina (ITAM), los cuales se fosforilan durante la activación del linfocito T, promoviendo la cascada de señalización intracelular ⁽²²⁾.

1.5 Linfocitos T CD4⁺ o Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T se activan en contacto con células presentadoras de antígenos, mediante un contacto celular durante el cual se establecen microclusters de activación y una unión más larga, conocida como sinapsis inmunológica. Durante la sinapsis inmunológica también participan los correceptores CD4 o CD8 que identifican un linaje específico. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos eliminan células infectadas por virus, transformadas o dañadas. Su acción efectora es rigurosa y puede llevarse a cabo mediante tres mecanismos principales: (1) la secreción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α ; (2) la interacción entre el ligando Fas (FasL) y su receptor Fas, que induce apoptosis; y (3) la liberación de gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas, donde la perforina forma poros en la membrana de la célula diana permitiendo la entrada

de las granzimas, las cuales inducen la muerte celular programada. Esta actividad es esencial para controlar la propagación de infecciones virales y prevenir la persistencia de reservorios intracelulares ⁽²³⁾.

Por otro lado, los linfocitos T cooperadores llevan a cabo distintas tareas para coordinar la respuesta inmune. Estas células actúan indirectamente en la eliminación de patógenos al modular la actividad de otras células inmunitarias, como macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y los propios CTL. Además, reorganizan a las células del sistema innato, mejorando tanto sus funciones defensivas como de reparación ⁽²⁴⁾.

Los linfocitos T CD4⁺ se dividen en múltiples subpoblaciones con funciones efectoras específicas, entre ellas Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T reguladoras (Treg) y T foliculares cooperadoras (Tfh). Cada subconjunto se caracteriza por la expresión diferencial de moléculas de superficie, la producción de un perfil particular de citocinas y la activación de factores de transcripción específicos, los cuales son regulados por las citocinas presentes en el microambiente durante la activación ⁽²⁴⁾.

1.6 Activación de linfocitos T

La activación de los linfocitos T inicia con el reconocimiento del antígeno por el receptor de células T y la integración de señales provenientes de receptores coestimuladores y los receptores de citocinas, que detectan un estado de alerta inmunológica. Este proceso finamente regulado culmina en la expansión clonal y la diferenciación de linfocitos T vírgenes en linfocitos T efectores y de memoria.

Cuando el receptor de células T reconoce el antígeno presentado por moléculas del MHC, esta interacción proteína-proteína específica debe mantenerse durante un tiempo mínimo (del orden de varios segundos) para desencadenar las cascadas de señalización intracelular dependientes del TCR.

No obstante, el reconocimiento del complejo péptido–MHC por el TCR y la expresión individual de cada correceptor (CD4 o CD8) no es suficiente por sí solo para completar el

proceso de activación; se requiere una segunda señal proporcionada por la asociación de receptores coestimuladores. Entre los más relevantes se encuentra CD28, presente en la membrana de los linfocitos T, cuyo ligando (B7.1 o B7.2) se expresa en las APC. La señalización a través de CD28 potencia la activación mediada por el TCR, actuando como un modulador que amplifica las vías de señalización intracelular. En ausencia de esta coestimulación, la activación parcial del TCR conduce a un estado de anergia, en el cual el linfocito T pierde la capacidad de responder a futuros estímulos antigénicos, incluso si estos son adecuados ⁽²⁵⁾.

Al mismo tiempo, el microambiente que rodea al linfocito T durante su activación refuerza su transición hacia un estado efector. Además de las citocinas (como la IL-2) consideradas la tercera señal de activación, intervienen factores de crecimiento y nutrientes que actúan de forma conjunta para impulsar la expansión clonal de los linfocitos T ⁽²⁶⁾.

Tras la activación del TCR y las señales coestimuladoras, la superficie de los linfocitos T cambia de forma muy dinámica. Entre los primeros cambios aparece CD69, un marcador de activación temprana. Esta proteína mantiene al linfocito dentro del ganglio linfático al bloquear el receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR1), que normalmente permite la salida hacia la circulación. Gracias a este mecanismo, los linfocitos T permanecen el tiempo necesario en el microambiente linfático para completar su activación, expandirse clonalmente y diferenciarse en linfocitos T efectores ⁽²⁷⁾.

A nivel intracelular, la activación del TCR y la coestimulación desencadenan una red de vías de señalización que culminan en la inducción de factores de transcripción esenciales, entre los cuales destacan NFAT, NF- κ B y AP-1. Estas proteínas regulan la expresión de genes involucrados en la proliferación y a la adquisición de funciones especializadas de los linfocitos T. Su activación depende, en parte, del aumento en la concentración intracelular de calcio (Ca^{2+}), el cual desempeña un papel directo en la activación de NFAT y más indirecto en la de NF- κ B y AP-1 ⁽²⁷⁾.

Finalmente, para sostener la expansión clonal y los cambios funcionales, el linfocito T activo también debe reprogramar su metabolismo. Esto implica un incremento temprano en la expresión de transportadores de nutrientes y enzimas involucradas en la glucólisis, con el fin de satisfacer las elevadas demandas energéticas y biosintéticas impuestas por el entorno de citocinas y señales locales ⁽²⁸⁾.

1.7 Metabolismo de linfocitos T

La activación de los linfocitos T desencadena una reprogramación metabólica que les permite satisfacer las elevadas demandas energéticas y biosintéticas asociadas con su expansión clonal, diferenciación y adquisición de funciones efectoras. Este proceso no solo es consecuencia de la activación celular, sino un regulador activo que determina el destino y la función de los linfocitos T en cada etapa de su vida: desde el estado ingenuo hasta su conversión en células efectoras, de memoria o anérgicas ⁽²⁹⁾.

En linfocitos T activados, uno de los cambios más característicos es el aumento en la glucólisis aeróbica, un fenómeno similar al efecto Warburg descrito en células tumorales. Aunque la fosforilación oxidativa (OXPHOS) es más eficiente para la generación de ATP, la glucólisis ofrece ventajas metabólicas: permite obtener energía de forma rápida, genera intermediarios carbonados esenciales para la síntesis de macromoléculas y contribuye al mantenimiento del equilibrio redox celular (NAD^+/NADH). Gran parte de la glucosa captada es convertida en lactato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), lo que regenera NADH y permite sostener un flujo glucolítico elevado. Además, intermediarios como la glucosa-6-fosfato y el 3-fosfoglicerato son derivados hacia otras rutas anabólicas como la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la síntesis de serina, proporcionando precursores para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos ^{(30) (31)}.

La entrada de glucosa en la célula está mediada principalmente por el transportador GLUT1, cuya expresión y localización en la membrana plasmática son reguladas por la señalización PI3K/Akt/mTOR activada por el TCR y la coestimulación CD28. Esta vía es esencial para sostener la activación metabólica, y su inhibición conduce a un estado de anergia funcional y metabólica ⁽³²⁾.

A la par, la glutaminólisis es otra vía clave en linfocitos T activados. La glutamina se convierte en glutamato y posteriormente en α -cetoglutarato (α -KG) mediante la acción de aminotransferasas, como la alanina aminotransferasa (ALT). Este metabolito ingresa al ciclo del TCA, donde sostiene la producción de citrato, NADH y FADH₂, necesarios para la OXPHOS. El citrato puede salir de la mitocondria y servir como fuente de acetil-CoA para lipogénesis, metabolismo del mevalonato y síntesis de colesterol.

Además, la glutaminólisis contribuye a la generación de NADPH y a la síntesis de glutatión, protegiendo a la célula del estrés oxidante. También provee residuos de carbono y nitrógeno indispensables para la síntesis de aminoácidos no esenciales, poliaminas y nucleótidos de ADN y ARN ⁽³³⁾.

El metabolismo de la glutamina no solo abastece de sustratos biosintéticos, sino que también participa en la regulación de la función inmunológica. Por ejemplo, niveles adecuados de α -KG modulan vías epigenéticas que influyen en la diferenciación de subpoblaciones T ⁽³³⁾.

De manera paralela, los aminoácidos específicos actúan como señales metabólicas que determinan la función de los linfocitos T. La arginina extracelular, por ejemplo, promueve un cambio hacia un metabolismo más oxidativo, favorece la biogénesis mitocondrial y estimula la generación de linfocitos T de memoria central, además de modular la producción de citocinas.

La depleción de arginina extracelular altera la glucólisis aeróbica y reduce la proliferación celular. Sin embargo, cuando hay suficiente citrulina disponible, los linfocitos T pueden sintetizar arginina de novo mediante la argininosuccinato sintetasa 1 (ASS1), compensando parcialmente su deficiencia.

Por otro lado, la serina es un aminoácido clave en la síntesis de nucleótidos, lípidos, glutatión y unidades de un carbono, conectando el metabolismo central con la proliferación celular. A través de la interacción con la enzima piruvato quinasa 2 (PKM2), la serina regula la glucólisis y facilita la adaptación metabólica de los linfocitos T en los primeros estadios de su activación ^{(33) (34)}.

La diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ se asocia con fenotipos metabólicos particulares. Los linfocitos Th1, Th2 y Th17 muestran una alta dependencia

de la glucólisis en comparación con los linfocitos T reguladores (Treg) y de memoria, que utilizan predominantemente OXPHOS y oxidación de ácidos grasos.

El subgrupo celular Th2 presentan la mayor actividad glucolítica, correlacionada con la sobreexpresión de GLUT1 y una baja tasa de oxidación lipídica. La diferenciación hacia la clase Th1 depende de la activación de Akt vía mTORC2, mientras que la clase Th2 depende de PKC ⁽³⁵⁾.

Por su parte, la subpoblación Th17 requiere activamente la síntesis de ácidos grasos, mientras que el grupo celular Th9 presenta incluso mayores tasas glucolíticas, apoyadas por la activación de mTORC1 y HIF-1 α ⁽³⁵⁾.

La regulación de estas rutas está fuertemente influenciada por factores de transcripción y sensores metabólicos. Entre ellos destaca el protooncogén Myc, que induce la expresión de genes asociados al metabolismo de la glucosa y la glutamina en las primeras horas posteriores a la activación. De igual manera, mTOR actúa como un nodo central que integra señales del microambiente, disponibilidad de nutrientes y citocinas, determinando la polarización y función efectora de los linfocitos T ⁽³⁶⁾.

En conjunto, la reprogramación metabólica es un componente esencial de la respuesta inmune adaptativa. No solo sostiene la expansión clonal y la biosíntesis de componentes celulares, sino que también define la capacidad funcional de cada subpoblación T.

1.8 Microambiente de citocinas

El entorno de citocinas funciona como una clase de “mapa de orientación” para los linfocitos T CD4⁺ recién activados, guiando su destino funcional. Este microambiente no solo influye en la inmunidad adaptativa, sino que también regula situaciones de la respuesta innata. Conforme reciben señales del antígeno y del entorno, los linfocitos T “deciden” en qué tipo de célula especializada se convertirán, qué moléculas expresarán, qué citocinas producirán y hacia qué tejidos dirigirán su respuesta ⁽³⁷⁾.

A partir de estas señales, se generan diversas subpoblaciones con funciones inmunológicas específicas. Las células Th1, por ejemplo, surgen principalmente en

presencia de IFN- γ e IL-12. Están especializadas en respuestas celulares contra patógenos intracelulares, como algunos virus y bacterias, a través de la producción de citocinas como IFN- γ y TNF- α , que activan macrófagos y potencian la inmunidad celular.

Las células Th2, en contraste, se desarrollan en ambientes ricos en IL-4 y coordinan respuestas humorales, promoviendo la activación de eosinófilos, mastocitos y la producción de anticuerpos por parte de las células B. Estas respuestas son esenciales para el control de infecciones por parásitos multicelulares, aunque también están implicadas en enfermedades alérgicas ⁽³⁸⁾.

Las células Th17, inducidas por IL-6, IL-1, IL-23 y TGF- β , actúan como una “brigada de emergencia” frente a bacterias y hongos extracelulares. Producen citocinas proinflamatorias como IL-17A, IL-17F, IL-22 y TNF- α , que reclutan neutrófilos y amplifican la respuesta inflamatoria local ⁽³⁸⁾ ⁽³⁹⁾.

Por su parte, las células Th22, aunque comparten con Th17 la producción de IL-22, no secretan IL-17 y desempeñan un papel más enfocado en la protección y reparación de las barreras epiteliales, especialmente en la piel ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁰⁾.

Las células Th9, definidas por la secreción de IL-9, participan en respuestas antiparasitarias y en procesos inflamatorios alérgicos, y han demostrado un importante potencial antitumoral al coordinar de manera eficiente distintas ramas de la inmunidad ⁽³⁸⁾ ⁽⁴¹⁾.

Los linfocitos T reguladores (Tregs) representan el “sistema de frenos” de la respuesta inmune. Se diferencian en presencia de TGF- β y producen citocinas inmunorreguladoras como IL-10, TGF- β e IL-35, esenciales para mantener la tolerancia inmunológica y evitar respuestas inflamatorias excesivas ⁽³⁸⁾ ⁽⁴¹⁾.

Adicionalmente, se han identificado células T CD4⁺ citotóxicas (CTL-CD4⁺), caracterizadas por la pérdida de CD28 y la expresión de perforina. Estas células tienden a expandirse en contextos de infecciones crónicas y combinan funciones efectoras y citotóxicas, contribuyendo a la eliminación de células infectadas ⁽⁴²⁾.

Cabe destacar que esta especialización no es rígida: los linfocitos T CD4⁺ muestran una notable plasticidad. Según la combinación de señales antigénicas, coestimuladoras y del entorno inflamatorio, pueden ajustar su programa de diferenciación funcional ⁽⁴³⁾.

Esta flexibilidad permite al sistema inmunológico activar sus respuestas frente a distintos tipos de amenazas, así como modular y adaptarse a diferentes etapas del desarrollo humano, incluida la etapa neonatal.

1.9 Inmunidad neonatal

El sistema inmune de los recién nacidos presenta características particulares y esenciales que generan respuestas inmunológicas distintas a las observadas en los adultos. En este contexto, su sistema inmune innato es el principal responsable de coordinar la mayoría de los mecanismos de defensa frente a agentes patógenos y no patógenos. Esto se debe a la capacidad disminuida en la presentación de antígenos, lo que interfiere con el desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas y de memoria, las cuales aún no están completamente desarrolladas debido al entorno estéril en el útero durante el crecimiento fetal. No obstante, los neonatos reciben protección de los anticuerpos maternos adquiridos a través de la placenta y el calostro. Sin embargo, esta protección es transitoria, decayendo alrededor de los 6 meses de edad ⁽⁴⁴⁾.

Las células T neonatales presentan perfiles de expresión y regulación, junto con un umbral alto de activación, exclusivos de la etapa temprana del desarrollo. Estas características favorecen tanto respuestas de tolerancia como respuestas efectoras de tipo Th2, mientras que las respuestas de tipo Th1 mediadas por células T CD4⁺ están disminuidas ⁽⁴⁵⁾. Estudios realizados en células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CBMCs) y en células T CD4⁺ purificadas han demostrado una mayor proporción de células con fenotipo regulador en este grupo, en comparación con la sangre periférica de adulto ⁽⁴⁶⁾.

Además, se ha identificado un mayor número de células de linaje eritroide caracterizadas por la expresión del correceptor CD71⁺, las cuales también exhiben actividad supresora. Sin embargo, este grupo celular únicamente es detectado en los primeros días después del nacimiento. Ambos tipos de células supresoras posibilitan la adaptación del entorno intrauterino estéril al ambiente externo, rico en antígenos, previniendo la generación de respuestas inmunes exacerbadas. Sin embargo, esta supresión de las respuestas efectoras aumenta la susceptibilidad del neonato a infecciones ⁽⁴⁷⁾.

Las respuestas Th2, definidas por la secreción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que controlan la invasión de helmintos, predominan en este periodo. Esta inclinación puede comprometer la capacidad de las células T para generar respuestas protectoras frente a

infecciones intracelulares y vacunas, al tiempo que se ha relacionado con un mayor riesgo de manifestaciones alérgicas durante etapas posteriores de la vida. Además, la baja capacidad de las células T neonatales para montar respuestas efectoras Th1 conduce a una defensa deficiente contra patógenos intracelulares como bacterias y virus en los recién nacidos ⁽⁴⁸⁾.

En el avance del conocimiento sobre el sistema inmune neonatal y en el esfuerzo por amplificar las funciones efectoras Th1, se ha logrado inducir respuestas de este fenotipo en condiciones específicas, principalmente a través de vacunas. Un ejemplo claro de esto es el caso de la vacuna bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y la vacuna de células enteras contra la tosferina (DPT), que demuestran que las vacunas que contienen agonistas de los receptores tipo Toll (TLR) pueden inducir una respuesta Th1 sustancial ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁵⁰⁾.

Curiosamente, estudios recientes realizados en sangre periférica de adultos han identificado fenotipos híbridos de células T CD4⁺ efectoras, lo que plantea la interrogante de si existen perfiles híbridos efectores también en células T neonatales, al menos en el subconjunto T CD4⁺ cooperador ⁽⁵¹⁾. Esto confirmaría cada vez más que las células T neonatales se pueden distinguir como poblaciones únicas con propiedades funcionales adaptadas a la etapa posnatal ⁽⁵²⁾.

Investigaciones muy interesantes sobre las células T neonatales, particularmente en el grupo celular T CD4⁺, han revelado diferencias transcriptómicas que destacan la sobreexpresión de genes asociados con el metabolismo, características del sistema innato y el ciclo celular. Adicionalmente, se ha comprobado que, ante la estimulación, las células T CD4⁺ neonatales presentan una tasa de proliferación significativamente mayor en comparación con las células T CD4⁺ purificadas de adultos ⁽⁵³⁾ ⁽⁵⁴⁾. Esta mayor capacidad proliferativa podría indicar que, durante la etapa neonatal, las células T parecen estar orientadas principalmente a una rápida expansión celular, priorizando respuestas inmediatas por sobre el establecimiento y mantenimiento de células de memoria ⁽⁵⁵⁾

Por otro lado, las células T CD8⁺ neonatales, su contraparte, no activan plenamente sus funciones citotóxicas y muestran una producción reducida de IFN- γ ⁽⁵⁶⁾. Curiosamente, exhiben fenotipos característicos de la respuesta inmune innata, incluyendo la expresión de genes involucrados con la producción de péptidos antimicrobianos, similares a los que

se encuentran en los neutrófilos. De este estudio, se logró reprogramar el perfil de transcripción innato de las células T CD8⁺ neonatales y restaurar la expresión de genes citotóxicos, así como de genes asociados con la señalización del receptor de células T (TCR), al inducir su activación en presencia de señales de IL-12, demostrando una mayor capacidad adaptativa bajo condiciones específicas ⁽⁵⁷⁾.

A pesar de que aquí se presentan importantes descubrimientos sobre la caracterización del sistema inmune neonatal, aún existen caminos inexplorados y otros que apenas comienzan a conocerse. Uno de estos es el efecto del tipo de nacimiento, es decir, la cesárea frente al parto vaginal, en la regulación del sistema inmune neonatal durante la transición de un espacio estéril a un ambiente rico en antígenos, y su implicación epigenética a largo plazo, asociada con morbilidades en etapas posteriores de la vida del recién nacido.

1.10 Inmunidad de neonatos nacidos por cesárea

El nacimiento marca un momento crítico en la regulación del sistema inmunológico, la adaptación desde el entorno intrauterino casi-estéril hacia uno extrauterino rico en antígenos es un desafío inmunológico considerable. Se ha planteado la hipótesis de que el nacimiento por vía vaginal proporciona señales de desarrollo importantes y permisivas, necesarias para establecer la maduración inmunológica y fisiológica, en preparación para la vida postnatal. Esto se debe a las diferencias en los mecanismos involucrados en el parto vaginal en comparación con la cesárea.

La duración del parto vaginal suele ser de entre 8 y 12 horas, periodo durante el cual el producto está sujeto a múltiples condiciones, como el estrés físico (por las fuerzas dinámicas), el estrés oxidativo (debido al ambiente hipóxico), niveles elevados de hormonas (como los estrógenos y el cortisol), la colonización microbiana (del canal vaginal y anal), entre otros. Por el contrario, el nacimiento por cesárea tiene una duración de 30 minutos a 1 hora, donde no se experimentan todos estos factores, lo que resulta en un sistema inmunológico alterado en el recién nacido. Esta desregulación del sistema

inmune ha sido asociada con una mayor predisposición a desarrollar afecciones alérgicas, metabólicas, respiratorias e inflamatorias tanto a corto plazo como a largo plazo ⁽⁵⁸⁾.

La ausencia de contracciones en el parto por cesárea, particularmente en los procedimientos programados, se correlaciona con una disminución de marcadores de estrés como la proteína de choque térmico (HSP70) en los tamices neonatales realizados. Esta reducción se ha observado al comparar con recién nacidos por vía vaginal e incluso con aquellos nacidos por cesárea tras labor de parto. La HSP70 es importante en diversos mecanismos celulares, incluidos la antiapoptosis y la citoprotección. Su expresión, inducible de manera intracelular, se activa en respuesta a distintos tipos de estrés, como variaciones de temperatura, infecciones virales y estrés oxidativo, siendo este último característico de la hipoxia transitoria que enfrentan los neonatos durante el parto vaginal. La similitud en los niveles de HSP70 entre partos vaginales y cesáreas con labor de parto sugiere que el impacto del estrés es comparable siempre que el proceso de parto haya iniciado, independientemente de si culmina en una cesárea ⁽⁵⁹⁾.

En este mismo estudio, en el que examinaron las diferencias en los biomarcadores de inflamación, estrés y factores de crecimiento, también se detectaron niveles incrementados del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en neonatos nacidos por cesárea, incluidos aquellos que experimentaron labor de parto parcial. Por un lado, el VEGF-A participa en la estimulación de la vasculogénesis y la angiogénesis, procesos que han sido relacionados con el desarrollo del asma. Por otro lado, el EGF actúa como un potente estimulador de la expresión de mucinas en las vías respiratorias, cuyas concentraciones elevadas se miden en pacientes graves de asma ⁽⁵⁹⁾.

Los neonatos nacidos por cesárea presentan un patrón microbiano intestinal significativamente diferente al de aquellos nacidos por vía vaginal. En ellos, la cantidad total de bacterias intestinales es menor durante el primer mes de vida, y esta diferencia persiste hasta los seis meses ⁽⁶⁰⁾. La colonización tardía de taxones beneficiosos como *Bifidobacterium* y el predominio de *Enterobacteriaceae* contribuyen al desarrollo de un microbiota intestinal alterada, lo que interfiere con el establecimiento de la anaerobiosis y, en consecuencia, impide la adecuada acidificación del medio intestinal ⁽⁶¹⁾.

Los análisis de muestras fecales de bebés nacidos por parto natural, realizados con un enfoque multiómico, han identificado vías microbianas favorecidas, reguladas por la producción de ácido indolilacético por parte de *Bifidobacterium*. Este metabolito actúa principalmente sobre el receptor de aril hidrocarburo (AhR) en las células inmunitarias intestinales, modulando las respuestas inmunes innatas implicadas en la homeostasis intestinal. Sin embargo, las muestras de neonatos nacidos por cesárea muestran niveles de ácido indolilacético bajos ⁽⁶¹⁾

El impacto del modo de nacimiento en la salud del bebé puede comprenderse, en gran medida, a través de la organización y el funcionamiento de su sistema inmunológico, lo que resalta la importancia de avanzar en la caracterización del sistema inmune neonatal.

La sangre del cordón umbilical de neonatos por cesárea contiene un recuento menor de leucocitos (neutrófilos, monocitos y células NK) en comparación con los nacidos por vía vaginal ⁽⁶²⁾. Además, se han comprobado diferencias significativas en los patrones de expresión génica, analizadas mediante secuenciación de RNA-Seq y RT-qPCR. En particular, las células mononucleares de sangre de cordón umbilical de neonatos de cesárea sobreexpresan genes relacionados a la inflamación, incluyendo genes que codifican mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), interleucina 1 beta (IL-1 β) y la cadena α de la interleucina 12 (IL-12A), en comparación con aquellos que nacieron por parto vaginal. De manera similar, a nivel proteico, las concentraciones de TNF- α e IFN- γ en el suero son más elevadas en los neonatos nacidos por cesárea. Este perfil inflamatorio podría ser importante para considerar como un posible indicador de predisposición a la diabetes mellitus tipo 1, un trastorno causado por una desregulación en la tolerancia inmunitaria. En este contexto, las células inmunoefectoras, mayoritariamente las células Th1 infiltradas en los islotes pancreáticos (insulitis), atacan las células β , secretando IL-12, IFN- γ y citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α , lo que lleva a la destrucción de las células β pancreáticas ⁽⁶³⁾.

En un trabajo del laboratorio, se ha se están estudiando las diferencias en la organización y respuesta del sistema inmune entre los linfocitos T de bebés nacidos por cesárea y aquellos nacidos por vía vaginal. En este estudio, se observó que las células T CD4⁺ provenientes de neonatos de cesárea, las cuales están encargadas de la coordinación

del sistema inmune adaptativo, presentan una mayor tasa de proliferación frente a las células T CD4⁺ de recién nacidos por parto natural. Este comportamiento, refleja una respuesta inmunitaria más activa, lo que podría interferir con la tolerancia inmunitaria, que es característica y necesaria en las primeras etapas de vida ^{(64) (65)}.

La presente información recaudada no tiene la intención de desacreditar, ni cuestionar la cesárea como un procedimiento esencial para salvaguardar la salud y seguridad tanto de la madre como del recién nacido, ni minimizar su contribución a la reducción de la mortalidad materna y neonatal. Más bien, estos hallazgos resaltan la necesidad de buscar formas de regular la respuesta del sistema inmune neonatal, con el propósito de atenuar las alteraciones inmunológicas asociadas con el nacimiento por cesárea.

1.11 Los aminoácidos

En el estudio de los aminoácidos (AA), su función habitualmente más reconocida es su capacidad para interaccionar entre sí y formar las proteínas. Sin embargo, sus funciones no se limitan a este proceso, sino que, paralelamente, son esenciales en otros procesos relevantes de los sistemas biológicos, ya que son precursores de muchas moléculas, incluyendo neurotransmisores, hormonas, vitaminas, purinas y pirimidinas, entre otras.

Desde el punto de vista estructural, los aminoácidos son moléculas orgánicas que contienen un grupo amino (NH₂) y un grupo carboxilo (COOH), ambos unidos a un carbono central (carbono α). Su diversidad estructural se debe a las variaciones presentes en el grupo R o cadena lateral. Asimismo, en la naturaleza se identifican otras clases de aminoácidos, como los β -aminoácidos, en los cuales los grupos amino y carboxilo se enlazan a carbonos distintos de la cadena principal ⁽⁶⁶⁾.

La mayoría de los α -aminoácidos, presentan cuatro sustituyentes diferentes en su carbono α , condición que les confiere quiralidad; la glicina constituye una excepción, dado que su grupo R es un átomo de hidrógeno, careciendo por ello de centro quiral ⁽⁶⁹⁾.

Durante la síntesis de proteínas, proceso dirigido por el ribosoma y otros componentes moleculares que actúan como una polimerasa de aminoácidos siguiendo las

instrucciones del ARN mensajero, los grupos amino y carboxilo de dos aminoácidos se condensan mediante una reacción química de deshidratación, liberando una molécula de agua y formando un enlace peptídico. Las cadenas de aminoácidos unidas por estos enlaces constituyen los polipéptidos ⁽⁶⁶⁾.

Las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral de cada aminoácido, tales como su carga, tamaño o hidrofobicidad, así como el orden o la secuencia en que se polimerizan, determinan la conformación tridimensional, las propiedades de interacción química generales y, en consecuencia, la funcionalidad de la proteína.

La amplia diversidad química y estructural permite que participen en la mayoría de las actividades celulares, incluyendo desde la formación de estructuras físicas que proporcionan soporte morfológico, hasta el desempeño de funciones como enzimas especializadas que catalizan reacciones químicas de forma específica y altamente regulada ⁽⁶⁶⁾.

Desde el punto de vista nutricional, los aminoácidos se clasifican en esenciales y no esenciales. Los primeros requieren un aporte dietético, dado que el organismo es incapaz de sintetizar sus esqueletos carbonados o no puede producirlos a una velocidad suficiente para satisfacer las demandas metabólicas. En consecuencia, su ingesta dietética es indispensable para alcanzar una tasa adecuada de producción proteica ⁽⁶⁷⁾.

Por otro lado, los aminoácidos no esenciales pueden ser sintetizados internamente por las células del organismo en condiciones normales. Sin embargo, esta clasificación no es absoluta, ya que ciertos aminoácidos pueden volverse condicionalmente esenciales durante períodos de crecimiento acelerado, estrés metabólico o enfermedad. Asimismo, se ha observado un ajuste dinámico en la concentración de aminoácidos libres en el músculo esquelético, la leche materna y los fluidos fetales, lo que refleja la plasticidad del organismo para adaptarse a distintas demandas fisiológicas ⁽⁶⁷⁾.

Finalmente, más allá de su participación en la síntesis proteica, los aminoácidos individuales actúan como metabolitos clave en rutas de señalización celular, en vías anapleróticas del metabolismo energético y en mecanismos de regulación epigenética, destacando su importancia integral en el mantenimiento de la homeostasis.

1.12 Absorción de los aminoácidos

La digestión de las proteínas dietéticas inicia en el estómago, donde la acción combinada del ácido clorhídrico y la pepsina descomponen las proteínas en polipéptidos. Posteriormente, en el intestino delgado, las proteasas pancreáticas y las peptidasas intestinales, que actúan de forma óptima a pH neutro, completan la digestión hasta liberar aminoácidos libres ⁽⁶⁸⁾.

Aunque tradicionalmente se ha considerado que los aminoácidos y algunos péptidos liberados en el lumen intestinal tras la digestión son transportados casi en su totalidad hacia la vena porta mediante proteínas de transporte conocidas como transportadores de soluto (SLC), que se localizan en el borde en cepillo (SLC1A1, SLC6A19, SLC7A1, SLC38A5, SLC36A1, SLC15A1) y en la membrana basolateral (SLC7, SLC16A10, SLC38A2) de los enterocitos ⁽⁶⁸⁾.

La evidencia más reciente sugiere que una proporción significativa de los aminoácidos dietéticos, en particular aquellos de cadena ramificada (BCAA), es parcialmente catabolizada en el propio intestino ⁽⁶⁸⁾.

En este contexto, ya se han identificado aminotransferasas de cadena ramificada (BCAT), enzimas responsables de iniciar la degradación de aminoácidos de cadena ramificada, como la leucina, valina e isoleucina, cuya actividad ha sido observada en el tejido intestinal. Además, se ha reportado que casi la totalidad del glutamato y del aspartato, así como alrededor del 30% y el 70% de los aminoácidos de cadena ramificada, junto con la glutamina, prolina, treonina, lisina, metionina y fenilalanina, son catabolizados en el intestino delgado de mamíferos, incluidos los humanos. Estos hallazgos resaltan el papel del intestino no solo como un órgano de absorción, sino también como un sitio metabólicamente activo de distintos blancos con cadena ramificada ⁽⁶⁸⁾.

Aunque se ha avanzado considerablemente en la caracterización de más de 60 transportadores de aminoácidos de la familia SLC, clasificados según la naturaleza de su sustrato (neutros, básicos o ácidos) y su dependencia o independencia del ion sodio

(Na⁺), persiste un esfuerzo continuo por entender con mayor detalle su especificidad de sustrato y los mecanismos que regulan su actividad.

1.13 Metabolismo de los aminoácidos

La homeostasis en la producción de proteínas funcionales y el mantenimiento de una tasa metabólica adecuada dependen del equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación proteica.

Ante un exceso de proteínas o en condiciones de ayuno, las células desencadenan distintas vías de señalización y procesos metabólicos que promueven la absorción y degradación de aminoácidos, ya que estos no pueden almacenarse, a diferencia de otros metabolitos activos. Estas vías catabólicas ocurren principalmente en el hígado, que actúa como el principal órgano responsable del metabolismo de la mayoría de los aminoácidos. No obstante, el músculo y el intestino son sitios de degradación para aquellos aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina ⁽⁶⁸⁾.

Cuando se utilizan como fuente de energía, los aminoácidos, por un lado, pierden primero sus grupos α -amino a través de mecanismos de transaminación y desaminación, lo que permite su eliminación en forma de urea. Esta serie de reacciones, que incluye la transferencia y remoción del grupo amino, regula la toxicidad del amonio circulante ⁽⁷¹⁾.

Por otro lado, los esqueletos carbonados resultantes se desvían hacia dos rutas principales: la conversión en glucosa mediante gluconeogénesis o su oxidación para la generación de ATP ⁽⁶⁹⁾.

La oxidación completa de los carbonos de los aminoácidos solo ocurre cuando estos se transforman en acetil-CoA, que es oxidado a CO₂ y H₂O a través del ciclo del ácido tricarboxílico y la cadena transportadora de electrones mitocondrial ⁽⁷⁰⁾.

En conjunto, aunque la oxidación de aminoácidos es menos eficiente para la producción de ATP que la de grasas o glucosa ⁽⁷¹⁾, el metabolismo de los aminoácidos va más allá de la producción energética. Aunque siguen rutas catabólicas particulares, estos

procesos convergen en la generación de metabolitos esenciales como CO₂, cuerpos cetónicos, urea, óxido nítrico (NO) y poliaminas. Dichos compuestos participan en distintos procesos fisiológicos: la regulación del pH sanguíneo mediante el sistema bicarbonato, el suministro energético a órganos como el cerebro, el músculo esquelético y el corazón en condiciones de escasez de glucosa, la respuesta inmune a través de la eliminación de patógenos intracelulares, y la regulación del crecimiento y la proliferación celular ⁽⁷²⁾.

Por último, las vías de degradación de aminoácidos están estrechamente vinculadas con los mecanismos epigenéticos, ya que proporcionan metabolitos con funciones reguladoras de la expresión génica. Aminoácidos como la metionina, la glicina, la histidina y la serina, actúan como donadores de grupos metilo, necesarios para los procesos de metilación del ADN y de proteínas. Además, el catabolismo de la arginina, la prolina, la histidina, el glutamato y la glutamina genera precursores de alfa-cetoglutarato (α -KG), un cetoácido con múltiples funciones. A nivel epigenético, el α -KG es utilizado como cofactor de enzimas responsables de las modificaciones en la cromatina, participando así en la regulación de la expresión génica ⁽⁷³⁾.

1.14 Inmunonutrientes

Recientemente, con el surgimiento de nuevas disciplinas en el campo de la inmunología, tales como la inmunonutrición y el inmunometabolismo, el estudio de los aminoácidos sobre su función en la regulación del sistema inmunitario ya es terreno conocido, pero todavía limitado. Se reconoce que la falta de proteínas o aminoácidos en la dieta compromete la función inmune y aumenta la susceptibilidad de animales y seres humanos a enfermedades infecciosas. No obstante, apenas estamos comenzado a esclarecer los mecanismos celulares y moleculares ⁽⁷⁴⁾.

Los aminoácidos, que forman parte de los denominados "inmunonutrientes", representan un término recientemente acuñado para describirlos como moléculas esenciales para el sistema inmune.

La respuesta funcional de cada célula inmunitaria está estrechamente influenciada por su microambiente y la disponibilidad de nutrientes. Tanto el sistema inmunitario innato como el adaptativo dependen de un aporte adecuado de aminoácidos para sintetizar moléculas como la histamina, el glutatión y el óxido nítrico, entre otras, pero especialmente para la activación de inmunoglobulinas y citocinas. Adicionalmente, las células inmunológicas, al igual que otros linajes celulares, necesitan recursos para sostener su metabolismo. En este contexto, el suministro de aminoácidos se vuelve indispensable para la generación de ATP, la síntesis de nucleótidos y el equilibrio redox ⁽⁷⁴⁾.

Particularmente, los linfocitos presentan demandas específicas de metabolitos, las cuales varían según su estado funcional: basal o activado. En el estado basal, los linfocitos vírgenes, aunque completamente desarrollados y en circulación, permanecen en reposo (fase G0 del ciclo celular), requieren pocos nutrientes y obtienen su energía principalmente mediante el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS), ya que aún no han recibido señales antigénicas de activación. Sin embargo, tras la transducción de las tres señales de activación clásicas, se desencadena una reprogramación metabólica inmediata ⁽⁷⁵⁾.

Esta reprogramación, que en muchos estudios se considera una cuarta señal, integra la disponibilidad de nutrientes a través de un proceso de tres niveles: transporte, detección y señalización metabólica, permitiendo a las células percibir y responder a los cambios en su microambiente ⁽⁴³⁾. Como resultado, las células T aumentan notablemente el consumo de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, y reorientan su metabolismo hacia una mayor actividad glucolítica y glutaminolítica, en un patrón similar al observado en células cancerosas, también conocido como efecto Warbug ⁽⁷⁵⁾.

En este nuevo programa metabólico, se establece una glucólisis anaeróbica en la cual el piruvato generado no se dirige al ciclo del ácido tricarboxílico como acetil-CoA, sino que es convertido en lactato. Esta conversión, catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), permite regenerar dos moléculas de NAD⁺ a partir del NADH producido durante la reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), asegurando así una mayor velocidad en el flujo glucolítico. Aunque este

proceso produce solo 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, mucho menos que la fosforilación oxidativa, permite una generación rápida de energía y proporciona precursores esenciales para la replicación del ADN, la síntesis de proteínas y de lípidos (76).

Para sostener el elevado consumo de glucosa requerido por los linfocitos T activados, se activan rutas de señalización paralelas, como la de la diana mecánica de la rapamicina (mTOR), una quinasa de serina/treonina altamente conservada, perteneciente a la familia de las quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Esta vía responde a la disponibilidad de nutrientes, principalmente de aminoácidos, y establece un circuito de retroalimentación positiva que promueve la reprogramación metabólica, coordinando el metabolismo celular con las condiciones del microambiente (76).

En mamíferos, mTOR proviene de un único gen, pero puede ensamblarse en dos complejos distintos: mTORC1 y mTORC2, cuyas funciones divergen en la regulación de procesos como el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular. Ambos complejos pueden activar, de forma directa o indirecta, a los factores transcripcionales Myc y HIF-1 α , los cuales inducen la expresión de genes implicados en el transporte de nutrientes y en rutas metabólicas específicas, como la captación de glucosa y la glucólisis, o la utilización de glutamina a través de la glutaminólisis. Este último proceso transforma la glutamina en glutamato y posteriormente en alfa-cetoglutarato (α -KG), un intermediario del ciclo del ácido tricarboxílico que alimenta las necesidades energéticas (77).

Por el contrario, cuando hay una deficiencia de nutrientes, se activan reguladores negativos que ajustan la actividad celular según la disponibilidad de aminoácidos. Uno de estos reguladores es la quinasa GCN2 (Control General No Reprimible 2), una de las cuatro quinasas sensores de estrés. En estas condiciones, GCN2 tiene como blanco principal a la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 (eIF2 α), cuya fosforilación inhibe el inicio de la traducción proteica lo que permite a la célula adaptarse al estrés nutricional reduciendo su actividad biosintética (78).

Del mismo modo que existen rutas específicas para detectar la presencia o ausencia de aminoácidos, también hay vías de señalización y funciones celulares que son reguladas

por aminoácidos concretos. Este es el caso de la L-arginina y la L-serina, dos aminoácidos cuya función como inmunonutrientes ha sido respaldada por diversos estudios ⁽⁷⁹⁾.

1.15 L-arginina y L-serina como inmunonutrientes

1.15.1 L-arginina

La L-arginina es un aminoácido clasificado como no esencial en humanos sanos; sin embargo, en determinadas condiciones fisiológicas como infecciones, traumatismos, embarazo o durante el desarrollo neonatal, es un aminoácido condicionalmente esencial debido al aumento en los requerimientos metabólicos o a una síntesis endógena insuficiente para satisfacer la demanda. Esta necesidad puede responder tanto a su función como bloque estructural en la síntesis de proteínas, como a su actividad como metabolito en el metabolismo, principalmente dentro del ciclo de la urea ^{(80) (81)}.

Durante el embarazo, la demanda de L-arginina se multiplica a causa del crecimiento fetal, la placentación y la inmunotolerancia materna. Investigaciones médicas, han reportado que su suplementación mejora la perfusión placentaria, favorece la síntesis de óxido nítrico (NO) y contribuye a prevenir complicaciones como la preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino y parto prematuro ^{(80) (81)}.

Particularmente en los recién nacidos prematuros, la L-arginina es considerada un aminoácido condicionalmente esencial, debido al desequilibrio de las vías metabólicas que participan en su síntesis. Esta incapacidad puede derivar la acumulación de amonio (hiperamonemia) y una mayor susceptibilidad a infecciones, incluyendo sepsis ^{(80) (81)}.

Aunque la leche materna humana contiene niveles bajos de L-arginina para un desarrollo normal, es rica en sus precursores (prolina y glutamina). Por ello, sigue siendo la forma de nutrición más adecuada para los recién nacidos, tanto prematuros como a término ⁽⁸²⁾.

La L-arginina es precursora de distintas moléculas bioactivas, entre ellas, el glutamato (Glu), el óxido nítrico (NO), la citrulina (Cit) y las poliaminas, siendo moléculas que

participan en procesos inmunológicos como la señalización celular, la citotoxicidad antimicrobiana, la regulación de la inflamación y la reparación tisular ⁽⁸³⁾.

La L-arginina puede obtenerse a través de la dieta o sintetizarse endógenamente. En humanos, su biosíntesis tiene lugar en dos etapas principales: primero, la conversión intestinal de glutamina, glutamato y prolina en citrulina. Esta última recorre el torrente sanguíneo y es llevada a otros destinos, principalmente al riñón y, en menor medida, a ciertas células inmunes, donde finalmente se convierte en L-arginina ⁽⁸³⁾.

Esta conversión ocurre por medio de una secuencia de dos reacciones enzimáticas: la primera, catalizada por la argininosuccinato sintetasa (ASS1), consiste en la unión de citrulina y aspartato, utilizando ATP como fuente de energía, para formar argininosuccinato. Posteriormente, la enzima argininosuccinato liasa (ASL) escinde el argininosuccinato, generando L-arginina y fumarato, este último es un intermediario que puede retroalimentar el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) ⁽⁸³⁾.

La captación de L-arginina y posteriormente su transporte al interior de la célula, es regulado por la familia de transportadores de solutos 7 (SLC7) y de transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT-1, CAT-2 y CAT-3). En algunos de estos, las señales inmunológicas promueven diferentes niveles de su expresión: por ejemplo, CAT-2 es inducido en las células dendríticas y en los macrófagos ⁽⁸⁴⁾.

En los macrófagos activados, en particular, las citocinas Th1 o Th2 activan mayormente el catabolismo de la L-arginina a través de dos rutas enzimáticas principales: la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y las isoformas de arginasa (Arg1 y Arg2), dependiendo del contexto inmunológico ⁽⁸⁵⁾. Mientras que iNOS utiliza L-arginina para sintetizar óxido nítrico (NO), un mediador en la respuesta antimicrobiana e inflamatoria. La arginasa cataliza su conversión en ornitina y urea (cuando el ciclo de la urea está activo, como en el riñón). Asimismo, la ornitina generada puede ser precursora de otros metabolitos, como glutamato (Glu), prolina (Pro), citrulina (Cit) y poliaminas (putrescina, espermidina y espermina). La competencia entre estas dos vías metabólicas (NOS vs. arginasa) tienen efectos directos en la polarización de macrófagos, la función de linfocitos T y la resolución de la inflamación. Sin embargo, la arginasa 1 citosólica se localiza en más tipos celulares:

macrófagos alternativos (tipo M2), células dendríticas, granulocitos, células mieloides supresoras (MDSC) y linfocitos T (en su isoforma Arginasa 2 mitocondrial) ⁽⁸⁵⁾.

La L-arginina también tiene efectos directos sobre los linfocitos T. Estudios recientes han evaluado las respuestas de estas células bajo distintas concentraciones de L-arginina; en una concentración estándar las células T activadas consumen este aminoácido rápidamente, durante las primeras 24 horas. En cambio, la adición exógena de L-arginina modifica el perfil metabólico, al favorecer un cambio de un metabolismo glucolítico a uno oxidativo (OXPHOS), contrarrestando así el efecto Warburg característico de las células T activadas. Este cambio mostraba una regulación negativa de los transportadores de glucosa y de las enzimas glucolíticas, mientras que la biosíntesis de L-serina (derivada de la glucólisis) y la abundancia de varios intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) estaban al alza, potenciando la fosforilación oxidativa. Una configuración que fue evidente en este estudio, ya que la capacidad respiratoria de las células reflejaba un incremento en el consumo de oxígeno ⁽⁸⁶⁾.

La continuidad de este estudio integró un análisis proteómico y metabolómico, el cual reveló la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, incluyendo el de arginina y prolina. De los 429 metabolitos caracterizados, la L-arginina y sus derivados (ornitina, N-acetilornitina) se encontraron entre los que presentaron una mayor disminución durante la activación celular, resaltando su consumo activo y su importancia funcional en este proceso ⁽⁸⁶⁾.

Por el contrario, en los escenarios estudiados donde la L-arginina es limitada o privada, las células T experimentan estrés nutricional con diferentes defectos descritos: la expresión del receptor TCR ζ es menor, la síntesis de proteínas es baja y, por lo tanto, su capacidad de proliferación y secreción de citocinas es revocada ⁽⁵³⁾. Además, estos efectos están regulados con precisión por sensores metabólicos como mTOR y GCN2, que integran señales del microambiente inmunológico y determinan el destino funcional de las células ⁽⁸⁷⁾.

En resumen, la L-arginina es un metabolito multifuncional, con un metabolismo complejo y finamente regulado por distintas enzimas, transportadores y señales ambientales que influyen directamente en la función de los linfocitos T.

This diagram illustrates the metabolic pathways of polyamine metabolism, centered around the Citrulline-NO cycle and the Urea cycle.

Citrulline-NO cycle: L-Citrulline is converted to L-Arginine by the enzyme ASS1, a reaction coupled with Aspartate + ATP. L-Arginine is then converted back to L-Citrulline by the enzyme NOS, which produces NO and consumes NADPH + H⁺. L-Arginine is also converted to L-Ornithine by the enzyme ARG, which releases H₂O. L-Ornithine is converted back to L-Citrulline by the enzyme ODC, which releases CO₂.

Urea cycle: L-Ornithine enters the Urea cycle, where it is converted to L-Citrulline by the enzyme OTC, a reaction coupled with Carbamoyl-phosphate and the release of P_i. L-Citrulline is then converted to L-Arginine by the enzyme ASS1.

L-Arginine metabolism: L-Arginine can be converted to L-Agmatine by the enzyme ADC, which releases CO₂. L-Arginine is also converted to Guanidinoacetate by the enzyme AGAT, a reaction coupled with Glycine. Guanidinoacetate is then converted to Creatine by the enzyme GAMT, a reaction coupled with Sadenosyl-L-methionine and the release of Sadenosyl-L-homocysteine.

Polyamine synthesis: L-Ornithine is converted to Putrescine by the enzyme ODC, which releases CO₂. Putrescine is then converted to Spermine by the enzyme SMS, and Spermine is converted to Spermidine by the enzyme SRM.

Other pathways: L-Proline is converted to P5C by the enzyme PYCR/PYCLR. L-Glutamate is converted to L-Glutamyl-γ-semialdehyde by the enzyme P5CS. L-Glutamyl-γ-semialdehyde is converted to L-Ornithine by the enzyme OAT, a reaction coupled with 2-oxalocarboxylate and the release of L-α-aminoacid. L-Ornithine is also converted to L-Glutamyl-γ-semialdehyde by the enzyme OAT.

TCA cycle: Fumarate is shown as a product of the Citrulline-NO cycle, which enters the TCA cycle.

37

1.15.2 L-serina

La L-serina es un aminoácido polar, no cargado y clasificado como no esencial en humanos sanos. Sin embargo, durante la lactancia materna, sus niveles aumentan de forma significativa en los primeros tres meses, al igual que los de la L-glutamina, L-glutamato, L-glicina y L-alanina, la mayoría de ellos precursores metabólicos de la L-serina. En cambio, las concentraciones del resto de aminoácidos permanecen relativamente estables a lo largo del periodo de lactancia. Este patrón de aumento ha sido observado de forma consistente en distintas poblaciones, independientemente de la etnia o ubicación geográfica de la madre ^{(89) (90)}.

Como metabolito, cumple numerosas funciones que van desde participar en el recambio proteico, al igual que otros aminoácidos, hasta contribuir a la síntesis lípidos (como la fosfatidilserina y la esfingomielina), nucleótidos (purinas y pirimidinas) y otros aminoácidos (como la glicina, la cisteína y la metionina). Además, es precursora de compuestos importantes en el metabolismo del folato y en los procesos de metilación, como el 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-mTHF) y la S-adenosilmetionina (SAM) ⁽⁹¹⁾.

En compensación a la amplia participación de este aminoácido en diversas rutas metabólicas, la L-serina puede obtenerse a través de cuatro vías principales: (1) síntesis *novο* mediante la ruta de la fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH), también conocida como vía de la síntesis de serina (SSP, por sus siglas en inglés); (2) conversión a partir de glicina mediante la serina hidroximetiltransferasa (SHMT); (3) por transaminación; y (4) absorción desde fuentes dietéticas o el microambiente celular ⁽⁹¹⁾.

La L-serina puede ser absorbida por las células por medio de transportadores específicos, caracterizados como SLC1A4 (ASCT1) y SLC1A5 (ASCT2). Estos forman parte de la familia de transportadores de aminoácidos neutros y participan en el intercambio de L-serina con otros aminoácidos como la L-glutamina, la L-alanina y la L-treonina ⁽⁹²⁾.

En células en proliferación, como las inmunes o las tumorales, la L-serina es el segundo aminoácido más requerido, solo por detrás de la L-glutamina. Para esta clase de células, la vía de síntesis de *novο* de la L-serina es esencial y se estimula para abastecer la

síntesis de proteínas y el metabolismo de un carbono (1C), lo que sostiene la alta tasa de proliferación celular ⁽⁹³⁾.

La vía de SSP inicia a partir de 3-fosfoglicerato (3-PG), un intermediario glucolítico, que es oxidado por la enzima PGDH para formar 3-fosfohidroxipiruvato (PHP). Este, a su vez, se transamina con una molécula de ácido glutámico en una reacción catalizada por la fosfoserina aminotransferasa (PSAT1), generando fosfoserina (PS). Finalmente, la fosfoserina es fosfatada por la fosfoserina fosfatasa (PSPH) para producir L-serina y un fosfato. Esta reacción corresponde al paso limitante de la vía y está sujeto a la inhibición por retroalimentación de la síntesis de L-serina ⁽⁹³⁾.

En contraparte, la enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT) cataliza la conversión reversible entre L-glicina y serina a través del metabolismo de un carbono (1C). En esta reacción, la glicina se convierte en L-serina mediante la transferencia de un grupo metileno proveniente del 5,10-metilen-tetrahidrofolato (5,10-MTHF), generando tetrahidrofolato (THF) como producto ⁽⁹⁴⁾.

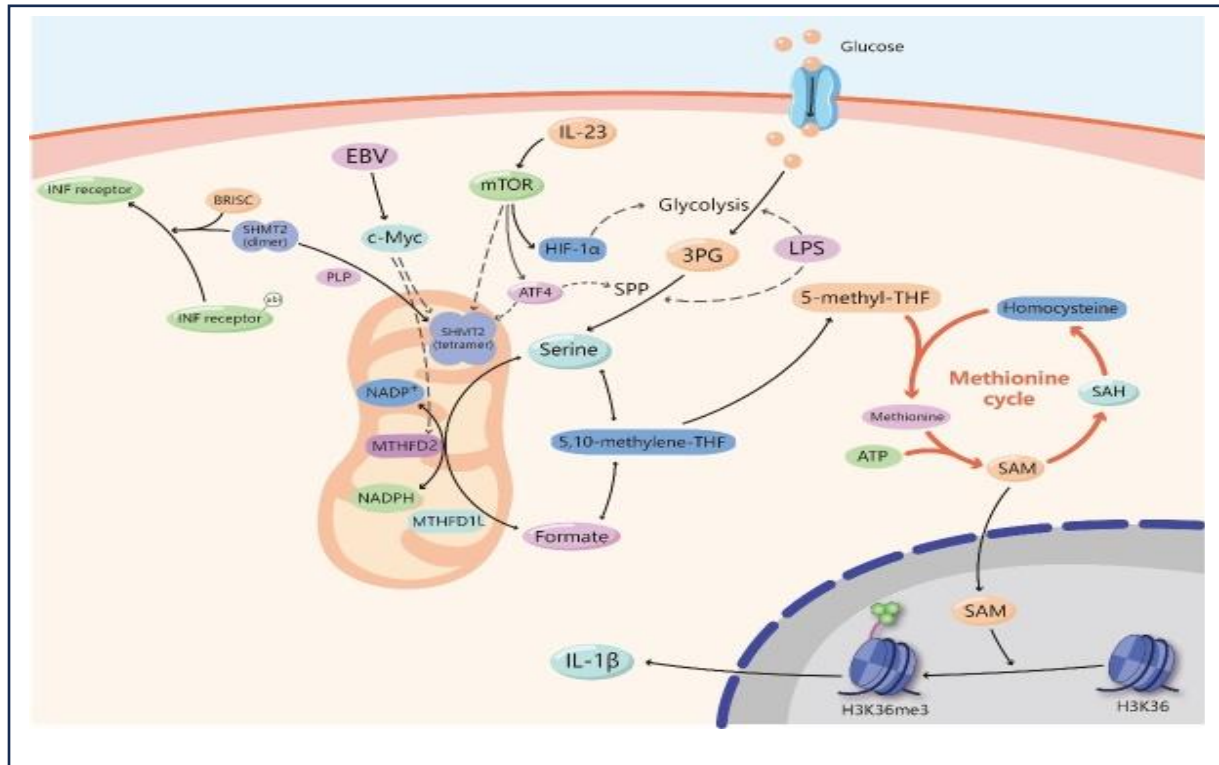
En humanos sanos, dicha vía, pero en el sentido inverso (es decir, de L-serina hacia L-glicina), representa aproximadamente el 41% del flujo de L-glicina en todo el cuerpo. Adicionalmente, este proceso interviene en la síntesis de nucleótidos y en la metilación del ADN, ya que el 5,10-metilen-tetrahidrofolato generado es necesario para la formación de la S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de grupos metilo en la célula. La contribución de la L-serina al metabolismo de un carbono impulsa la síntesis de purinas y pirimidinas y de cofactores como NADPH, NADH y ATP ⁽⁹⁵⁾.

La producción del poder reductor, principalmente de NADPH, dependiente del metabolismo de L-serina, se encarga de transportar hidrógeno en muchas reacciones biológicas, a la vez que actúa como agente reductor. El NADPH tiene una fuerte capacidad antioxidante, lo que es beneficioso para la supervivencia celular ^{(94) (95)}.

Alternativamente, la L-serina es un aminoácido glucogénico, ya que puede ser convertida en piruvato a través de la enzima serina deshidratasa, y posteriormente entrar al ciclo de ácido tricarboxílico como acetil-CoA, o bien ser utilizada para la gluconeogénesis en condiciones específicas. Esta flexibilidad metabólica permite a la serina participar tanto

en el mantenimiento energético como en el soporte biosintético de células altamente proliferativas como lo son los linfocitos T activados ⁽⁹⁵⁾.

Finalmente, se ha demostrado que la L-serina es un aminoácido importante para la activación y proliferación de los linfocitos T, por lo que su adición al medio es esencial ⁽⁹⁶⁾.



Metabolismo de la L-serina y su relevancia en linfocitos T.

La L-serina ingresa a la célula por los transportadores SLC1A4 (ASCT1) y SLC1A5 (ASCT2), o se sintetiza de novo desde 3-fosfoglicerato mediante la vía SSP, catalizada por fosfoglicerato deshidrogenasa, fosfoserina aminotransferasa 1 y fosfoserina fosfatasa. A través de la serina hidroximetiltransferasa, la serina se interconvierte con glicina dentro del metabolismo de un carbono (1C), generando 5,10-metilen-THF que sostiene la síntesis de purinas, pirimidinas y la formación de S-adenosilmetionina para reacciones de metilación, además de contribuir a la producción de NADPH y al equilibrio redox. De manera complementaria, la serina puede transformarse en piruvato mediante la serina deshidratasa, conectando con el TCA y el soporte energético. En linfocitos T activados, estas rutas respaldan la demanda biosintética, proliferativa y redox característica de su activación (Wu et al., 2020).

2. ANTECEDENTES

Estudios en el laboratorio han demostrado que las células T neonatales presentan un alto umbral de activación, una proliferación activa y funciones efectoras limitadas, incluso en ausencia de señales clásicas de activación. Desglosando estos resultados, el análisis transcriptómico de las células T CD4⁺ de neonatos, mostró un perfil de expresión génica tan distinto que la separación en el análisis de componentes principales (PCA) con respecto a su contraparte, las células T CD4⁺ vírgenes de adulto, fue totalmente clara (20 a 30 años de edad) ⁽⁹⁷⁾.

Al profundizar en el análisis, se observó que los genes sobreexpresados en las células de neonatos reflejaban una actividad glucolítica aeróbica temprana, ya que genes que codifican las hexoquinas 1 y 2, la lactato deshidrogenasa A (LDHA) y el transportador de glucosa tipo 1 (SLC2A1) se encontraban diferencialmente expresados. Este escenario resulta inesperado e interesante, ya que las células T CD4⁺ neonatales no habían sido sometidas a ningún estímulo previo ⁽⁹⁸⁾.

Adicionalmente, se observó una baja producción de citocinas efectoras (panel Th) por parte de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos en comparación con las células de adultos (Figura 1) ⁽⁹⁷⁾.

La realización de este estudio, descrito en la tesis doctoral de la Dra. Linda Kempis, nos llevó a plantear que este programa metabólico, así como otras características de las células T CD4⁺ de los recién nacidos (descritas más adelante) podrían ser moduladas por señales activadas en el ambiente intrauterino.

Siguiendo esta línea de investigación, el M. en Ciencias Carlos Ventura, en su tesis doctoral, evalúa el efecto de factores perinatales, principalmente el tipo de nacimiento y la edad gestacional, sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ ⁽¹⁰⁰⁾, ya que, como se ha descrito en el marco teórico, estos factores tienen un importante potencial para modular la respuesta inmune, con posibles implicaciones incluso más adelante en la vida.

Previamente, en el laboratorio se había encontrado que las células T neonatales sobreexpresan genes asociados a la proliferación celular en comparación con las células T de adultos ⁽⁹⁷⁾. En el estudio del M. Carlos Ventura, la evaluación de la proliferación de células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea mostró un mayor porcentaje de células en división (respecto a las de parto vaginal) ⁽¹⁰¹⁾, lo cual resultó consistente con su perfil transcripcional, en el que se observó la expresión de genes como KLF9, MIR186 y MIR1244-4, asociados con la regulación de la proliferación y con procesos de diferenciación ^{(99) (100)}.

Sin embargo, al comparar ambos grupos entre sí, se observó que las células T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, además de la sobreexpresión global de genes asociados a proliferación celular, presentan una mayor diversidad transcripcional, con la expresión adicional de genes relacionados con respuestas inmunitarias, como IL1B, TNFA, CD40, LTBR, CD36, FOSB y FGR, en contraste con las células de cesárea, cuyo perfil se observa más restringido a genes asociados únicamente a proliferación celular ⁽⁹⁹⁾.

La continuidad de este estudio fue la evaluación de la función de los linfocitos T CD4⁺ de ambos tipos de nacimiento, así como de nacimiento prematuro, a través de la cuantificación de citocinas efectoras liberadas tras la estimulación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Los resultados mostraron tres patrones de respuesta: definido, bajo y no definido. El primer patrón correspondió al perfil de las células T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, ya que produjeron IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, mostrando una respuesta característica del fenotipo Th2. En contraste, el segundo patrón correspondió a las células de cesárea, las cuales produjeron únicamente una baja cantidad de IL-13. Finalmente, las células de neonatos de nacimiento prematuro mostraron una producción de citocinas más heterogénea y variable, por lo que se clasificaron dentro del patrón no definido ⁽⁹⁹⁾.

Este grupo de hallazgos indican que las células T neonatales se encuentran en un estado metabólicamente activo e hiperproliferativo, pero funcionalmente restringido en cuanto a la producción de citocinas efectoras, siendo esta última característica particularmente notable en las células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea.

Esto podría sugerir que las señales asociadas al parto vaginal podrían contribuir a una reprogramación inmunometabólica transitoria, favoreciendo una mayor competencia funcional de las células T CD4⁺ ⁽⁹⁹⁾.

En conjunto, esta evidencia sugiere que el perfil funcional de las células T neonatales está fuertemente determinado por su programación metabólica y por señales perinatales asociadas al tipo de nacimiento.

En la sección 1.7. *Metabolismo de linfocitos T* (pág. 17–19), se describe cómo cada fenotipo funcional de los linfocitos T CD4⁺ está dirigido por un programa metabólico distinto ⁽¹⁰²⁾. En este contexto, los aminoácidos emergen como reguladores importantes del metabolismo y la función de los linfocitos T. Entre ellos, la L-arginina y la L-serina destacan por su papel central en el inmunometabolismo ^{(103) (104) (105)}.

- La L-arginina participa en rutas relacionadas con la producción de óxido nítrico, poliaminas y regulación del metabolismo energético, influyendo en la activación, diferenciación y supervivencia de las células T ⁽¹⁰³⁾.
- La L-serina es esencial para el metabolismo de un carbono, la síntesis de nucleótidos, la regulación redox y el soporte bioenergético celular ⁽¹⁰⁴⁾.

Dado que las células T CD4⁺ neonatales presentan un metabolismo altamente activo, dominado por glucólisis y proliferación, sumado a que su limitación funcional parece estar asociada a esta programación metabólica, la suplementación con L-arginina y L-serina podría modular este estado metabólico y, con ello, regular su capacidad de activación y producción de citocinas.

Por lo tanto, evaluar el efecto de la suplementación con estos aminoácidos en células T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea permite estudiar cómo la modulación metabólica puede influir directamente en el perfil funcional de estas células y ayudar a comprender mecanismos de regulación del sistema inmune neonatal asociados al tipo de nacimiento.

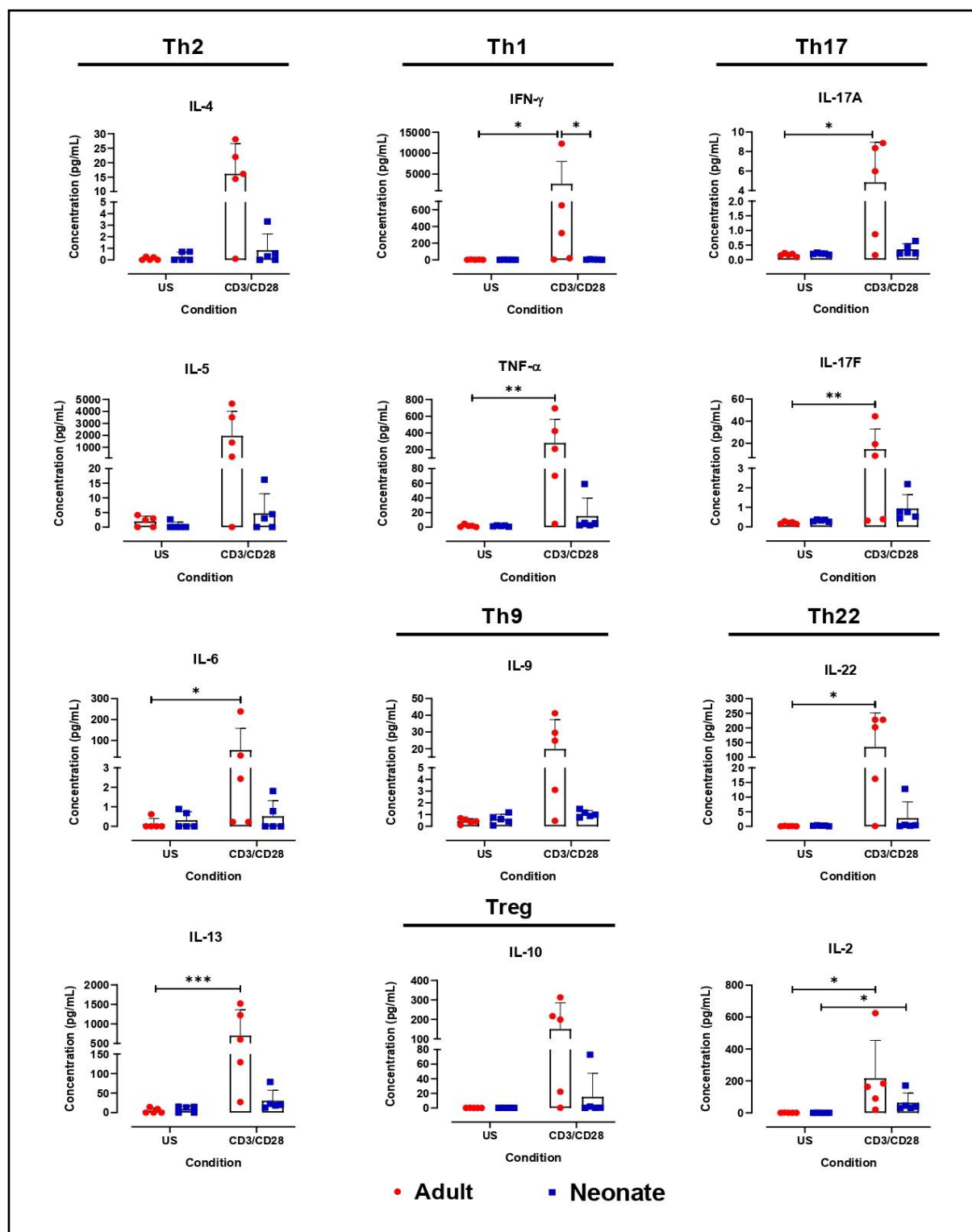


Figura 1: Producción de citocinas efectoras de células T CD4⁺ de adultos y neonatos. Se muestra las citocinas de cada perfil efector en un estado basal y activado. Los adultos presentan una mayor producción de citocinas efectoras en respuesta a la estimulación en comparación con los adultos (Kempis-Calanis, 2024).

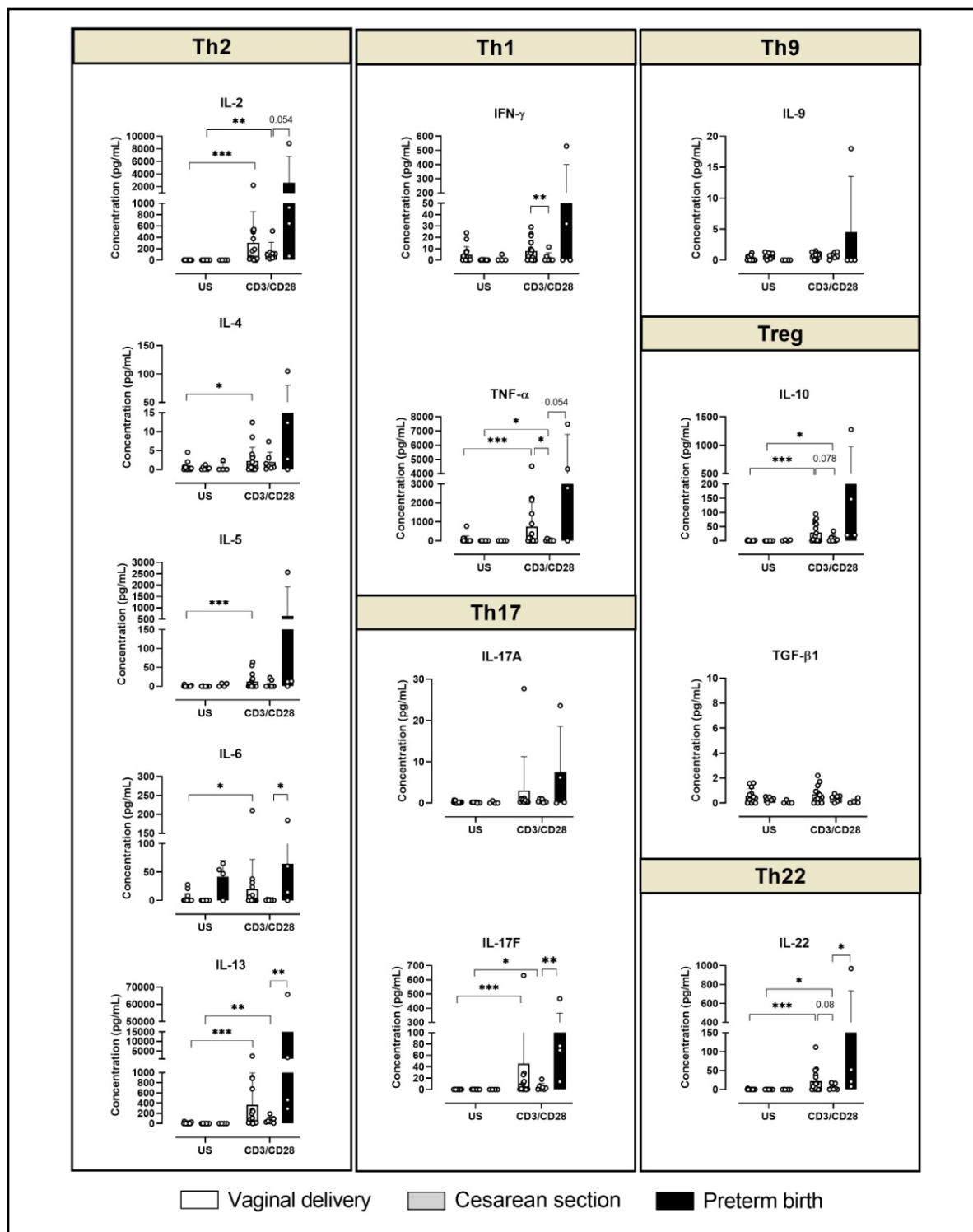


Figura 12: Cuantificación de citocinas efectoras secretadas en función del modo de nacimiento. Se muestra la medición de citocinas tras 72 horas de reposo (US) o de estimulación (CD3/28) con el entrecruzamiento de moléculas CD3 y CD28. Los sobrenadantes fueron separados por el modo de nacer del donante: nacimiento vaginal (barras-blancas, n = 16), cesárea (barras-gris, n = 7) y parto prematuro (barras-negro, n = 4). Las concentraciones de citocinas se utilizaron para el análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon para muestras emparejadas y la prueba U de Mann-Whitney para muestras no emparejadas. $P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ (Análisis realizado por el M. Ciencias Carlos Ventura; artículo sometido <https://www.biorxiv.org/content/10.64898/2026.02.21.707199v1>).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cesárea es un procedimiento quirúrgico que permite preservar la vida tanto de la madre como del recién nacido. Consiste en realizar una incisión quirúrgica en el abdomen y el útero materno para extraer al bebé, generalmente cuando ha alcanzado una edad gestacional que le permite sobrevivir fuera del útero. Inicialmente, este método se implementaba como una solución médica frente a complicaciones en partos difíciles. Sin embargo, en las últimas décadas, su uso ha aumentado considerablemente, en algunos contextos más allá de las indicaciones médicas estrictamente necesarias ⁽¹⁰⁶⁾.

Se estima que solo entre el 9% y el 19% de los partos por cesárea son médicamente justificados. Sin embargo, la tasa de cesáreas ha aumentado de manera considerable a nivel mundial, superando el porcentaje del 15% que tradicionalmente fue señalado por la OMS como referencia para su utilización. En México, entre 2018 y 2019, este porcentaje alcanzó el 48.8% ⁽¹⁰⁷⁾. Es importante señalar que, la política gubernamental mexicana ya ha enfatizado la necesidad de que tanto las instituciones públicas como las del sector privado, implementen estrategias puntuales para reducir la incidencia de cesáreas innecesarias; sin embargo, hasta la fecha, no se han logrado los resultados esperados ⁽¹⁰⁷⁾.

En la actualidad, la discusión sobre la elección del modo de parto se ha enfocado principalmente en las implicaciones que este tiene para la salud de la madre, particularmente en términos de riesgos y beneficios. Los peligros del parto vaginal suelen recibir más atención, mientras que solo 2 de cada 3 mujeres afirman haber recibido asesoramiento sobre los posibles problemas neonatales derivados de una cesárea electiva ⁽¹⁰⁸⁾.

La falta de investigación en el sistema inmunitario neonatal nos ha llevado a no lograr controlar las tasas elevadas de cesáreas sin indicación médica. En México, de los partos de las madres de 15 a 49 años que ocurrieron en los últimos años, 3.9 millones (55%) fueron cesáreas, y de estas, el 50.7% se planificaron. Este porcentaje sigue aumentando, en parte debido a que, durante muchos años el campo de estudio sobre la desregulación del sistema inmunitario neonatal fue terreno sin explorar ⁽¹⁰⁸⁾.

El parto vaginal, también conocido como parto natural, es un proceso espontáneo que generalmente ocurre entre las semanas 37 y 42 de gestación. Este tipo de nacimiento se caracteriza por ser de bajo riesgo desde el inicio del trabajo de parto, desarrollarse de manera fisiológica y resultar en el nacimiento de un recién nacido sano, capaz de adaptarse adecuadamente a la vida extrauterina ⁽¹⁰⁹⁾.

Más allá de las diferencias obstétricas, el tipo de nacimiento constituye un evento biológico determinante que induce cambios en el sistema inmune neonatal ⁽¹¹⁰⁾. En el laboratorio, estos cambios se han observado en la producción de citocinas, ya que las células T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal construyen una respuesta efectora más amplia y funcional, mientras que las células provenientes de cesárea muestran una respuesta más limitada ⁽⁹⁹⁾, a pesar de mantener una alta capacidad proliferativa ⁽⁹⁷⁾. Este escenario podría sugerir que los procesos de proliferación y diferenciación funcional pueden verse modulados, en cierta medida, por señales dependientes del nacimiento.

En la literatura se ha descrito que cada fenotipo funcional de los linfocitos T está asociado a configuraciones metabólicas específicas ⁽¹⁰²⁾. Sin embargo, en el laboratorio se ha generado evidencia de que los linfocitos T neonatales activan un metabolismo glucolítico anaeróbico y, a su vez, esto se asocia con una alta capacidad proliferativa, aun cuando no reciben señales clásicas de activación ⁽⁹⁷⁾.

Considerando que las células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea muestran una proliferación activa, pero con una capacidad efectora limitada, surge el planteamiento de que su funcionalidad podría ser modulada *in vitro* mediante la disponibilidad de aminoácidos específicos, como L-arginina y L-serina, al igual que en las células T CD4⁺ provenientes de parto vaginal. Esto permitiría evaluar dicha modulación a través del perfil de citocinas efectoras y, posiblemente, identificar estrategias aplicadas capaces de regular la respuesta del sistema inmune neonatal.

4. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la muerte neonatal como el fallecimiento que ocurre desde el nacimiento hasta el final de los primeros 28 días de vida. Dentro de este periodo, se distinguen tres etapas de mayor vulnerabilidad: las muertes en las primeras 24 horas, las muertes neonatales tempranas (ocurridas durante los primeros siete días) y las muertes neonatales tardías (que se presentan después del séptimo día y antes de completar los 28 días) ⁽¹¹¹⁾ ⁽¹¹²⁾. Este panorama refleja las dificultades globales para reducir la mortalidad neonatal, con un impacto considerable tanto en los países desarrollados como, de manera desproporcionada, en los países en desarrollo. En 2022, en el mundo se registraron 2,3 millones de muertes de recién nacidos en sus primeros 28 días de vida, lo que equivale a unas 6,500 defunciones diarias y representa el 47% de todas las muertes en niños menores de 5 años. Alrededor del 24% de estas muertes neonatales fueron atribuibles a infecciones ⁽¹¹¹⁾, lo que resalta la urgencia de fortalecer las estrategias de prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas en esta población altamente vulnerable, así como la necesidad de avanzar en el estudio del sistema inmune neonatal para abordar esta problemática.

El sistema inmunitario neonatal presenta características distintivas que parecen estar programadas desde el periodo intrauterino. En este contexto, las células T CD4⁺ neonatales presentan un alto umbral de activación, baja producción de citocinas efectoras y una proliferación celular elevada, rasgos que son particularmente más evidentes en las células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea ⁽⁹⁷⁾ ⁽⁹⁹⁾.

Este estado inmunológico muestra variaciones adicionales en función del tipo de nacimiento. En nuestro laboratorio, denominamos “firma de activación inmunitaria” al patrón de expresión de genes asociados a citocinas inflamatorias, factores de señalización inmunitaria y moléculas de activación, el cual se observa en células T CD4⁺ de neonatos nacidos por vía vaginal. Este patrón se asocia con una mayor capacidad de producción de citocinas efectoras y con una respuesta inmunitaria más funcional, en contraste con lo observado en las células provenientes de cesárea ⁽⁹⁹⁾.

De manera importante, este comportamiento no puede entenderse únicamente desde la perspectiva inmunológica, sino que está estrechamente vinculado al estado metabólico

de las células T, tal como se describe en la sección 1.7 *Metabolismo de linfocitos T* (pág. 17–19), donde se establece que cada fenotipo funcional se asocia a configuraciones metabólicas específicas ⁽¹⁰²⁾. Además, las células T neonatales presentan un perfil metabólico altamente activo, dominado por glucólisis aeróbica y proliferación celular, incluso en ausencia de señales clásicas de activación ⁽⁹⁷⁾.

En este contexto, los aminoácidos emergen como reguladores clave del metabolismo de los linfocitos T. En particular, la L-arginina participa en rutas relacionadas con la producción de óxido nítrico, poliaminas y la regulación del metabolismo energético, influyendo directamente en la activación, diferenciación y supervivencia de las células T ⁽¹⁰³⁾. Por su parte, la L-serina es esencial para el metabolismo de un carbono, la síntesis de nucleótidos, el control redox y el soporte bioenergético celular, procesos fundamentales para la proliferación y función inmunitaria ⁽¹⁰⁴⁾.

Dado que las células T CD4⁺ neonatales presentan un estado metabólico altamente activo pero una capacidad efectora limitada, se plantea que la modulación de este estado mediante la suplementación con L-arginina y L-serina podría influir directamente en su función inmunológica, particularmente en su capacidad de activación y producción de citocinas, permitiendo identificar moléculas inmunoregulatoras relevantes en etapas tempranas de la vida.

5. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la suplementación con L-arginina y L-serina sobre la regulación de los perfiles de citocinas efectoras, innatas y moléculas citotóxicas en células T CD4+ provenientes de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal, bajo condiciones de activación vía TCR/CD28.

Particulares

1. Evaluar el efecto de la suplementación con L-arginina y L-serina sobre la supervivencia, la activación y el perfil de citocinas de células T CD4+ provenientes de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal.
2. Evaluar la influencia de la suplementación con L-arginina y L-serina sobre la orientación hacia fenotipos efectores de las células T CD4+ neonatales, utilizando la condición control como referencia.

6. HIPOTESIS

La suplementación con L-arginina y L-serina modula el estado funcional de las células T CD4+ neonatales, favoreciendo la orientación hacia fenotipos efectores proinflamatorios, como Th1 y Th17, en neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea.

7. METODOLOGÍA

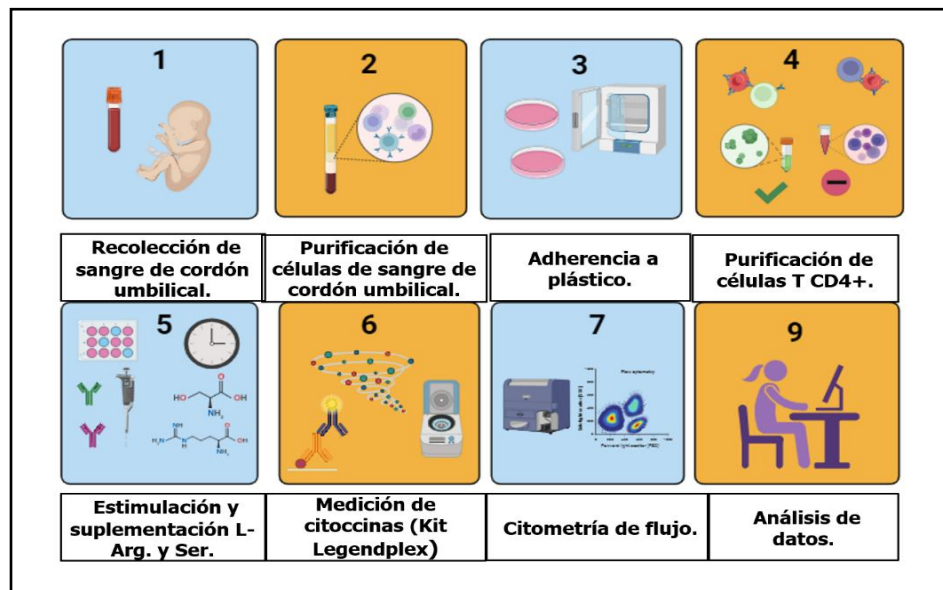


Figura1: Flujo de trabajo para la cuantificación de citocinas de linfocitos T CD4⁺ activados y suplementados con o sin L-arginina y serina.

7.1 Obtención de muestra de sangre de cordón umbilical

La recolección de las muestras de sangre del cordón umbilical estuvo respaldada por el permiso de Servicios de Salud Morelos y la autorización del comité de ética del Hospital General de Dr. José G. Parres y Mor. (Av. Domingo Diez S/N, Lomas de la Selva, 62270 Cuernavaca, Mor.) y el Hospital General de Temixco (dirección) pero, sobre todo, se llevó a cabo con el consentimiento informado de las madres a través de una carta que explicaba la utilidad de la sangre y la garantía de que no se haría ningún procedimiento invasivo para ella o el bebé. Sin la obtención de las firmas participantes, la toma de muestra habría sido denegada.

Las madres de este trabajo fueron seleccionadas si estaban clínicamente sanas. Esto se hizo con el fin de evitar la activación anticipada del sistema inmunitario. De la misma forma, se llevó a cabo únicamente la colecta de sangre de neonatos nacidos sanos, tanto por vía vaginal como por cesárea. La cohorte del estudio estuvo restringido a edades gestacionales a término (37 a 40 semanas de gestación) y estuvo abierto a ambos sexos.

El proceso de recolección de muestras sanguíneas se realizó tras el alumbramiento y antes de la expulsión de la placenta. En los casos de parto vaginal, la recolección se llevó a cabo durante el corte del cordón umbilical y se depositó en tubos Falcon estériles con anticoagulante (700 µL de EDTA). Por otro lado, en los casos de cesárea, las muestras se obtuvieron mediante la punción de la vena umbilical, con la manipulación por parte de los médicos para mantener el ambiente estéril durante el procedimiento quirúrgico.

7.2 Purificación de células mononucleares

En el día de la recolección de la sangre de neonatos nacidos tanto por parto vaginal como por cesárea, se llevó a cabo la purificación de las células mononucleadas de sangre de cordón umbilical (o CBMC, por sus siglas en inglés). Para este procedimiento, se utilizó una solución de polisacárido hidrofílico altamente ramificado (Lymphoprep, Stemcell), que facilitó la formación de un gradiente de densidad mediante la centrifugación de la mezcla. Esto permitió separar los eritrocitos y granulocitos en distintas fases, dejando una capa blanca en la parte superior del Lymphoprep. La capa recuperada correspondió a las células mononucleares. Posteriormente, se dejaron en incubación durante una noche con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFP) a 37°C y 5% de CO₂, con el objetivo de que los monocitos quedaran adheridos a las cajas.

7.3 Purificación de linfocitos T CD4⁺

Al día siguiente, las CBMC's se mezclaron con 2 mL de eritrocitos del mismo donante, previamente almacenados en cultivo. Se añadió RosetteSep™ (STEMCELL) para aislar a los linfocitos T CD4⁺ mediante selección negativa de todas las demás células mononucleares. La mezcla se incubó durante 40 minutos con agitación para inducir la formación de complejos entrecruzados con anticuerpos de leucocitos no deseados con eritrocitos. El RosetteSep™ (STEMCELL) es un coctel de complejos de anticuerpos dirigidos a las moléculas: CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b y TCRγ/δ, conjugados a anticuerpos contra la glicoforina A, una proteína presente en la membrana de los eritrocitos. Durante la reacción, las células no objetivo son atrapadas por estos tetrámeros

de anticuerpos, dejando libres aquellas células que no participan en la reacción de entrecruzamiento, en este caso los linfocitos T CD4⁺.

7.4 Ensayo de estimulación a través de CD3/CD28

Para evaluar el efecto de la suplementación con L-arginina y serina sobre la activación y el perfil de citocinas de células T CD4⁺ purificadas, se establecerán las siguientes condiciones y se ajustará una proporción celular de 2×10^6 :

Grupo 1: células T CD4⁺ purificadas sin suplemento.

Grupo 2: células T CD4⁺ purificadas y suplementadas con L-arginina.

Grupo 3: células T CD4⁺ purificadas y suplementadas con L-serina.

Así mismo, cada una (grupo 1; grupo 2; grupo 3; y grupo 4) se dividirán en dos partes y dos tiempos:

1. Estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 (24 y 72 h).
2. Sin estimulación.

La estimulación del TCR se realizó con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (OKT3, Tonbo) y anti-CD28 (CD28.2, Tonbo), también se usó el entrecruzador goat anti-mouse (BIOSS). La concentración ajustada para el entrecruzador y los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 fue de 1 µg/ml.

7.5 Identificación de marcadores de membrana y células vivas

Para evaluar la pureza, viabilidad y activación de las células T CD4⁺ de nuestros experimentos, se realizó la tinción de marcadores de membrana y de viabilidad. La proporción celular fue ajustada a 1×10^6 células. El procedimiento incluyó un lavado previo con PBS. Después, las células se resuspendieron y se dejaron en 50 µL de volumen total, al que se añadieron los anticuerpos de tinción correspondientes. Las tinciones evaluadas fueron las siguientes:

Pureza de células T CD4⁺: Se utilizaron los anticuerpos CD3-FITC y CD4-APC.

Pureza de células sin memoria: Se utilizó el anticuerpo CD45RO-FITC.

Células activadas: Se utilizaron los anticuerpos CD69-FITC y CD25-APC.

Viabilidad: Se utilizó un reactivo de tinción de células muertas cercana a IR de fijación LIVE/DEAD.

7.6 Cuantificación de citocinas

Se cuantificaron las citocinas mediante el kit Legendplex (Cat: 741028), el cual tiene la capacidad de medir 12 citocinas de los fenotipos Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22 (IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17A, 17F, 22, IFN- γ y TNF- α). Las citocinas se obtuvieron del sobrenadante de las células que fueron o no estimuladas y bajo el suplemento. El sobrenadante se recolectó al finalizar el tiempo establecido y se guardó a -90 °C hasta su cuantificación con Legendplex (Cat: 741028).

Este kit utilizó el principio básico de los inmunoensayos tipo sándwich, en donde un analito soluble se captura entre dos anticuerpos. Las poblaciones de perlas venían en dos tamaños y diferentes niveles de fluorescencia de APC, lo que les permitió distinguirse entre sí. Cada conjunto de perlas se conjugó con un anticuerpo específico en la superficie y sirvió como perla de captura para ese analito en particular. Después del lavado, se agregaron anticuerpos de detección biotinilados y cada anticuerpo de detección se unió a su analito específico unido a las perlas de captura, formando así sándwiches de perlas de captura-analito-anticuerpo de detección. Posteriormente se añadió estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), que se unió a los anticuerpos de detección biotinilados, proporcionando una señal fluorescente con intensidades proporcionales a la cantidad de analito unido. Para cada población de perlas, la intensidad de fluorescencia de la señal de PE se cuantificó luego usando un citómetro de flujo.

7.7 Citometría de flujo

La técnica de citometría de flujo se utilizó para evaluar la pureza de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ purificadas, usando anticuerpos acoplados a fluoróforos para CD3 y CD4, así como la cuantificación de citocinas.

El análisis de las células fijadas se realizó en un citómetro de flujo Attune NxT (A24858) de Thermo Fisher, que permite utilizar cantidades mucho menores de células para un análisis eficiente. Las muestras fueron adquiridas con al menos 10,000 eventos sobre las células de interés, se utilizaron 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, el análisis estadístico con GraphPad Prism V8 y Microsoft Excel.

8. RESULTADOS

8.1 Muestras de sangre cordón umbilical obtenidas

Para llevar a cabo los experimentos, se consideraron los antecedentes maternos y las características de los neonatos al nacer. Se excluyeron del estudio aquellas madres con morbilidades como diabetes tipo 1 y 2, diabetes gestacional, hipertensión, hipotensión, infecciones urinarias, infecciones de transmisión sexual (ETS), infecciones respiratorias, obesidad, entre otras. Asimismo, las muestras de sangre de cordón umbilical procesadas fueron obtenidas de neonatos sanos que no presentaron patologías al nacer, con el objetivo 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 de vía vaginal	Sexo	Capurro (SDG)	Temperatura (°C)	Peso (Kg)	Apgar
1	Femenino	38.8	36.8°C	2.615 kg	8/9
2	Femenino	39.1	36.6 °C	3.670 kg	8/9
3	Masculino	39	36.9°C	3.030 kg	9/9
4	Masculino	39.7	36°C	3.590 kg	8/9

Neonatos de cesárea	Sexo	Capurro (SDG)	Temperatura (°C)	Peso (Kg)	Apgar
1	Masculino	37	36.4°C	2.750 kg	7/9
2	Femenino	37	36.8°C	2.530 kg	9/9

El estudio se limitó a neonatos con edad gestacional a término. El capurro se utilizó para determinar las semanas de gestación (SDG) al nacer. En la tabla se observa un rango de 38 a 41 SDG tanto para neonatos nacidos por parto vaginal como por cesárea.

La temperatura rectal del recién nacido fue un indicativo patológico; aquellos con una temperatura superior a 37.7 °C fueron excluidos. Los neonatos incluidos en este estudio presentaron una temperatura entre 36.6 °C y 37.4°C.

El peso del neonato también fue considerado un factor de morbilidad; aquellos con un peso superior a 4 kg fueron descartados. El APGAR es un examen realizado al primer y quinto minuto después del nacimiento, cuyo valor determina la tolerancia del neonato durante el parto; se evalúa a partir de la observación de factores físicos tales como el pulso, respiración, gesticulación y actividad. Los valores oscilan de 0 a 10. Según los registros, los valores estuvieron entre 8 y 9, tanto en neonatos nacidos por parto vaginal como por cesárea, indicando que toleraron bien el nacimiento.

8.2 Estrategia de selección de gating

Para los análisis de citometría de flujo, fue necesario establecer una estrategia previa de selección para identificar correctamente la región que contiene nuestra población de linfocitos vivos y distinguir de aquellos que habían muerto. El esquema siguiente muestra, de manera secuencial, los pasos utilizados en esta estrategia.

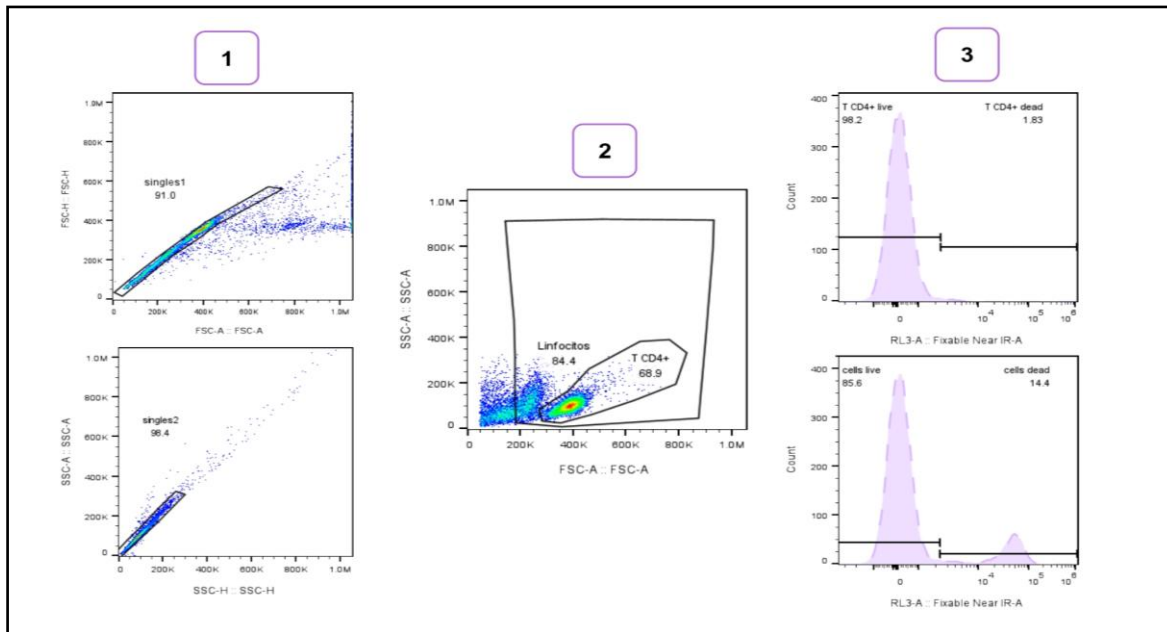


Figura 2: Estrategia de gating utilizada para la selección de la población de linfocitos vivos. Estrategia de gating utilizada para la selección de la población de linfocitos viables en todas las evaluaciones determinadas: **1)** Identificación de células individuales para excluir señales erróneas derivadas de agregados celulares, **2)** selección de la población global de linfocitos, y **3)** aislamiento de linfocitos T activados.

La selección de pasos por singuletes (pasos 1) es un proceso importante en el análisis de citometría de flujo. Se utiliza para asegurar que solo se analicen las células individuales (singuletes), excluyendo los agregados de células que pueden distorsionar los resultados. Los agregados de células pueden dar lugar a señales falsas o inexactas, ya que cada célula en el agregado puede contribuir a la señal de manera diferente. Al seleccionar solo singuletes, se mejora la precisión y la fiabilidad de los datos.

Para distinguir entre células individuales y agregados, se utilizaron los parámetros de dispersión hacia adelante (FSC) y lateral (SSC). En un gráfico de FSC-A (área) versus FSC-H (altura), los singuletes suelen formar una población lineal, mientras que los agregados aparecen fuera de esta línea.

El parámetro FSC-A está relacionado principalmente con el tamaño celular. Cuanto mayor sea la célula, mayor será la luz dispersada hacia adelante. Los linfocitos (mostrados en el paso 2) son células que mantienen un tamaño pequeño cuando aún no están activadas; por lo tanto, tendrán valores de FSC-A más bajos en comparación con otros tipos celulares. El parámetro SSC-A mide el área de dispersión lateral y se relaciona con la complejidad interna y la granularidad de las células. Las células con más estructuras internas complejas dispersarán más luz lateralmente. Los linfocitos vírgenes se caracterizan por tener pocos orgánulos, por lo que presentan valores de SSC-A bajos.

En este trabajo, se evalúa la activación de los linfocitos en diferentes condiciones (descritas en la sección de metodología y más adelante). Durante y después del proceso de activación (paso 3), varios linfocitos mueren. Por esta razón, es necesario distinguir entre los linfocitos vivos y los muertos en nuestro análisis, excluyendo únicamente a los que murieron. La población de linfocitos vivos es seleccionada para realizar los análisis posteriores.

8.3 Evaluación de la expresión de CD45RO⁺

La recolección de la muestra tras el alumbramiento y el corte del cordón umbilical requiere una manipulación cuidadosa para evitar que la sangre materna contamine la muestra de sangre del cordón umbilical. Para garantizar que esto no ocurra, se realiza una evaluación de la presencia de células T de memoria. Los recién nacidos no tienen células T

de memoria, ya que presentan un perfil de células vírgenes debido a su falta de exposición a antígenos ambientales.

El siguiente esquema muestra la evaluación de la pureza de la muestra en términos de la ausencia de células de memoria, medida por la fluorescencia de CD45RO, un marcador de células de memoria. Adicionalmente, se analizó la fluorescencia del marcador temprano de activación, CD69, para confirmar que las células no presentaran activación previa. Esta evaluación se basa en la estrategia de gating descrita anteriormente.

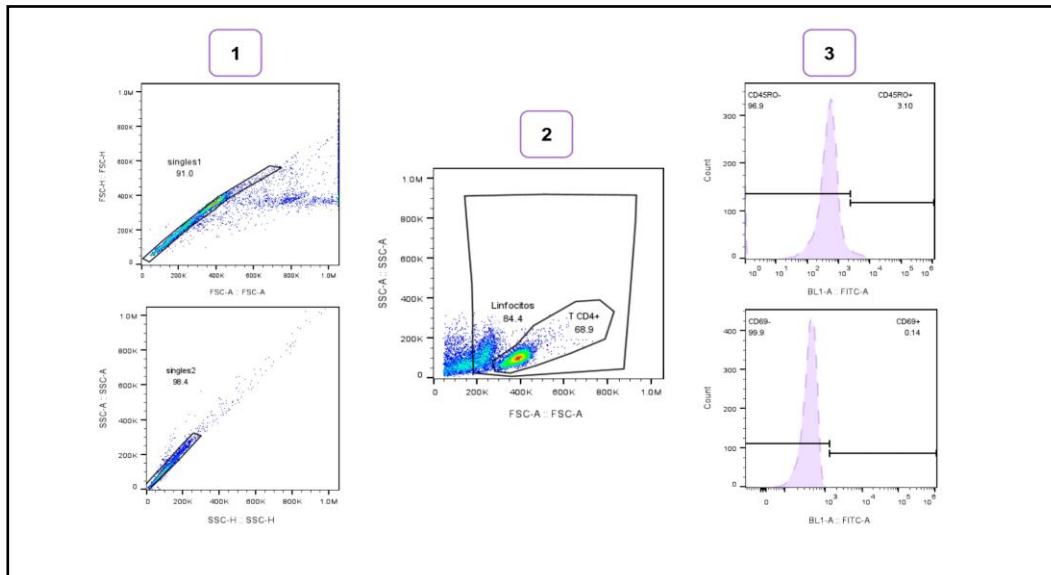


Figura 3: Estrategia de gating utilizada para validar la pureza de la muestra en términos de expresión de CD45RO⁺ (células de memoria) y CD69 (células activadas).
1) identificación de células individuales para excluir señales erróneas derivadas de agregados celulares, **2)** selección de la población global de linfocitos, y **3)** medición de la expresión de CD45RO en las muestras de sangre de cordón umbilical.

La muestra del neonato 1, nacido por cesárea y presentada en el histograma de la Figura 4a, corresponde a células mononucleares de sangre de cordón umbilical con baja fluorescencia en la expresión de CD45RO-FITC (fluorocromo fluoresceína-5-isotiocianato). En esta muestra, el 2.37% de las células fueron CD45RO⁺, mientras que el 97.6% correspondieron a células CD45RO⁻, lo que indica una población mayoritariamente libre de células T de memoria y, por ende, sin evidencia de contaminación por sangre materna.

En la segunda muestra, también de un neonato nacido por cesárea, se observó un 9.30% de células CD45RO⁺, lo cual se considera dentro de un rango bajo de expresión para este marcador. En contraste, el 88% de las células no expresó este marcador.

En la Figura 4b, se muestra el promedio de células CD45RO⁺ en cuatro muestras analizadas de neonatos nacidos por vía vaginal. La media se encuentra en un 2%, lo que sugiere que las muestras estuvieron libres de células de memoria.

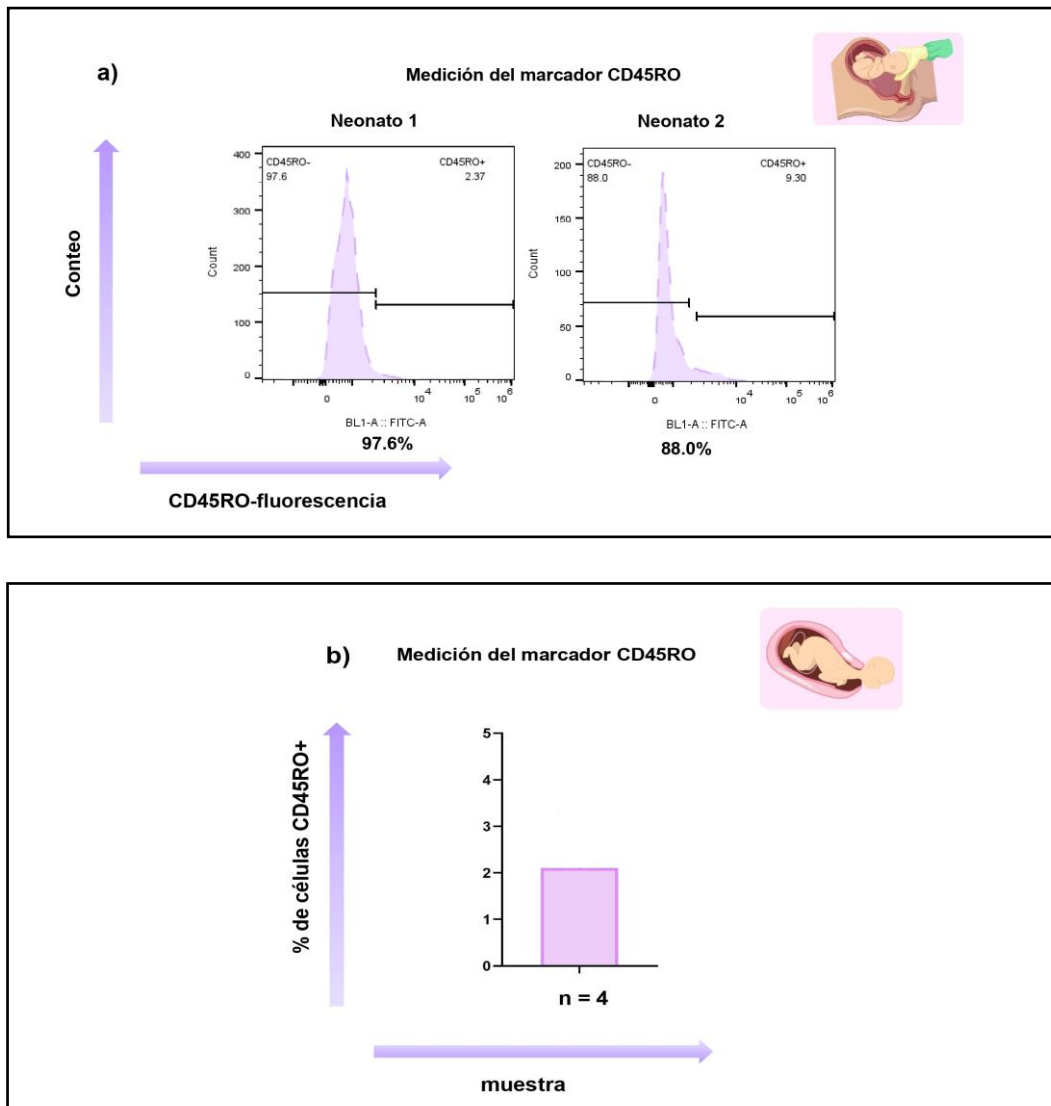


Figura 4: Evaluación de la pureza de la muestra en términos de expresión de CD45RO⁺. Medición de la expresión de CD45RO, marcador de células de memoria, en células mononucleares derivadas de sangre de cordón umbilical. **a)** Muestras de neonatos nacidos por cesárea (n = 2). **b)** media total de la pureza de las muestras parto vaginal (n = 4).

8.4 Evaluación de la pureza de células T CD4⁺

En este trabajo se evaluó la activación de los linfocitos T CD4⁺ bajo diferentes condiciones (descritas en la sección de metodología y más adelante). Para esta evaluación, fue necesario purificar estas células, separándolas del resto de las células mononucleadas

(como células T CD8⁺, células B, células NK y monocitos). Los dot plots siguientes (Figura 5) muestran el análisis realizado para determinar la pureza de la purificación de las células T CD4⁺. Esta evaluación se basa en la estrategia de gating descrita anteriormente.

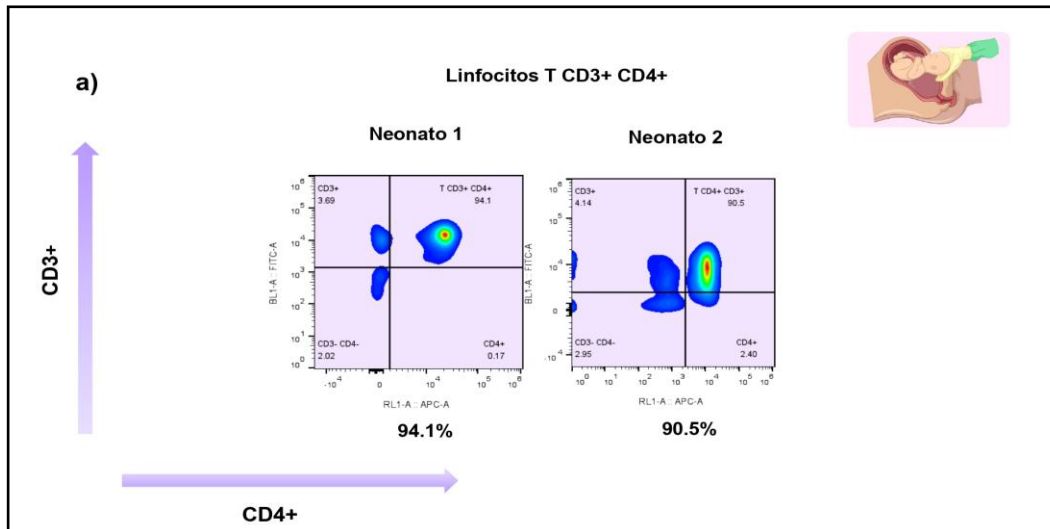


Figura 5: Evaluación de la pureza en términos de solo células T CD4⁺. Evaluación de la pureza en términos de solo células T CD4⁺, interpretada por la alta fluorescencia de la coexpresión de CD3⁺ y CD4⁺, marcadores que por forman parte del complejo de receptor de células T y definen a las células T cooperados, respectivamente. **a)** muestra de neonato nacido por cesárea.

Las purezas de las células T CD4⁺ de los donantes nacidos por cesárea se encuentran en la Figura 5a mediante un dot plot de cuatro cuadrantes. En el eje X se representa la fluorescencia de las células CD4⁺-APC (fluorocromo de alofococianina), mientras que en el eje Y se evalúa la fluorescencia de las células CD3⁺-FITC. Por lo tanto, las células T CD3⁺ CD4⁺ están localizadas en el segundo cuadrante, representando el 94.1% en el donante 1 y el 90.5% en el donante 2, mientras que las células que no expresaron ambos marcadores representaron el 5.88% y el 9.49%, respectivamente. Este alto porcentaje de células T CD3⁺ CD4⁺ indicaron una buena purificación.

8.5 Evaluación de la supervivencia de células T CD4⁺ bajo el suplemento de aminoácidos durante 72 h

Evaluar la supervivencia de nuestras células de interés fue un paso esencial para valorar el efecto de la suplementación sobre la activación y el perfil de citocinas de las células

T CD4⁺. Esta evaluación se realizó en condiciones de cultivo con concentraciones elevadas de metabolitos, como L-arginina o L-serina, aumentadas 5 y 10 veces en comparación con el medio control (descritas en la sección de metodología y más adelante). Esta evaluación también fue considerada para la elección de la concentración ideal de L-arginina y L-serina.

Para cada categoría establecida: Control; ARG + 5X y ARG + 10X (5 o 10 veces más concentrado); SER + 5X y SER + 10X (5 o 10 veces más concentrado), tanto en condiciones con estímulo (anti-CD3/anti-CD28 o SE) como sin estímulo (E), la supervivencia de las células T CD4⁺ se determinó mediante la exclusión de las células teñidas por el reactivo de viabilidad, el cual es permeable a través de la membrana de las células muertas (tinción descrita en la sección de metodología). Tras ajustar la estrategia de gating para la selección de células vivas, se graficó el porcentaje de estas células en el panel 6.

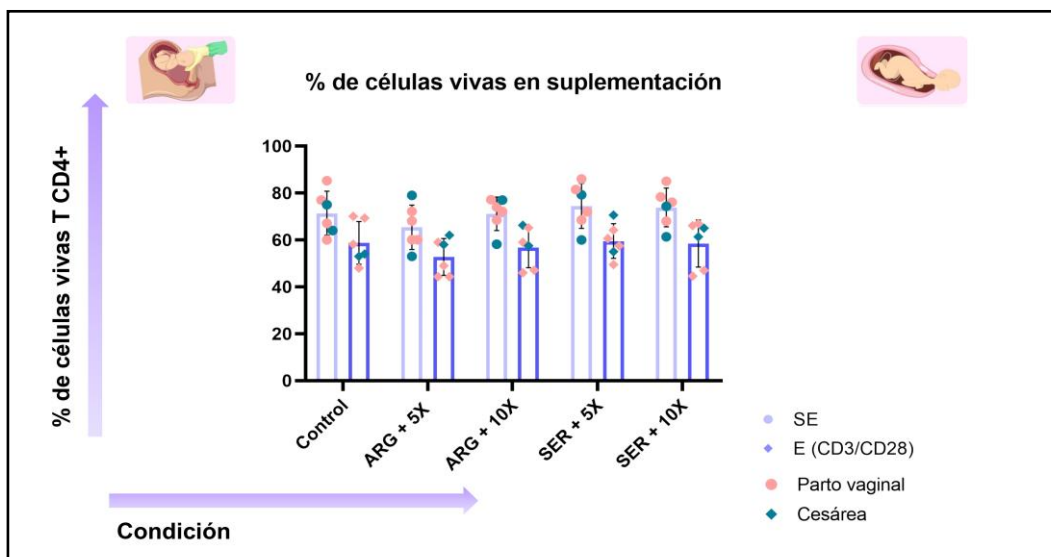


Figura 6: Porcentaje de células T CD4⁺ vivas. Porcentaje de células T CD4⁺ vivas tras de 72 horas de suplementación con L-arginina o L-serina en un medio con concentraciones de estos metabolitos aumentadas 5 y 10 veces más en comparación con el control. Las condiciones fueron definidas de la siguiente forma: Control; ARG + 5X; ARG + 10X; SER + 5X y SER + 10X. De cada condición se dividieron en sin estímulo o SE (barras morado-claro) y estimulada o E (CD3/CD28) (barras morado-intenso). Código de color rosa establecido para neonatos de vía vaginal, (n = 4) y azul establecido para neonatos de cesárea (n = 2).

En la Figura 6 se muestra el porcentaje de células T CD4⁺ viables tras ser activadas o no con anti-CD3/anti-CD28 en un medio con mayor o menor concentración de L-arginina o L-serina. El gráfico utiliza un código de color para distinguir las muestras: rosa para los neonatos nacidos por vía vaginal y azul para los neonatos nacidos por cesárea. Las barras de color morado tenue indican las células no estimuladas (SE) y las barras en morado intenso corresponden a las células estimuladas (E). El análisis mostró una supervivencia celular aproximada del 70% en las células T CD4⁺ no estimuladas y del 55% en las células que fueron activadas con anti-CD3/anti-CD28. Se observó una viabilidad ligeramente más estable en las células no estimuladas cultivadas en medio suplementado con L-arginina a una concentración diez veces mayor (ARG + 10X). A diferencia, las células que sí fueron estimuladas, la viabilidad más estable se registró en las que estuvieron en medio enriquecido con L-serina a una concentración cinco veces mayor (SER + 5X); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Las células T CD4⁺ viables de los neonatos nacidos por vía vaginal (rosa) mostraron una supervivencia comparable a la observada en las células de neonatos nacidos por cesárea (azul). En esta evaluación, la suplementación con aminoácidos ya sea con L-arginina o L-serina, no mostró un efecto significativo en la modulación de la viabilidad celular.

8.6 Evaluación de la activación de células T CD4⁺ suplementados con aminoácidos durante 72 h

Para determinar la concentración adecuada de L-arginina y L-serina, evaluamos la activación celular midiendo la expresión de CD69, un marcador temprano de activación y CD25 un indicador de proliferación inicial. Nuestro objetivo fue observar si las células T CD4⁺ se activan en mayor o menor medida en un medio con concentraciones elevadas de L-arginina o L-serina (5 o 10 veces más concentrado) en comparación con el control. Las células fueron estimuladas durante 72 horas con anti-CD3/anti-CD28, que simulan la estimulación celular *in vitro*, bajo los siguientes tratamientos: Control; ARG + 5X y ARG + 10X (5 o 10 veces más concentrado); SER + 5X y SER + 10X (5 o 10 veces más concentrado). Además, se incluyeron controles sin estimular que siguieron todo el procedimiento. Los linfocitos T activados se caracterizaron por ser CD4⁺CD69⁺ y

CD4⁺CD25⁺, el porcentaje de estos fue graficado como el porcentaje de cambio con respecto al control. Esta evaluación se basa en la estrategia de gating descrita anteriormente (esquema 7).

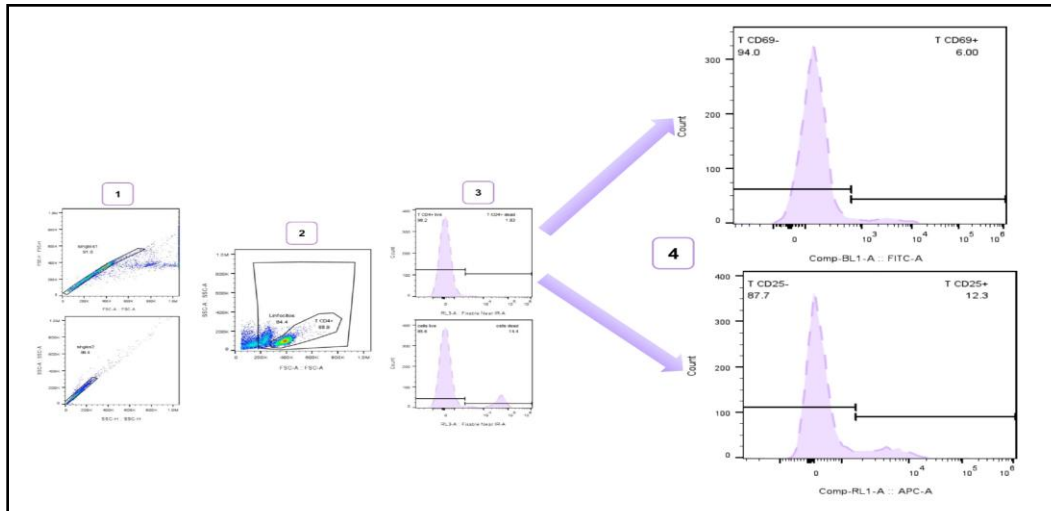


Figura 7: Estrategia de gating utilizada para la selección de la población de linfocitos T CD4⁺CD69⁺. El procedimiento incluye los siguientes pasos: **1)** identificación de células individuales para excluir señales erróneas originadas por agregados celulares, **2)** selección de la población global de linfocitos, **3)** delimitación de la región correspondiente al tamaño característico de los linfocitos activados, y **4)** selección específica de linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD4⁺CD25⁺

El panel 8a y 8b presentan el porcentaje de células T CD4⁺ activadas en un medio enriquecido con L-serina o L-arginina, en comparación con el control, después de la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. Estas células activadas se identificaron por la coexpresión de los marcadores moleculares CD4⁺CD69⁺ y CD4⁺CD25⁺, como se muestra en la figura 8a y 8b, respectivamente.

El gráfico utiliza un código de color para distinguir las muestras: rosa para los neonatos nacidos por vía vaginal y azul para los neonatos nacidos por cesárea. Las barras morado tenue indican las células no estimuladas (SE) y las barras en morado intenso corresponden a las células estimuladas (E). La cohorte de esta evaluación está compuesta por cuatro muestras de donantes nacidos por parto vaginal y dos muestras de donantes nacidos por cesárea.

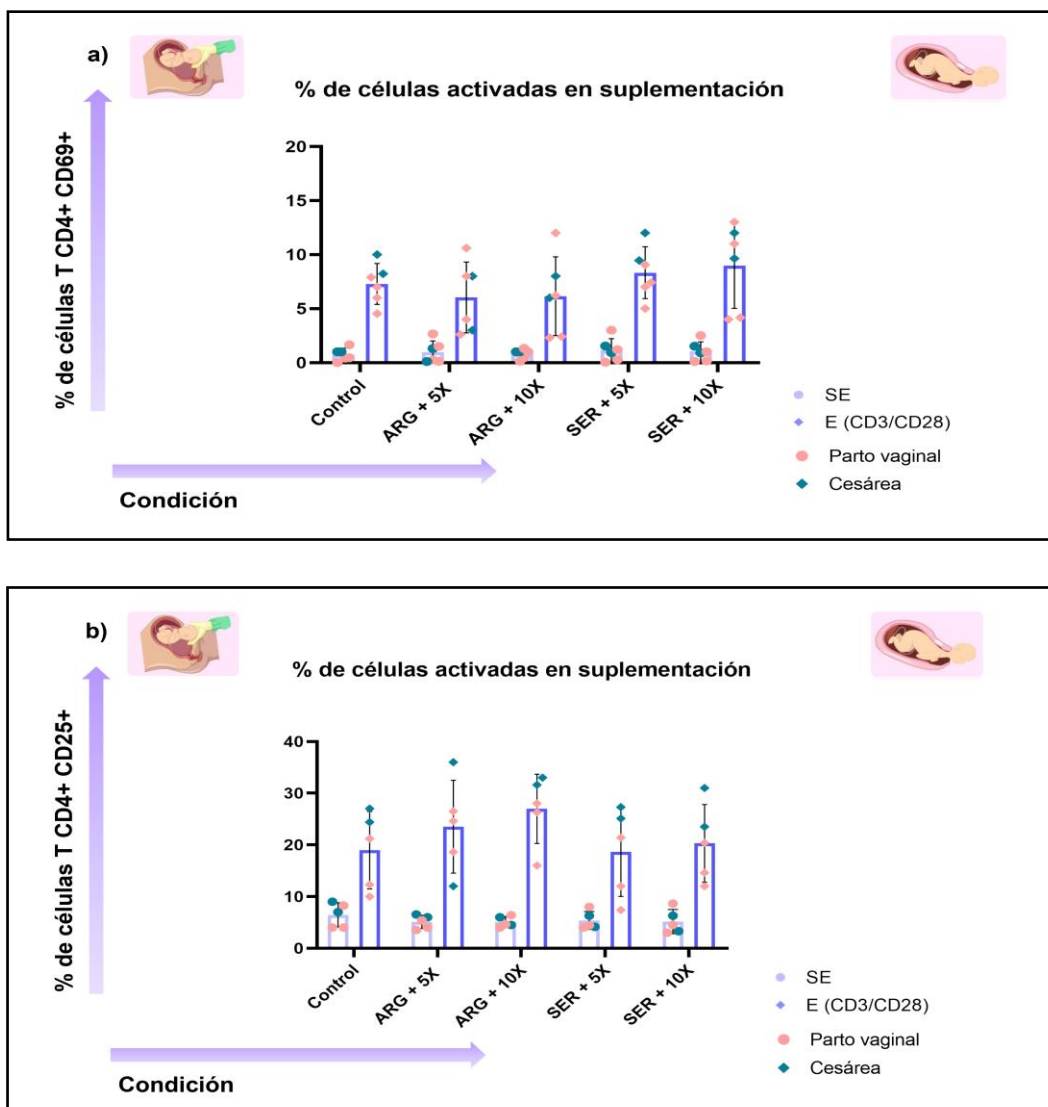


Figura 8: Porcentaje de células T CD4⁺ activadas. Se muestra el porcentaje de células T CD4⁺ activadas tras 72 horas de suplementación con L-arginina o L-serina en un medio con concentraciones de estos metabolitos aumentadas 5 y 10 veces en comparación con el control. Las células activadas se identificaron por la coexpresión de los marcadores, **a)** CD4⁺CD69⁺ y **b)** CD4⁺CD25⁺. Las condiciones se definieron de la siguiente manera: Control; ARG + 5X; ARG + 10X; SER + 5X; y SER + 10X. Cada condición fue dividida en

En la condición sin suplemento (basal) pero con estímulo (figura 8a-barra morado intenso), observamos un aumento de células T CD4⁺CD69⁺, siendo este incremento más marcado por células de donantes de cesárea. Este porcentaje se reduce casi a la mitad y se desequilibra bajo la suplementación de L-arginina (ARG + 5X) y aún más con una mayor concentración de L-arginina (ARG + 10X), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, la adición de L-serina, tanto a 5 veces más concentración como a 10 veces más, mostró una ligera tendencia en aumento en la

cantidad de células activadas frente al estímulo y en comparación con el control. La proporción de células T CD4⁺CD69⁺ fue más uniforme cultivadas bajo 5 veces más la concentración de L-serina respecto al control. Nuevamente el incremento fue más notorio por parte de las células de neonatos de cesárea.

Para sustentar la activación de nuestras células bajo las distintas condiciones: Control; ARG + 5X y ARG + 10X (5 o 10 veces más concentrado); SER + 5X y SER + 10X (5 o 10 veces más concentrado). Evaluamos la expresión de CD25, un marcador de proliferación temprana (gráfico 8b). Al igual que en la evaluación de CD69, las células fueron estimuladas durante 72 horas con anti-CD3/anti-CD28, un procedimiento que simula la estimulación celular *in vitro*. También se incluyeron controles sin estimulación que siguieron todo el procedimiento. Las células T activadas que expresaban CD25⁺ fueron identificadas como células T CD4⁺ CD25⁺, y el porcentaje de estas células se graficó como el porcentaje de cambio con respecto al control (Figura 7b).

Basado en el modo de nacimiento, los resultados mostraron una mayor generación de células T CD4⁺ CD25⁺ en las muestras de neonatos nacidos por cesárea. Este efecto fue particularmente evidente en las células estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 y, en menor medida, en aquellas no estimuladas. En un medio sin suplementación adicional de aminoácidos (Control), se observó un aumento en las células CD25⁺, incremento que fue superado en las condiciones con concentraciones más altas de L-arginina. En particular, la cantidad de células CD25⁺ fue mayor en la condición con 10 veces más concentración de L-arginina (L-ARG + 10X) en comparación con la de 5 veces más concentración (L-ARG + 5X). Con el suplemento de L-serina, se observó una tendencia de aumento comparable a la del control.

Por último, esta evaluación puede ser contemplada en la consideración para la estandarización de la concentración ideal de los aminoácidos escogidos: ARG + 5X vs ARG + 10X y SER + 5X vs SER 10X.

8.7 Evaluación de citocinas y moléculas de células T CD4⁺ suplementadas con aminoácidos durante 72 h

Para valorar la concentración adecuada de L-arginina y L-serina en relación con la actividad de los linfocitos T CD4⁺, nos centramos en su función principal: la secreción de citocinas en respuesta a la estimulación con anti-CD3/anti-CD28. Después de un período de 72 horas, recolectamos las citocinas del sobrenadante de las células sometidas a los siguientes tratamientos: Control; ARG + 5X y ARG + 10X (5 o 10 veces más concentrado); SER + 5X y SER + 10X (5 o 10 veces más concentrado). Asimismo, se recogieron los sobrenadantes de los controles sin estimular que siguieron todo el procedimiento (detalles en la sección de metodología). Las citocinas y moléculas medidas fueron agrupadas en diferentes perfiles: efector, innato y citotóxico (citocinas y moléculas mostradas en la tabla 1).

Perfil	Th1	Th2	Th17	Th22	Th9	Treg	IL-2
Efector	IFN- γ TNF- α IL-2	IL-4 IL-5 IL-6 IL-13	IL-17A IL-17F	IL-22	IL-9	IL-10 TGF- β	IL-2

Perfil	
innato	IL-7 IL-8 IL-1 β

Perfil	
citotóxico	Perforina y Granzima

Tabla 1: Perfiles de citocinas medidos bajo suplementación de L-arginina y L-serina.

8.7.1 Evaluación de la producción de citocinas efectoras

La cuantificación de citocinas efectoras se realizó a partir de seis sobrenadantes obtenidos de muestras neonatales: dos provenientes de nacimiento por cesárea y cuatro de nacimiento por parto vaginal (Figura 9).

El siguiente heatmap muestra el análisis de la expresión de citocinas efectoras liberadas por células T CD4⁺ neonatales, tras su activación *in vitro* mediante el entrecruzamiento de moléculas CD3 y CD28.

Para facilitar la interpretación, se empleó un código de color que distingue las muestras según el tipo de nacimiento: rosa para los neonatos nacidos por vía vaginal y azul para los nacidos por cesárea (indicados en la parte superior del eje X). En la parte inferior del eje X se muestran las condiciones experimentales agrupadas: E = Control; R5 = ARG + 5X; R10 = ARG + 10X; S5 = SER + 5X; y S10 = SER + 10X. En el eje Y se representa la expresión de las citocinas analizadas.

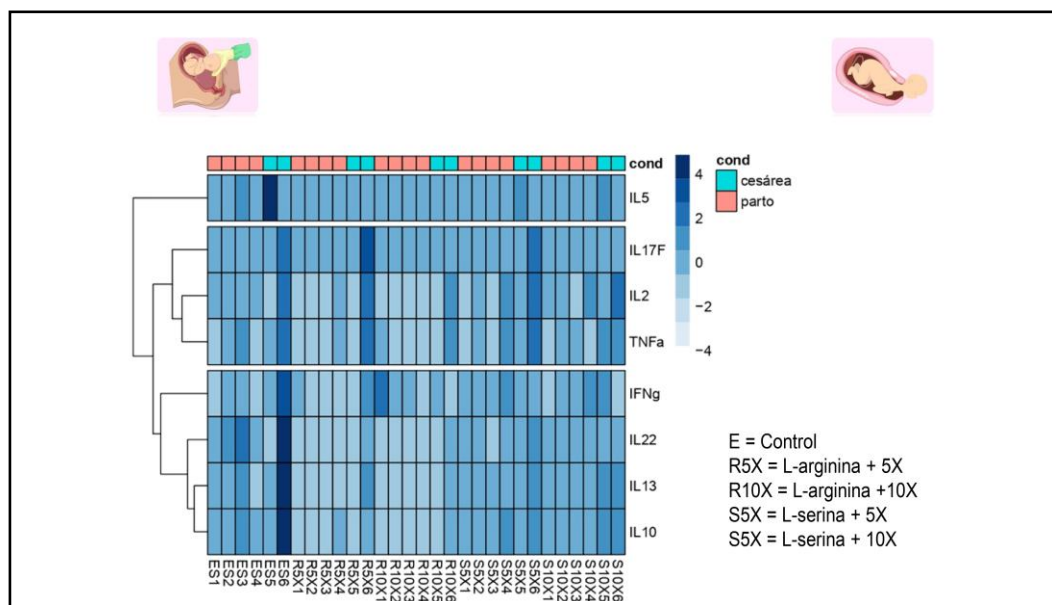
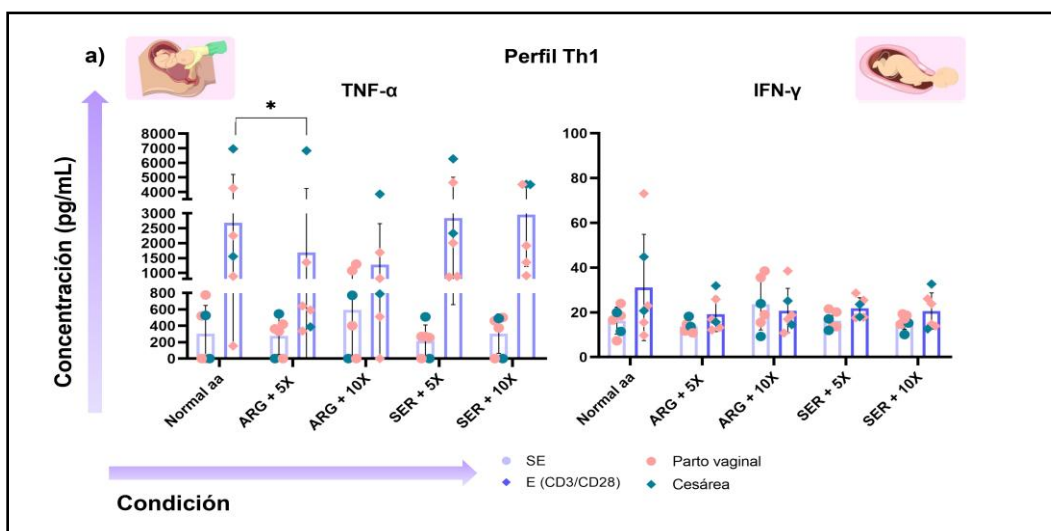


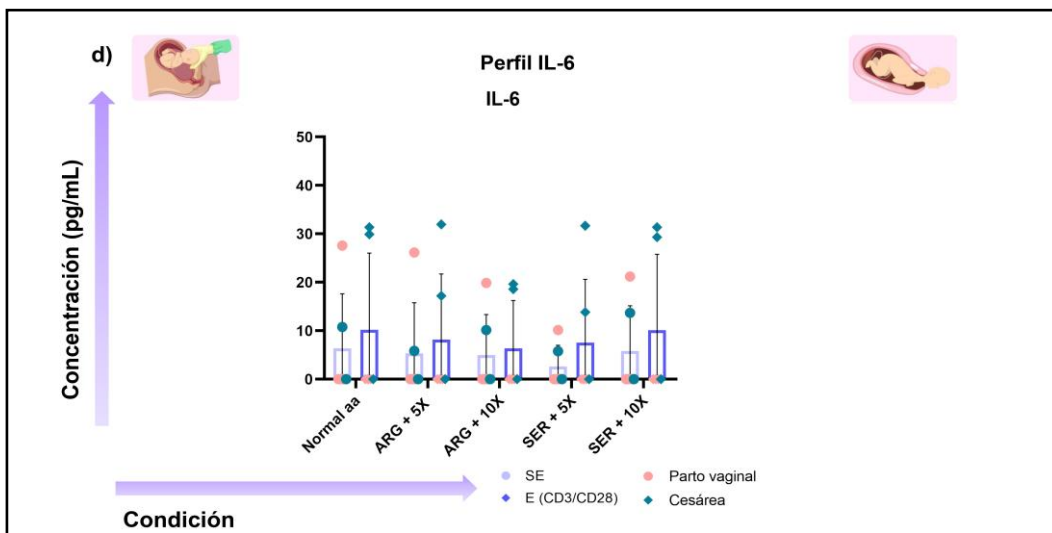
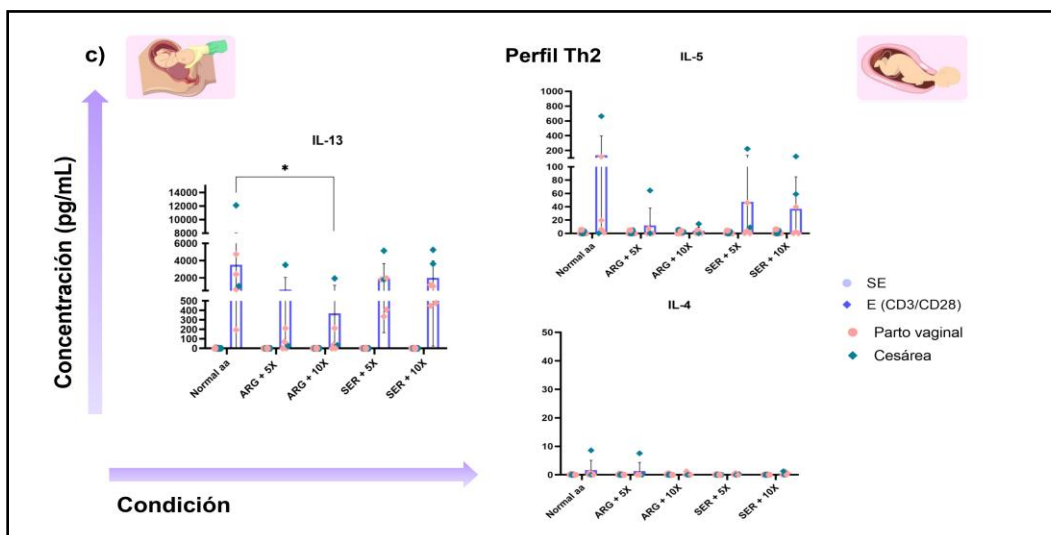
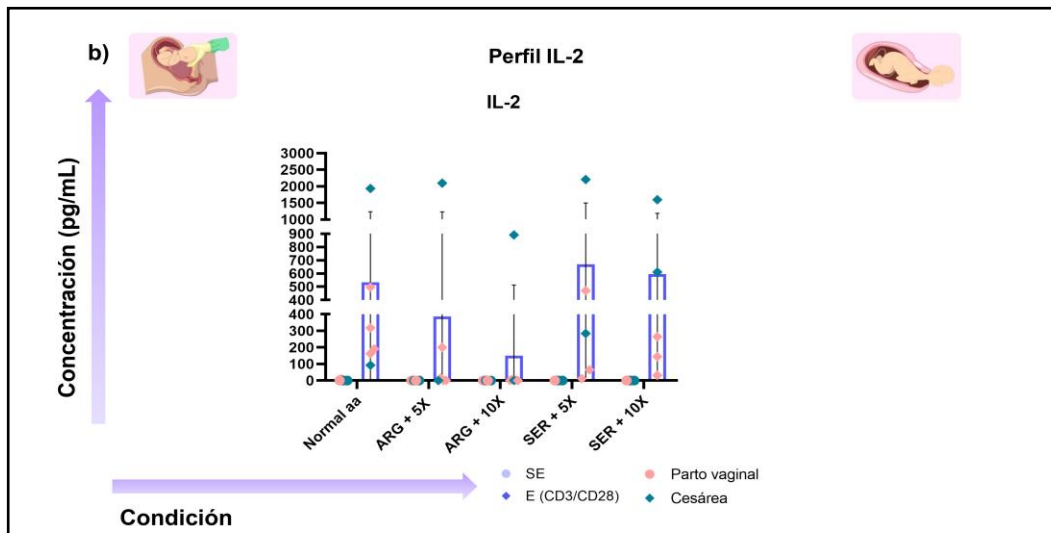
Figura 9: Expresión de citocinas efectoras secretadas bajo suplementación con L-arginina y L-serina. Se muestra la expresión de citocinas tras 72 horas de suplementación con L-arginina o L-serina en un medio con concentraciones de estos metabolitos aumentadas 5 y 10 veces en comparación con el control. Las condiciones para el mapa de calor se definieron de la siguiente manera: E = Control; R5 = ARG + 5X; R10 = ARG + 10X; S5X = SER + 5X; y S10X = SER + 10X. Las citocinas efectoras analizadas fueron: TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-13, IL-5, IL-17F, IL-22 e IL-10. Código de color rosa establecido para neonatos de vía vaginal, (n = 4) y azul establecido para neonatos de cesárea (n = 2).

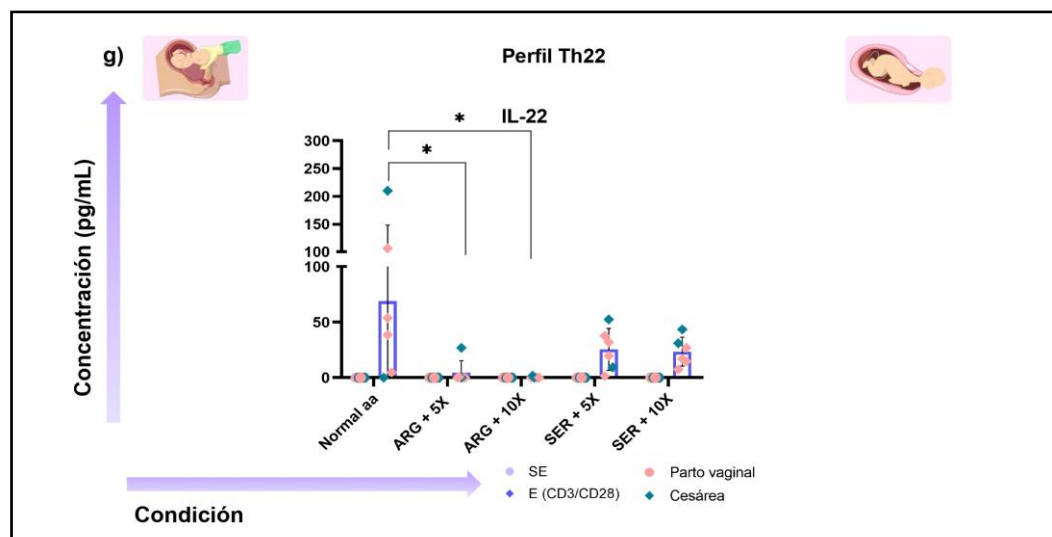
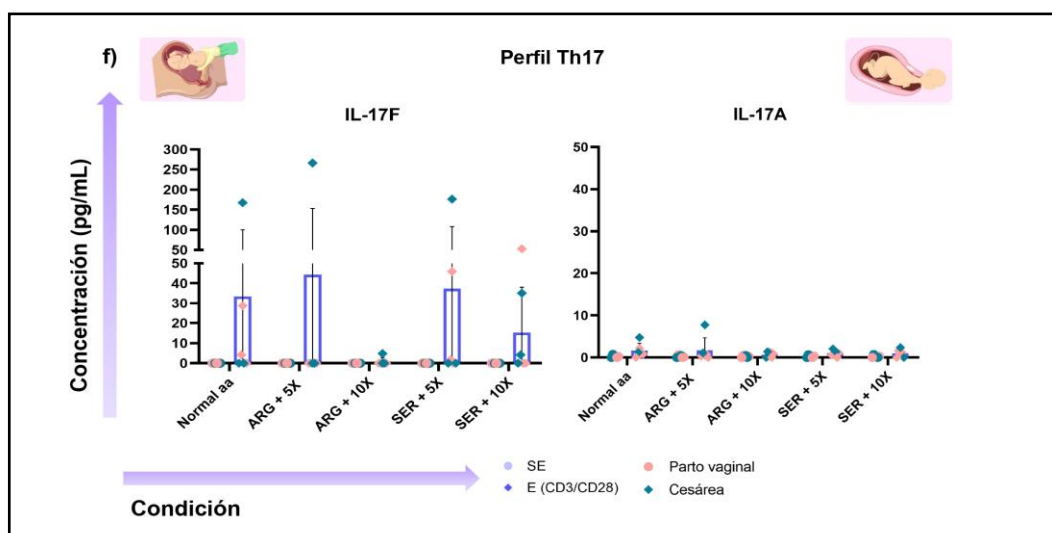
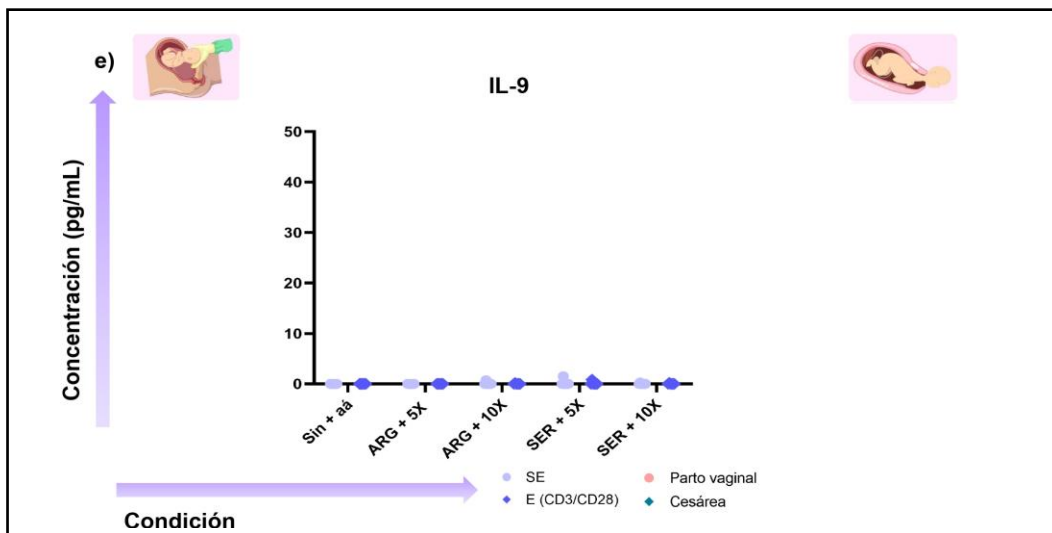
El análisis de la expresión de citocinas efectoras se interpretó a partir de la intensidad de la escala de color azul. En condiciones normales (E = Control), la mayoría de las citocinas se expresaron; sin embargo, una muestra de cesárea presentó una sobreexpresión generalizada en comparación con las demás y la otra muestra de cesárea mostró una alta producción de IL-5. Con el tratamiento de L-arginina, el efecto fue contrario (cuadro amarillo): la expresión de la mayoría de las citocinas disminuyó, aunque en algunas, como IFN- γ , una citocina característica del fenotipo Th1, mantuvieron su expresión, pero únicamente en la concentración máxima de este aminoácido (R10 = ARG + 10X). Este efecto de tipo supresor también se observó en la muestra de cesárea que, en estado basal, presentaba una sobreexpresión casi generalizada de citocinas.

En cuanto a la L-serina, su adición en distintas concentraciones (S5X = SER + 5X; y S10X = SER + 10X) reflejó una ligera disminución en la producción de algunas citocinas, mientras que en otras no se detectaron cambios con respecto al control, ni se apreciaron efectos tan marcados como el efecto tipo supresor del tratamiento de L-arginina.

Por último, la elección de este análisis como representación inicial fue para facilitar una visualización global de los cambios en la expresión de las citocinas evaluadas en las distintas condiciones experimentales. Esta aproximación permitió identificar patrones generales y sirvió como punto de partida para análisis más específicos y robustos, como la evaluación del efecto supresor de la L-arginina o los efectos particulares de la L-serina a nivel de cada fenotipo de las células T CD4⁺ neonatales. A continuación, se presentan los gráficos más detallados para cada una de las citocinas.







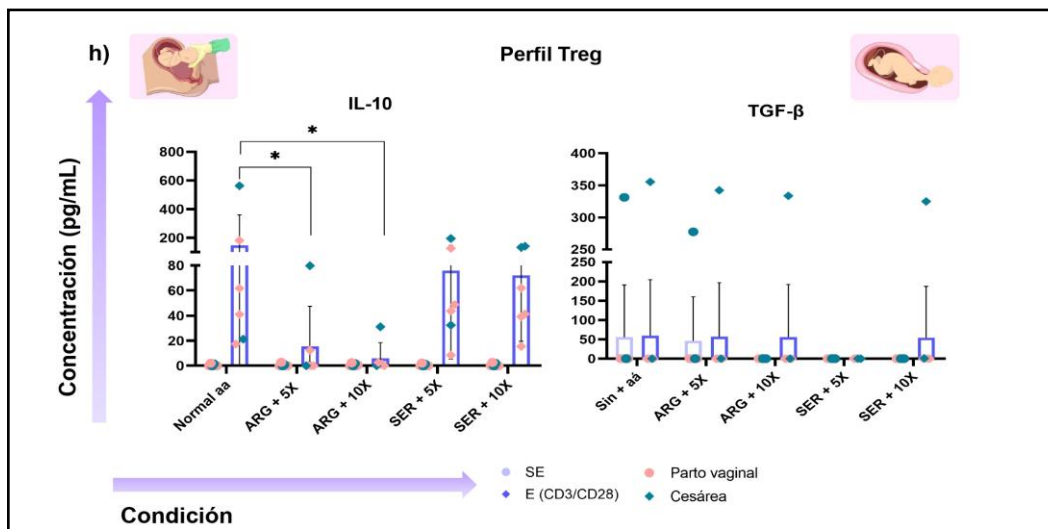


Figura 10: Cuantificación de citocinas efectoras secretadas bajo suplementación con L-arginina y L-serina. Se muestra la medición de citocinas tras 72 horas de suplementación con L-arginina o L-serina en un medio con concentraciones de estos metabolitos aumentadas 5 y 10 veces en comparación con el control. Las condiciones se definieron de la siguiente manera: Control; ARG + 5X; ARG + 10X; SER + 5X; y SER + 10X. Cada condición fue dividida en sin estímulo (SE, barras morado claro) y estimulada (E, barras morado intenso). **a)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th1. **b)** Medición de citocinas efectoras del perfil IL-2. **c)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th2. **d)** Medición de citocinas efectoras del perfil IL-6. **e)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th9. **f)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th17. **g)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th22 y **h)** Medición de citocinas efectoras del perfil Treg. Código de color rosa establecido para neonatos de vía vaginal, (n = 4) y azul establecido para neonatos de cesárea (n = 2).

La cuantificación de citocinas efectoras se realizó a partir de seis sobrenadantes obtenidos de muestras neonatales: dos provenientes de nacimiento por cesárea y cuatro de nacimiento por parto vaginal (Figura 10).

El gráfico utiliza un código de color para distinguir las muestras según el tipo de nacimiento: rosa para los neonatos nacidos por vía vaginal y azul para los nacidos por cesárea. Las barras morado tenue indican las células que no fueron estimuladas (SE) y las barras en morado intenso corresponden a las células que si fueron estimuladas (E).

En el perfil Th1, integrado en este análisis por TNF-α e IFN-γ, la producción de TNF-α en dos sobrenadantes: uno proveniente de un donante nacido por cesárea y otro de parto vaginal, mostraron una elevación más marcada en comparación con el resto de las muestras. Sin embargo, la concentración de IFN-γ medida fue similar en todas las condiciones evaluadas, aun después del estímulo (Figura 10a).

Los sobrenadantes de células T sin activar (barras morado tenue), mostraron una producción de TNF- α casi en las mismas cantidades en todas las condiciones probadas, con un ligero aumento de esta citocina en la condición ARG + 10X SE. En condiciones normales, es decir, sin la adición de aminoácidos suplementarios, los niveles de TNF- α alcanzaron una media de 3000 pg/mL frente al estímulo. Sin embargo, esta cantidad se redujo significativamente con el tratamiento de L-arginina, tanto en la condición con cinco veces (ARG + 5X) como con diez veces (ARG + 10X) su concentración, en comparación con el control. La producción de TNF- α mostró un patrón similar al del control bajo la suplementación de L-serina, tanto en la condición SER + 5X como a SER + 10X (gráfico 10a).

La concentración de IFN- γ oscilaba en valores menores a 70 pg/mL en las cinco condiciones. Además, en ausencia del estímulo, se detectaron niveles basales de IFN- γ en todas las muestras analizadas. Al observar el control notamos que fue la condición con un incremento ligeramente mayor de IFN- γ frente al estímulo, pero sin significancia estadística.

Por otro lado, la producción de IFN- γ fue más bajo una concentración más alta de L-arginina (ARG + 5X y ARG + 10X) con respecto al control. Este comportamiento también ocurrió en estado basal con el tratamiento de L-arginina. Para las condiciones con niveles más altos de L-serina (SER + 5X y SER + 10X) no se generó un efecto en la secreción de IFN- γ , ni siquiera tras la activación de las células (Figura 10a).

Finalmente, la cuantificación de citocinas del perfil Th1 de células T CD4⁺ neonatales permitió su detección en ausencia de estímulos de activación *in vitro* (anti-CD3 y anti-CD28), así como también en presencia de dichos estímulos. Este perfil se mantuvo incluso bajo el tratamiento con L-arginina, el cual ejerció un efecto supresor sobre la mayoría de las demás citocinas evaluadas, reduciéndolas a niveles casi indetectables (Figuras 10b-10g).

En cuanto al perfil de la interleucina 2 (IL-2), se observó nuevamente una disminución de esta citocina en los cultivos con L-arginina adicional, siendo más notorio en la concentración más alta (ARG + 10X). En caso contrario, la suplementación con L-serina

elevó los niveles de IL-2 en comparación con el otro aminoácido evaluado, alcanzando valores similares a los observados en la condición control.

Las citocinas correspondientes al fenotipo Th2 fueron: IL-13, IL-4 e IL-5 (Panel 10b), aunque IL-4 no fue detectada en ninguna de las condiciones establecidas.

La interleucina 13 (IL-13) se midió únicamente en las muestras sometidas a estímulo, observándose niveles más altos en la condición sin tratamiento (control). La producción de esta citocina con una adición mayor de L-serina fue comparable con respecto a la del control.

El aumento de L-arginina, tanto a 5 como a 10 veces su concentración, tuvo un efecto negativo en la producción de IL-13, cuya expresión en estas condiciones para la mayoría de las muestras fue casi completamente suprimida, con excepción de dos muestras, en las que también se observó una disminución clara, aunque menos marcada. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Por otro lado, la producción de IL-13 se mantuvo más estable en la condición con la mayor concentración de L-serina (SER + 10X), aunque sin superar los niveles observados en el control.

Por último, la cuantificación de citocinas del perfil Th2 de células T CD4⁺ neonatales fue parcialmente posible y únicamente en presencia de señales de activación *in vitro* (anti-CD3 y anti-CD28). Los sobrenadantes derivados de neonatos nacidos por cesárea presentaron mayores niveles de IL-13 que el resto de los sobrenadantes donados por neonatos nacidos por vía vaginal.

En la evaluación del perfil de interleucina 6 (IL-6), su producción se pudo evaluar únicamente en tres de seis sobrenadantes: dos provenientes de donantes nacidos por cesárea y uno de un neonato nacido por vía vaginal (gráfico 10d). En ausencia de estímulo la IL-6 fue detectable en los tres sobrenadantes y en todas las condiciones evaluadas, mientras que tras la activación con anti-CD3/CD28, la detección de esta citocina se limitó a las dos muestras de neonatos nacidos por cesárea.

De forma breve, el perfil Th9 no fue cuantificado en ninguna de las muestras analizadas (Panel 10e), lo que sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, las células T CD4⁺ neonatales no activan una respuesta Th9 funcional.

En el fenotipo Th17, conformado en este análisis por IL-17F e IL-17A, solo se logró detectar parcialmente, ya que únicamente IL-17F fue medida en dos sobrenadantes: uno de un donante nacido por cesárea y otro por parto vaginal. Esta citocina se detectó en casi todas las condiciones establecidas y sometidas al estímulo con anti-CD3 y anti-CD28, con la excepción de la concentración más alta de L-arginina (ARG + 10X), donde su producción fue completamente inhibida. No se observamos un patrón consistente en la producción de IL-17F, lo que resultó en una notable dispersión en los resultados.

En general la citocina IL-17A no fue detectada, la adición extra de L-arginina o L-serina no promovió su secreción. En conjunto, estos resultados sugieren que, en las condiciones probadas, las células T CD4⁺ neonatales no desarrollaron un perfil Th17 funcional (sección 10f).

Las células cultivadas en un medio normal (control) y retadas con el estímulo liberaron IL-22 (Fig. 10g). Esta liberación fue completamente suprimida por concentraciones más altas de L-arginina (ARG + 5X y ARG + 10X), alcanzando diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, la suplementación con L-serina también redujo los niveles de IL-22, aunque en menor medida y sin llegar a suprimirlos por completo, como ocurrió con L-arginina.

Como comentario final sobre el perfil Th22, observamos que las células T CD4⁺ neonatales de este estudio fueron capaces de responder al estímulo y producir IL-22 en condiciones normales, es decir, sin la adición de concentraciones suplementarias de L-arginina o L-serina.

En cuanto a la detección del fenotipo regulador (Treg), agrupado por IL-10 y TGF- β , se elevaron los niveles de IL-10 luego de la estimulación con anti-CD3/CD28, alcanzando concentraciones de entre 80 hasta 500 pg/mL en el medio sin suplementación de aminoácidos. No obstante, en un medio concentrado de L-arginina, la producción de IL-10 se vio casi completamente suprimida, tanto en ARG + 5X como ARG + 10X, con diferencias estadísticamente significativas para ambos casos. Asimismo, los

sobrenadantes provenientes de medios suplementados con L-serina también mostraron una disminución en los niveles de IL-10 en comparación con el control, aunque esta reducción fue leve y no significativa (Panel 10g).

En cambio, la medición de TGF- β solo fue posible en uno de los seis sobrenadantes analizados, correspondiente a un donante nacido por cesárea. Por lo tanto, no logramos observar un patrón consistente en la producción de TGF- β en el presente análisis.

Finalmente, la interleucina-10, característica del fenotipo T regulador y reportada de forma consistente en otros estudios en células T neonatales, su producción, al igual que la de los demás fenotipos efectores (con excepción del perfil Th1) fue suprimido por el tratamiento con L-arginina.

8.7.2 Evaluación de la producción de citocinas innatas

La cuantificación de citocinas innatas se realizó a partir de seis sobrenadantes obtenidos de muestras neonatales: dos provenientes de nacimiento por cesárea y cuatro de nacimiento por parto vaginal (Figura 11).

El gráfico utiliza un código de color para distinguir las muestras según el tipo de nacimiento: rosa para los neonatos nacidos por vía vaginal y azul para los nacidos por cesárea. Las barras morado tenue indican las células que no fueron estimuladas (SE) y las barras en morado intenso corresponden a las células que si fueron estimuladas (E).

El perfil de citocinas innatas integrado por IL-8, IL- β e IL-7, solo se logró detectar de manera parcial, ya que únicamente se pudo detectar la interleucina 8 (IL-8) en respuesta a la activación *in vitro* con anti-CD3 y anti-CD28 en todas las condiciones evaluadas (Esquema 11). No obstante, se observaron variaciones distinguibles en su concentración, posiblemente atribuibles a la suplementación con los aminoácidos, de forma similar a lo registrado con las citocinas efectoras.

El tratamiento con L-arginina modulo la producción de IL-8, reduciendo su cantidad a casi la mitad con respecto al control en ambas condiciones probadas (ARG + 5X y ARG + 10X), aunque esta disminución no fue lo suficientemente marcada como para alcanzar significancia estadística. Por el contrario, las condiciones suplementadas con L-serina

(SER + 5X y SER + 10X) mostraron una tendencia de aumento de esta citocina, pero sin diferencia significativa con respecto al control.

La cuantificación de citocinas innatas de células T CD4⁺ neonatales activo una respuesta sostenida de IL-8, incluso con los tratamientos con L-arginina y L-serina. En cambio, estas células no fueron capaces de producir IL-1 β ni IL-7, al menos en condiciones *in vitro* como las evaluadas en este estudio.

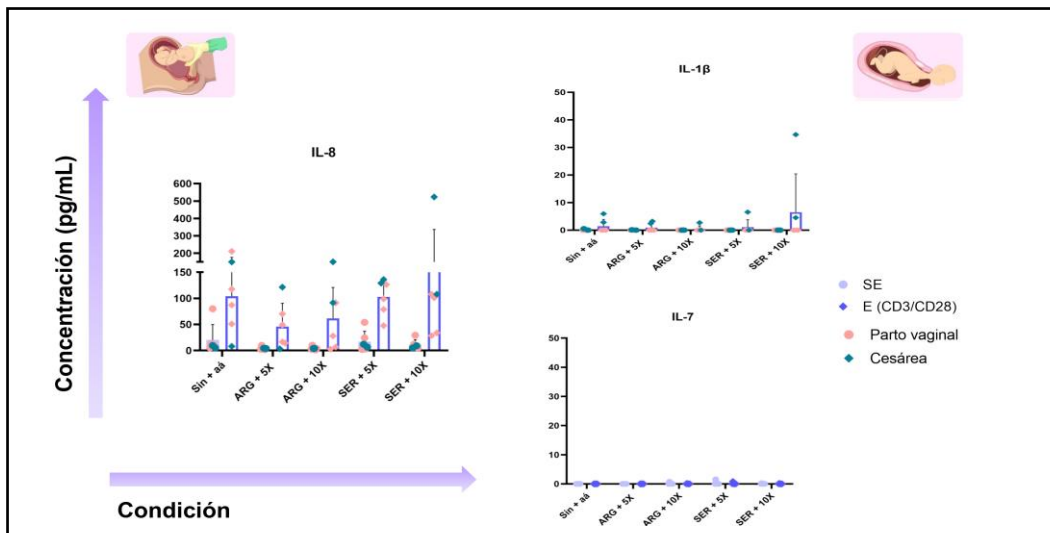


Figura 11: Cuantificación de citocinas innatas secretadas bajo suplementación con L-arginina y L-serina. Se muestra la medición de citocinas tras 72 horas de suplementación con L-arginina o L-serina en un medio con concentraciones de estos metabolitos aumentadas 5 y 10 veces en comparación con el control. Las condiciones se definieron de la siguiente manera: Control; ARG + 5X; ARG + 10X; SER + 5X; y SER + 10X. Cada condición fue dividida en sin estímulo (SE, barras morado-claro) y estimulada (E, barras morado-intenso). Medición de citocinas innatas: IL-8, IL- β e IL-7. Código de color rosa establecido para neonatos de vía vaginal, (n = 4) y azul establecido para neonatos de cesárea (n = 2).

8.7.3 Evaluación de la producción de moléculas citotóxicas

La cuantificación de moléculas citotóxicas se realizó a partir de seis sobrenadantes obtenidos de muestras neonatales: dos provenientes de nacimiento por cesárea y cuatro de nacimiento por parto vaginal (Figura 12).

El gráfico utiliza un código de color para distinguir las muestras según el tipo de nacimiento: rosa para los neonatos nacidos por vía vaginal y azul para los nacidos por cesárea.

Las barras morado tenue indican las células que no fueron estimuladas (SE) y las barras

en morado intenso corresponden a las células que si fueron estimuladas (E). Las moléculas citotóxicas evaluadas en este estudio fueron Granzima B y Perforina, las cuales fueron medidas en estados basales y activados. (Figura 13). Mientras que la expresión de granzima B tendió a aumentar en respuesta al estímulo con anti-CD3/CD28, la concentración de perforina se mantuvo relativamente constante, alrededor de 70 pg/mL, antes y después de la activación para todas las condiciones establecidas. En esta ocasión, la suplementación con L-arginina solo afectó levemente la generación de granzima B en comparación con el control, sin alcanzar diferencias significativas. Por su parte, la adición de L-serina promovió un aumento más estable en la concentración de granzima B, particularmente en la condición con 5 veces su concentración normal, pero este efecto tampoco resultó estadísticamente significativo.

Como comentario final sobre la evaluación de moléculas citotóxicas liberadas por células T CD4⁺ neonatales, se observa que estas células también presentan la expresión de moléculas citotóxicas tanto en estado basal como tras la activación, y que algunas moléculas, como la perforina, muestran una expresión particularmente estable.

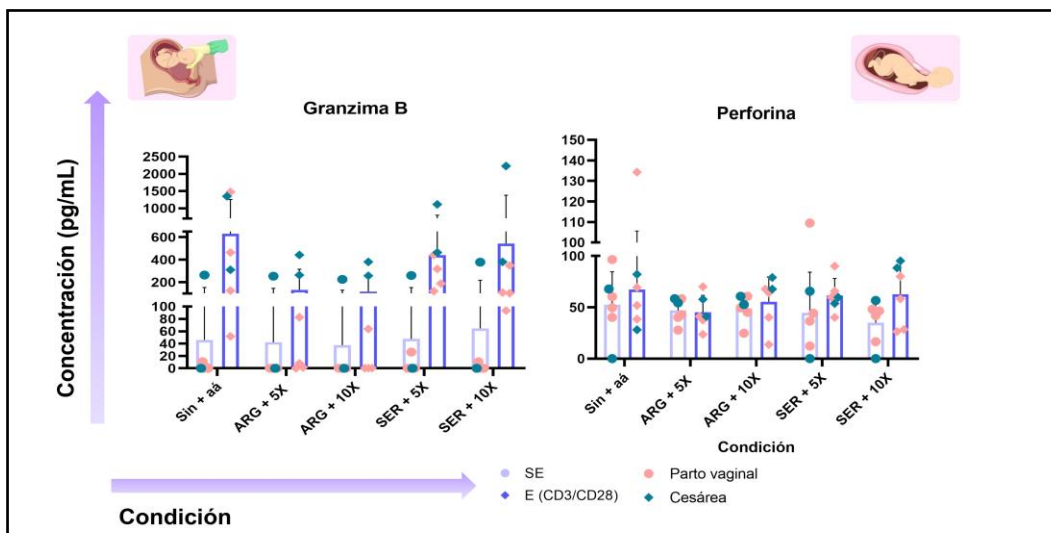


Figura 11: Cuantificación de moléculas citotóxicas secretadas bajo suplementación con L-arginina y L-serina. Se muestra la medición de citocinas tras 72 horas de suplementación con L-arginina o L-serina en un medio con concentraciones de estos metabolitos aumentadas 5 y 10 veces en comparación con el control. Las condiciones se definieron de la siguiente manera: Control; ARG + 5X; ARG + 10X; SER + 5X; y SER + 10X. Cada condición fue dividida en sin estímulo (SE, barras morado-claro) y estimulada (E, barras morado-intenso). Medición de moléculas citotóxicas: Granzima y Perforina. Código de color rosa establecido para neonatos de vía vaginal, (n = 4) y azul establecido para neonatos de cesárea (n = 2).

8.8 Evaluación del cambio en fenotipo efector de células T CD4⁺ suplementado con aminoácidos durante 72 h

Esta sección amplía el análisis de la producción de citocinas efectoras en un estado activado de las células T CD4⁺ neonatales, a través de un enfoque complementario que compara los cambios en los perfiles fenotípicos inducidos por la suplementación con una concentración diez veces mayor de L-arginina o L-serina, en relación con la condición control. La elección de esta concentración se basó en que fue la que tuvo más diferencias significativas en la expresión de las citocinas analizadas.

Los fenotipos efectores incluidos en este análisis fueron: Th1, Th2, Th17, Th22, IL-2 y Treg. En cambio, los perfiles Th9 e IL-6 fueron excluidos, ya que no se detectó producción de IL-9 en ninguna muestra y la expresión de IL-6 se registró únicamente en una muestra. Es importante señalar que el análisis se realizó considerando todas las muestras en conjunto, sin distinguir entre nacimientos por parto vaginal o por cesárea.

La producción de citocinas en la condición control fue establecida como el 100%, sirviendo como punto de referencia para normalizar los datos y evaluar los efectos relativos de la suplementación con L-arginina y L-serina. Esta condición correspondía a citocinas de células T CD4⁺ neonatales activadas y cultivadas en un medio con la concentración basal de aminoácidos, es decir, sin ningún enriquecimiento adicional.

Adicionalmente, el análisis presentado en la Figura 12, representado como un gráfico de radar, se construyó a partir de los valores de citocinas previamente normalizados con respecto a la condición control.

Para cada citocina, se calculó el promedio de su expresión relativa considerando todas las muestras. Posteriormente, estos promedios individuales se agruparon según el fenotipo efector correspondiente y se calculó un promedio global para cada fenotipo.

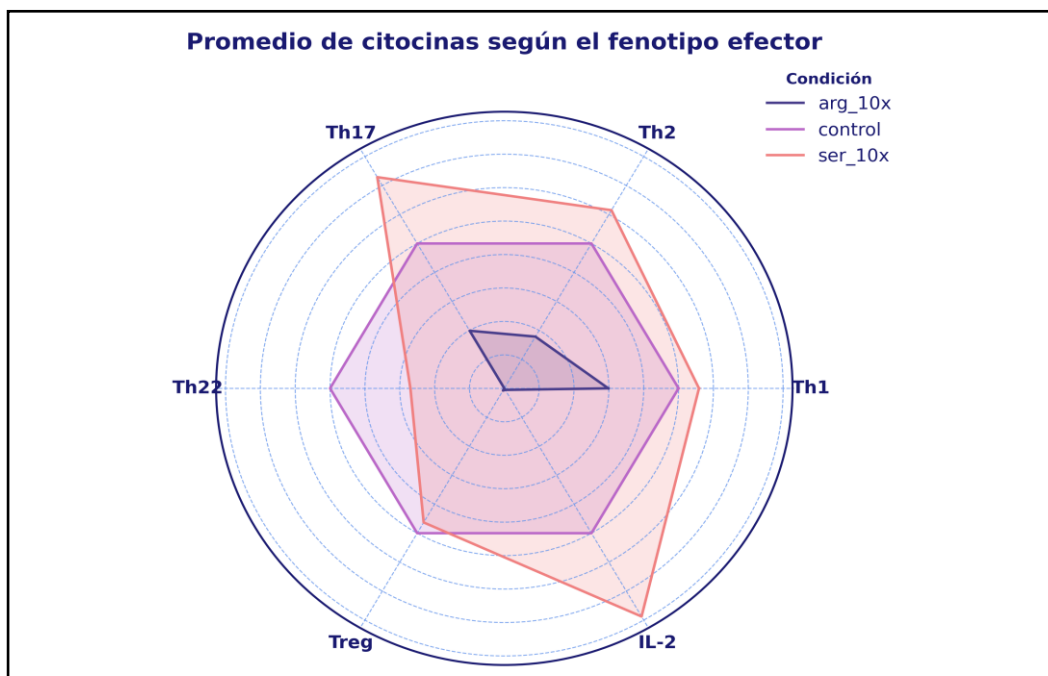


Figura 12: Evaluación del cambio en el fenotipo efector bajo la suplementación con L-arginina y L-serina. Enfoque complementario que compara los cambios en los perfiles fenotípicos inducidos por la suplementación con L-arginina y L-serina con respecto a la condición control. Los fenotipos efectores incluidos fueron: Th1, Th2, Th17, Th22, IL-2 y Treg. La producción de citocinas en la condición control fue establecida como el 100%. Código de color: violeta control; morado ARG + 10X y rosa SER + 10X. n = 5

La producción de citocinas efectoras por parte de las células cultivadas en un medio con la concentración basal de aminoácidos, sin suplementación adicional de L-arginina o L-serina, fue considerada como la producción natural de estas células en condiciones *in vitro*. Esta condición, correspondiente al control, fue utilizada como punto de referencia para el análisis comparativo y está representada por el área azul en el gráfico de radar.

En la condición control se midió la gran parte de las citocinas efectoras, con excepción de IL-6 e IL-9. Además, en la mayoría de los casos, esta condición presentó los niveles más altos de producción de citocinas en comparación con las condiciones suplementadas.

El medio suplementado con una concentración diez veces mayor de L-serina mostró un efecto ligeramente positivo hacía los perfiles efectores Th1 y Th2 en comparación con la condición control (área color violeta); sin embargo, al no alcanzarse significancia estadística en los análisis previos, dicho efecto no se consideró como un cambio relevante. Una tendencia similar, aunque más dirigida, se observó en la activación de los

perfiles Th17 e IL-2, aunque la falta de significancia estadística impidió determinar que la L-serina promueva una conversión fenotípica bajo estas condiciones. Asimismo, el tratamiento con la máxima concentración de L-serina tuvo un efecto negativo sobre el fenotipo efector Th22, y en menor medida, sobre el perfil T regulador (Treg), en comparación con el control.

A diferencia del análisis entre la condición control y la suplementación con L-serina, el análisis frente a L-arginina sí mostró diferencias estadísticamente significativas, lo que permite otorgar mayor confiabilidad a los efectos observados en esta última condición. La suplementación con L-arginina, particularmente en su concentración más alta (ARG + 10X), comprometió la activación de las respuestas efectoras. Según el gráfico de radar (área morada), los perfiles IL-2, Th22 y Treg fueron los más afectados negativamente bajo esta condición. En cuanto al resto de los grupos efectoras, Th1 logró mantenerse relativamente estable, seguido por Th17, mientras que Th2 fue el más reducido dentro de este grupo.

Finalmente, este análisis permitió visualizar de forma global el impacto de los aminoácidos seleccionados sobre la activación de las respuestas efectoras en células T CD4⁺ neonatales, así como inferir posibles patrones de respuesta bajo estas condiciones. En particular, la L-arginina mostró un comportamiento regulador negativo, atenuando la mayoría de los perfiles fenotípicos, aunque mantuvo parcialmente la actividad del grupo efector Th1.

8.9 Comparación del perfil de citocinas efectoras con base en el modo de nacer y la suplementación de aminoácidos

Esta última sección profundiza en la cuantificación de citocinas efectoras que fueron producidas tras la estimulación del entrecruzamiento de moléculas CD3 y CD28, diferenciando las respuestas inmunológicas según el tipo de parto: vaginal o cesárea.

La colaboración del Mtro. en Ciencias Carlos Ventura fue esencial para contar con un análisis más completo, realizado por él, que permitió comparar los perfiles de citocinas efectoras en función del modo de nacimiento (*artículo sometido*). Dicha contribución fue

especialmente importante ya que en este trabajo no se contaba con suficientes muestras de cesárea. En su análisis, el Mtro. Carlos incluyó tanto las muestras de cesárea como las de parto vaginal proporcionadas por mi y otros miembros del laboratorio ⁽³⁴⁾, lo que me permitió incluir su figura (Figura 12) en esta sección de resultados, dejando explícito que dicho análisis no fue realizado por mí.

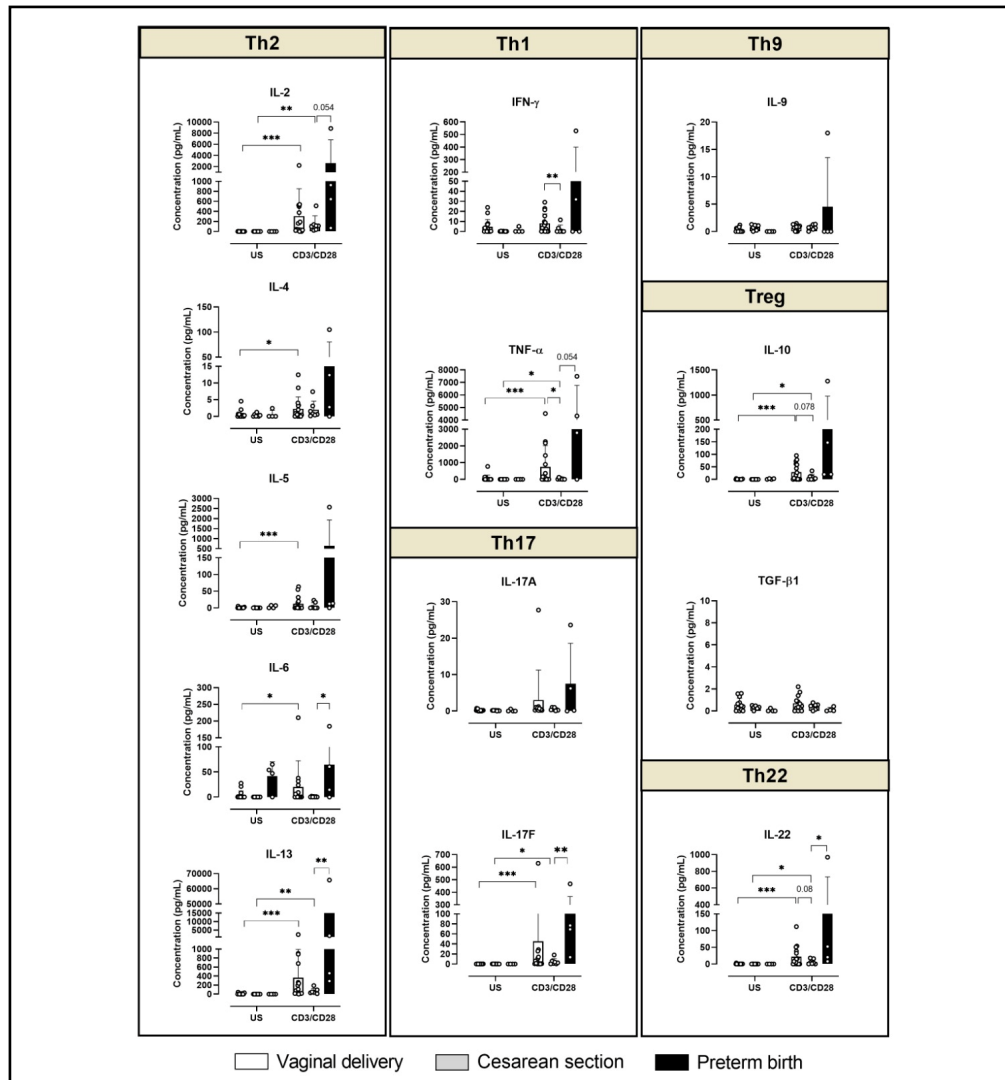


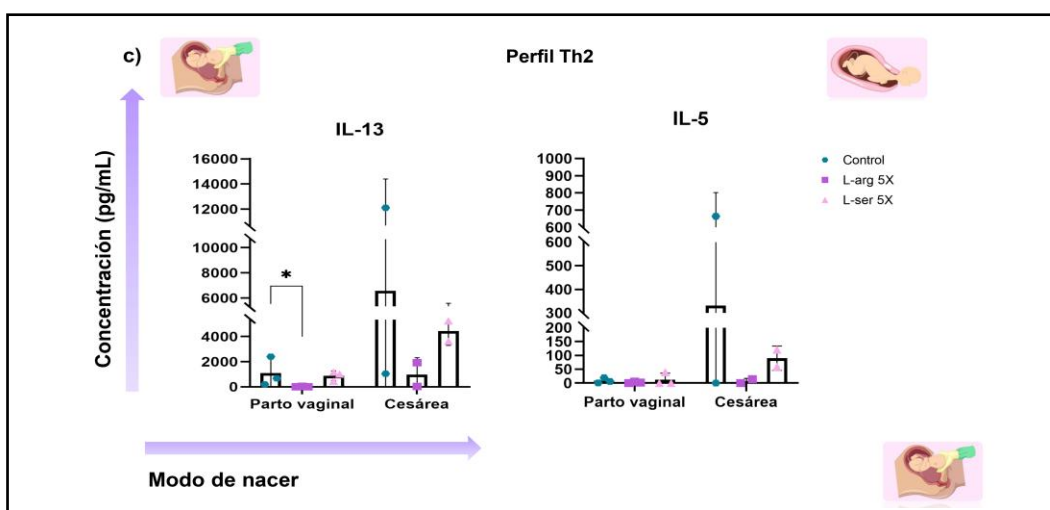
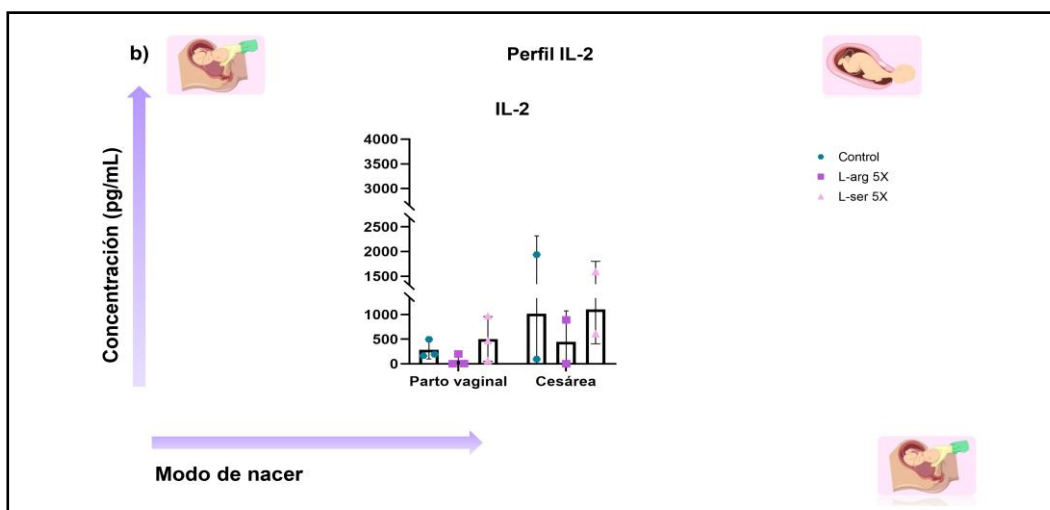
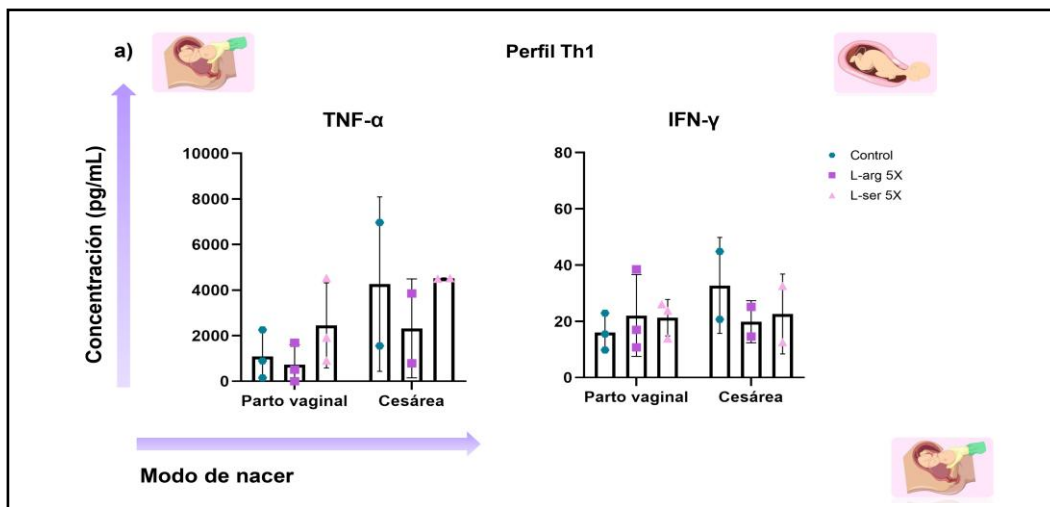
Figura 12: Cuantificación de citocinas efectoras secretadas en función del modo de nacimiento. Se muestra la medición de citocinas tras 72 horas de reposo (US) o de estimulación (CD3/28) con el entrecruzamiento de moléculas CD3 y CD28. Los sobrenadantes fueron separados por el modo de nacer del donante: nacimiento vaginal (barras-blancas, n = 16), cesárea (barras-gris, n = 7) y parto prematuro (barras-negro, n= 4). Las concentraciones de citocinas se utilizaron para el análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon para muestras emparejadas y la prueba U de Mann-Whitney para muestras no emparejadas. $P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$, $^{***}P < 0,001$ (Análisis realizado por el M. Ciencias Carlos Ventura; artículo sometido <https://www.biorxiv.org/content/10.64898/2026.02.21.707199v1>).

El propósito de mostrar el panel de citocinas efectoras de la figura 12 fue observar de manera global la capacidad que tienen las células T CD4⁺ neonatales para responder a través de la producción de citocinas cuando fueron sometidas a un enfrentamiento (CD3/CD28), en comparación a sin este enfrentamiento. Tomando en cuenta el diferente origen de estas células, ya fueran de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea, y finalmente, poder comparar el efecto de la suplementación de nuestros aminoácidos en función del modo de nacer.

En el análisis del Mtro. Carlos Ventura, el perfil Th1 agrupado por TNF- α e IFN- γ , únicamente IFN- γ fue medido en estado basal, que provenía de donantes de vía vaginal. Ante las señales de activación enviadas por anti-CD3 y anti-CD28, las células produjeron TNF- α e IFN- γ , pero en cantidades diferentes y mayores en aquellas que fueron de los neonatos nacidos por vía vaginal en comparación con los nacidos por cesárea, diferencia que resultó estadísticamente significativa.

El fenotipo Th2, representado en el panel de citocinas (fig. 12) por IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, solo fueron medidas en condiciones activadas. Así también, al hacer la distinción de la producción de estas acorde al modo de parto, se detectaron mayores concentraciones de este grupo de citocinas en los sobrenadantes de neonatos de parto vaginal, reflejando una tendencia de aumento respecto a la cantidad medida de citocinas de donantes de cesárea.

Los perfiles efectores Th1 y Th2 no solo fueron los únicos en presentar concentraciones más altas de sus citocinas en las muestras de neonatos nacidos por parto natural, y baja cantidad de estas en los neonatos de cesárea. Este patrón también fue reproducido para el resto de los perfiles registrados: Th17, Th22 y Treg.



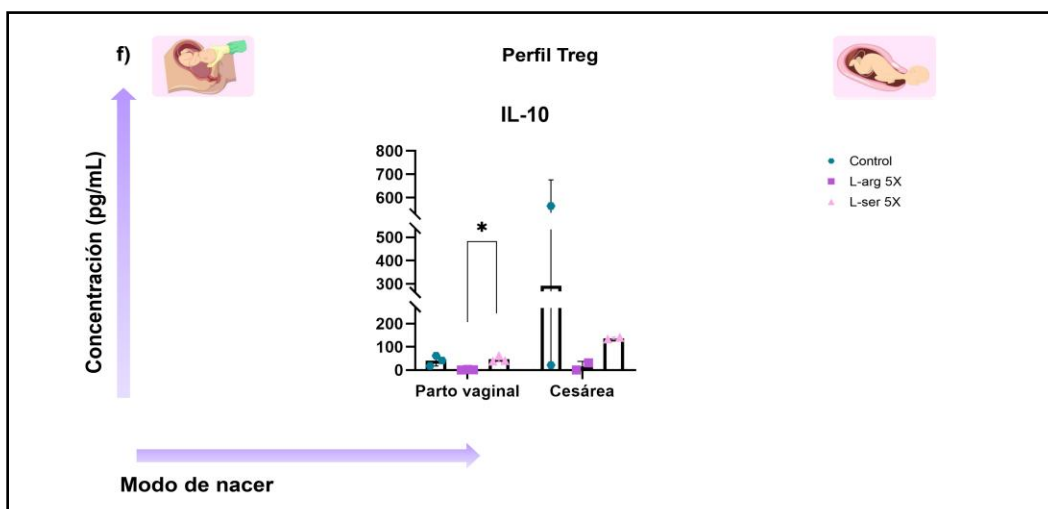


Figura 13: Cuantificación de citocinas efectoras secretadas en función del modo de nacer y la suplementación con aminoácidos. Se muestra la medición de citocinas tras 72 horas de suplementación con L-arginina o L-serina en un medio con concentraciones de estos metabolitos aumentadas 10 veces más en comparación con el control. Las condiciones se definieron de la siguiente manera: Control, color-azul; ARG + 10X, color-morado; y SER + 10X, color-rosa. **a)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th1. **b)** Medición de citocinas efectoras del perfil IL-2. **c)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th2. **d)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th17. **e)** Medición de citocinas efectoras del perfil Th22 y **f)** Medición de citocinas efectoras del perfil Treg. Los sobrenadantes fueron separados por el modo de nacer del donante: nacimiento vaginal (n = 3) y cesárea (n = 2)

Al examinar de forma completa el panel citocinas efectoras anterior, las condiciones experimentales consistieron en el reto inducido *in vitro* por las señales de anti-CD3 y anti-CD28. En dicho panel se refleja una mayor producción de citocinas provenientes de las células T CD4⁺ de parto vaginal, mientras que las células de neonatos de cesárea hicieron lo contrario, tuvieron una baja producción. Esta condición experimental en nuestro trabajo es equivalente a nuestra condición control (figura 13, color azul), el cual es comparado con los medios suplementados de L-arginina (color morado) o L-serina (color rosa) en una concentración diez veces mayor.

De forma separada, por modo de nacimiento: parto vaginal vs cesárea; el tratamiento con L-arginina volvió a revelar este efecto de clase supresor en la producción de citocinas de casi todos los perfiles efectoras, disminuyendo significativamente la proporción de IL-3 (del fenotipo Th2) e IL-10 (del fenotipo regulador), las cuales fueron medidas en los sobrenadantes de los donantes de vía vaginal, donde particularmente sus respuestas

tienden a ser más estables. En relación con este efecto supresor repetido, el tratamiento con este aminoácido volvió a mantener parcialmente la actividad del grupo efector Th1, principalmente de la expresión de IFN- γ , aunque no fue estadísticamente significativa.

Por último, debido al número limitado de muestras de cesárea que obtuvimos, no es posible afirmar que este efecto ocurra sin importar el origen de las muestras (parto vaginal o cesárea), aunque los datos sugieren que podría ser una posibilidad. Aún con esta limitación, si podemos validar que la suplementación con una alta concentración de L-arginina ejerce un efecto supresor que afecta las condiciones basales (medio con una concentración de estándar de aminoácidos y la estimulación mediada por el entrecruzamiento de moléculas CD3 y CD28).

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se llevó a cabo la estandarización de la suplementación de células T CD4⁺ neonatales con L-arginina y L-serina para evaluar su efecto sobre la supervivencia, activación y producción de citocinas. Se probaron concentraciones altas de L-arginina y L-serina, equivalentes a 5 y 10 veces más que la del medio *Roswell Park Memorial Institute* estándar. Las distintas concentraciones dieron lugar a los siguientes tratamientos experimentales: (Control, ARG + 5X, ARG + 10X, SER + 5X y SER + 10X), tanto con y sin estímulo de anti-CD3/CD28. Finalmente, las células fueron cultivadas durante 72 horas para permitir su activación y diferenciación.

Se procesaron un total de seis muestras, de las cuales dos correspondieron a neonatos nacidos por cesárea y cuatro a neonatos nacidos por parto vaginal. La supervivencia fue del 70 % sin estímulo y del 55 % con estimulación. En este escenario, la suplementación con L-arginina o L-serina no mostró un efecto significativo en la viabilidad de células T CD4⁺ comparado con el control. Sin embargo, la L-serina pareció mejorar ligeramente la viabilidad en condiciones sin estímulo. En cambio, bajo condiciones de estimulación, la supervivencia celular se vio comprometida, manteniéndose una proporción similar de células T CD4⁺ viables en todas las condiciones evaluadas.

Consideramos cuatro aspectos respecto a la viabilidad: primero, el ligero aumento de células T CD4⁺ vírgenes en concentraciones más altas de L-serina podría estar relacionado con el metabolismo de este aminoácido, ya que la L-serina proporciona glicina y unidades de un solo carbono esenciales para la biosíntesis de nucleótidos necesarios en la división celular ⁽⁹⁷⁾. Dado que estas células mantienen una proliferación homeostática baja, el efecto fue modesto. Así que es necesario más muestras y análisis específicos para confirmar esto.

En este trabajo, estudiamos a las células T neonatales, lo que constituye el segundo aspecto a considerar. Estas células siguen un programa de activación diferente al de las células T adultas. Se activan y proliferan rápidamente, priorizando respuestas inmediatas

pero transitorias, lo que interfiere con la generación de células de memoria ⁽¹¹²⁾. Como consecuencia, la proporción de células T CD4⁺ viables disminuyó en todas las condiciones evaluadas frente al antígeno.

Además, esperábamos completar el número de muestras de neonatos por cesárea, ya que, en nuestro grupo de trabajo, el proceso de proliferación celular ha sido estudiado a profundidad. En particular, el Mtro. en Ciencias Carlos Ventura ha demostrado previamente que las células T CD4⁺ de donantes nacidos por cesárea presentan un mayor número de divisiones celulares frente al estímulo, en comparación con las células de bebés nacidos por vía vaginal ⁽¹¹³⁾. Por ello, habría sido muy interesante confirmar o descartar si los aminoácidos seleccionados llegaban a regular este programa proliferativo distinto ya comprobado en las células T CD4⁺ de muestras de nacimientos por cesárea. Sin embargo, en *in vitro* no lo hicieron con las células derivadas de neonatos de parto vaginal, quizás a nivel *in vivo* pudiera ser diferente.

Finalmente, el último escenario considerado con especial atención en la interpretación de los ensayos posteriores fue la concentración utilizada de nuestros aminoácidos. Principalmente las concentraciones que fueron probadas con L-arginina donde se encontraron los cambios más notables. Si bien en la supervivencia los efectos no fueron evidentes, posiblemente porque fueron células T neonatales, la L-arginina es un nutriente determinante para que las células T proliferen o no. En estudios ya se ha monitoreado la actividad de las células T CD4⁺, en variaciones de disponibilidad de este aminoácido, incluyendo cuando se les priva. Estudios han señalado que dichas células son sensibles y precisas en la detección de L-arginina de su entorno, ya que no inician una proliferación si hay escasez de este aminoácido, pero sí lo hacen cuando hay una abundancia no tan drástica ⁽⁶³⁾ y dentro de un tiempo limitado ⁽¹¹⁴⁾. Las células T detectan L-arginina en las primeras 24 horas; en ese intervalo de tiempo de haber los niveles adecuados, sino estas células difícilmente proliferan ⁽¹¹⁴⁾. En nuestro caso, las concentraciones utilizadas pudieran considerarse como un excesivas, lo que podría sugerir que estas células también tienen un umbral máximo de detección para este aminoácido, y que, si logra superarse, podrían abstenerse de proliferar.

El tratamiento con L-arginina afectó la activación celular, mostrando una reducción en el número de células activadas en comparación con el control, aunque esta diferencia no

fue estadísticamente significativa. Por otro parte, la suplementación con L-serina mostró un ligero aumento en la proporción de células T CD4⁺ CD69⁺ respecto al control, más estable en la condición con una concentración cinco veces mayor de L-serina. La expresión de CD69⁺ parece, hasta ahora, estar más influenciada por las características intrínsecas de las células T CD4⁺ de cada neonato donante. Esto se observa porque, aunque la reducción de células T CD4⁺ CD69⁺ fue menor en niveles más altos de L-arginina, la cantidad sigue siendo variable entre los diferentes donantes, un patrón que también se refleja en el resto de las condiciones evaluadas.

La L-arginina disminuyó la activación de células T CD4⁺, aunque sin significancia estadística. Por otro lado, la L-serina promovió un ligero aumento de células CD69⁺, especialmente a 5X. Sin embargo, la expresión de CD69⁺ fue variable entre los donantes, sugiriendo que las características intrínsecas de las células T influyen más que la suplementación.

A continuación, nos interesamos en averiguar el papel inhibitorio de la L-arginina en la activación celular. Estudios anteriores han sugerido que niveles elevados de L-arginina pueden aumentar el número de células T reguladoras ⁽¹¹⁵⁾. Por esta razón, medimos el porcentaje de células T CD4⁺ CD25⁺, dado que las T reguladoras expresan la cadena alfa del receptor de IL-2, o CD25. El resultado de esta evaluación mostró un aumento claro de células T CD4⁺ CD25⁺ en las condiciones suplementadas con L-arginina, en comparación con el control. Sin embargo, en nuestra cuantificación de citocinas, la producción de IL-10, fue disminuida significativamente bajo este tratamiento. Concluyendo, que el suplemento con L-arginina no favorecía la generación de células T reguladoras funcionales que estuvieran suprimiendo la activación de las otras células efectoras.

Por esta razón, interpretamos la expresión de CD25⁺ en nuestra evaluación como un marcador temprano de proliferación celular, lo que nos llevó a reconsiderar a la L-arginina como un modulador cuya función puede ser positiva o negativa en función de su concentración.

Un aspecto adicional que vale la pena discutir, es el rol de otras células inmunológicas, como las presentadoras de antígeno, en el metabolismo compartido de la L-arginina.

Estudios previos muestran que estas células suministran L-arginina a las células T cuando los niveles son bajos, mientras que su ausencia impide un aprovechamiento eficiente de altas concentraciones ⁽¹¹⁶⁾. En neonatos, además, las células eritroides CD71⁺ expresan arginasa II, limitando la disponibilidad de L-arginina como parte de una regulación inmunológica ⁽¹¹⁷⁾.

En resumen, en nuestro modelo experimental, las células T CD4⁺ fueron: 1. de origen neonatal, 2. purificadas, sin la presencia de otras clases celulares, y 3. estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 en concentraciones altas de L-arginina. Por lo tanto, al integrar todos estos factores tratados, es posible que las células T CD4⁺, y particularmente las neonatales, requieran de la presencia de otras células para regular y utilizar apropiadamente ciertos metabolitos durante su activación, para este caso, la L-arginina en cantidades ricas.

Al realizar la medición de citocinas, partimos de un trabajo previo de cuantificación de citocinas efectoras en neonatos y adultos, realizado en nuestro laboratorio por el Mtro. en Ciencias Carlos Ventura. Este estudio mostró una menor producción de citocinas efectoras por parte de las células T CD4⁺ de neonatos en comparación con las células de adultos ^{(97) (100)}.

La adición de L-arginina atenuó la cantidad de varias de las citocinas medidas, hasta el punto de alcanzar significancia estadística. Esta clara reducción inducida por este metabolito capto nuestro interés por comprender la causa de este efecto de tipo supresor. Por ello, la discusión se centra desde el inicio en la L-arginina. Curiosamente, al analizar los seis fenotipos efectoras de manera global, el fenotipo Th1 fue el único que no resultó completamente suprimido con L-arginina. Incluso, la expresión de IFN- γ no se vio alterada, siendo comparable con el control.

El efecto regulador que mantiene la actividad del fenotipo Th1, parece ser de gran relevancia en el estudio del sistema inmune neonatal, ya que una de sus características, son las respuestas de tipo Th2 que predominan en las células T CD4⁺ sobre las respuestas de tipo Th1. Por lo tanto, esto nos podría sugerir que la L-arginina mueve este equilibrio, sosteniendo un perfil efector Th1.

Al considerar la concentración excesiva de L-arginina utilizada, proponemos que esta pudo inducir una reprogramación metabólica al desregular mTORC1, sensor principal de nutrientes que regula el crecimiento, proliferación y supervivencia celular ⁽¹⁰⁴⁾. Aunque la L-arginina promueve la activación mTORC1, su sobreestimulación podría desencadenar retroalimentación negativa o estrés celular, donde se activan vías como GCN2 ⁽¹¹⁸⁾. Al activarse, las células T cambian su metabolismo hacia una glucólisis anaeróbica, promovida por mTORC1 mediante la inducción de enzimas glucolíticas y del transportador Glut1 ⁽¹¹⁹⁾. Además, en nuestro laboratorio, la Dra. Linda Kempis identificó una sobreexpresión de genes de glucólisis aerobia en células T CD4⁺ neonatales, en estado basal y activado ⁽⁹⁷⁾. Por lo tanto, proponemos que las concentraciones elevadas de L-arginina podrían haber interferido con la coordinación metabólica mediada por mTORC1, desviando el metabolismo clásico de las células T activadas, especialmente en neonatos. Esta desviación podría estar relacionada con la baja producción de citocinas observada, y quizá también con la redirección del metabolismo hacia la síntesis de poliaminas vía ornitina ⁽¹²⁰⁾.

En esta última sección, agradecemos el análisis del Mtro. Carlos Ventura, el cual nos permitió identificar que la capacidad de producción de citocinas efectoras por parte de las células T CD4⁺ de los neonatos de cesárea es deficiente, tras ser comparadas con las células de neonatos nacidos por vía vaginal. Por lo tanto, aunque las células T CD4⁺ de neonatos de cesárea proliferan más, parecen tener una funcionalidad reducida, mientras que, las células T CD4⁺ de donantes nacidos por vía vaginal presentan una menor proliferación, pero son más estables y funcionalmente activas (artículo *en revisión*).

Por otro lado, en relación con este efecto supresor repetido, el tratamiento con L-arginina volvió a mantener parcialmente la actividad del grupo efector Th1, principalmente de la expresión de IFN- γ , aunque no fue estadísticamente significativa. En general, debido al número limitado de muestras de cesárea que obtuvimos, no es posible afirmar que este efecto ocurra sin importar el origen de las muestras (parto vaginal o cesárea). Aún con esta limitación, si podemos validar que la suplementación con una alta concentración de L-arginina ejerce un efecto supresor que afecta las condiciones basales (medio con una concentración de estándar de aminoácidos).

10. CONCLUSIÓN

En este estudio se logró la estandarización de las concentraciones de L-arginina y L-serina para suplementar células T CD4⁺ neonatales y evaluar su efecto en supervivencia, activación y producción de citocinas.

La L-arginina en concentraciones altas, redujo la activación y la producción de citocinas efectoras, mostrando un efecto supresor. Interesantemente, mantuvo parcialmente la actividad del fenotipo Th1, sin alterar la expresión de IFN- γ , incluso cuando la mayor parte de las citocinas fueron suprimidas.

Aunque L-arginina es un metabolito esencial para metabolismo de las células T, su impacto funcional depende no solo de la concentración, sino también del tipo de célula y origen (neonatal en este caso), el estado de activación y la composición del microambiente. Adicionalmente, se sugiere que las concentraciones altas de L-arginina podrían haber inducido una reprogramación metabólica en la desregulación de mTORC1, interfiriendo con la activación clásica y tal vez redirigiendo el metabolismo hacia la síntesis de poliaminas.

Finalmente, se requiere aumentar el número de muestras biológicas para poder realizar análisis estadísticos más robustos, debido a la alta dispersión de los datos. Esto nos permitiría determinar de manera más clara el efecto regulador de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la supervivencia, activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales.

Debido al reducido número de muestras y la alta dispersión de los datos, no podemos concluir claramente el efecto de la L-serina.

11. PERSPECTIVAS

El aumento del número de muestras podría ayudarnos a detectar el efecto de la L-serina en las células neonatales, que hasta este momento no fue claro. Especialmente en el caso de las muestras de cesárea.

Dado el efecto supresor de la producción de citocinas que muestra la L-Arginina en neonatos. Sería importante evaluar su papel en muestras de neonatos prematuros y de sepsis neonatal *in vitro*.

La suplementación con L-Arginina se podría probar en un modelo murino de sepsis neonatal u otras enfermedades inflamatorias neonatales, o incluso de adulto, para evaluar su potencial antiinflamatorio *in vivo*.

Debido a que se han reportado papeles pro-inflamatorios y antiinflamatorios para a estos aminoácidos, es importante que en los estudios subsecuentes se considere probar más de una concentración, para evaluar si el papel específico sobre el sistema inmune es dosis dependiente.

COMITE SINODAL

Comité Sinodal	Materias
Dr. Otoniel Rodríguez Jorge.	Examen profesional de grado.
Dra. Vanessa López Guerrero.	
Dr. Ismael Mancilla Herrera.	

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Sattler, S. (2017). The role of the immune system beyond the fight against infection. In T. Kennedy-Lydon & S. Sattler (Eds.), *The immunology of cardiovascular homeostasis and pathology* (Vol. 1003, pp. 3–14). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_1
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular* (8.^a ed.). Elsevier Saunders.
3. Santana, M. A., & Esquivel-Guadarrama, F. (2006). Cell biology of T cell activation and differentiation. *Revista de Investigación Clínica*, 58(6), 561–577.
4. Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our current understanding of a universal biological process. *Frontiers in Immunology*, 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
5. Thomas, D. C. (2017). Glycoprotein Gp91: An overview. *Immunology Letters*, 183, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.11.003>
6. Malech, H. L., DeLeo, F. R., & Quinn, M. T. (2019). The role of neutrophils in the immune system: An overview. En M. T. Quinn & F. R. DeLeo (Eds.), *Neutrophil* (Vol. 2087, pp. 3–10). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0154-9_1
7. Wechsler, M. E. (2021). Eosinophils in health and disease: A state-of-the-art review. *Cellular Immunology*, 360, 104253. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104253>
8. Choucair, K., Duff, J. R., Cassidy, C. S., Albrethsen, M. T., Kelso, J. D., Lenhard, A., Staats, H., Patel, R., Brunicardi, F. C., Dworkin, L., & Nemunaitis, J. (2019). Natural killer cells: A review of biology, therapeutic potential and challenges in treatment of solid tumors. *Future Oncology*, 15(26), 3053–3069. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0116>
9. Wu, S. Y., Fu, T., Jiang, Y. Z., & Shao, Z. M. (2020). Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, 19(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01238-x>
10. Zanna, M. Y., Yasmin, A. R., Omar, A. R., Arshad, S. S., Mariatulqabtiah, A. R., Nur-Fazila, S. H., & Mahiza, M. I. N. (2021). Review of dendritic cells, their role in clinical immunology, and distribution in various animal species. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8044. <https://doi.org/10.3390/ijms22158044>
11. Théry, C. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Seminars in Immunology*, 13(5), 239–248. <https://doi.org/10.1006/smim.2001.0347>
12. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular* (8.^a ed.). Elsevier Saunders.

13. Remick, B. C., Gaidt, M. M., & Vance, R. E. (2023). Effector-triggered immunity. *Annual Review of Immunology*, 41, 453–481. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101721-031732>
14. Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
15. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular* (8.^a ed.). Elsevier Saunders.
16. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular* (8.^a ed.). Elsevier Saunders.
17. Poe, J. C., & Tedder, T. F. (2012). CD22 and B lymphocyte function. *Current Opinion in Immunology*, 24(5), 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.001>
18. Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology* (9.^a ed.). Garland Science.
19. Poe, J. C., & Tedder, T. F. (2012). CD22 and B lymphocyte function. *Current Opinion in Immunology*, 24(5), 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.001>
20. Hoeks, C., Duran, G., Hellings, N., & Broux, B. (2022). When helpers go above and beyond: Development and characterization of cytotoxic CD4⁺ T cells. *Frontiers in Immunology*, 13, 951900.
21. Hoeks, C., Duran, G., Hellings, N., & Broux, B. (2022). When helpers go above and beyond: Development and characterization of cytotoxic CD4⁺ T cells. *Frontiers in Immunology*, 13, 951900. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.951900>
22. Hoeks, C., Duran, G., Hellings, N., & Broux, B. (2022). When helpers go above and beyond: Development and characterization of cytotoxic CD4⁺ T cells. *Frontiers in Immunology*, 13, 951900. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.951900>
23. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular* (8.^a ed.). Elsevier Saunders.
24. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 388–400. <https://doi.org/10.1038/nri3839>
25. Wik, J. A. (2022). T cell metabolism in infection. *Frontiers in Immunology*, 13, 840610. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840610>
26. Murphy, K. M., & Weaver, C. (2022). *Janeway's Immunobiology* (10th ed.). Garland Science.
27. Rosado-Sánchez, I. R., & Mendoza, J. L. (2024). Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, 14, 125–138. <https://doi.org/10.3389/fimmu>.

28. Quintana, A., Griesemer, D., Schwarz, E. C., & Hoth, M. (2005). Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 450(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00424-004-1364-4>
29. Ross, S. H., & Cantrell, D. A. (2018). Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 36, 411–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053352>
30. Gerriets, V. A., & Rathmell, J. C. (2012). Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends in Immunology*, 33(4), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.002>
31. Maciolek, J. A. (2014). Metabolism of activated T lymphocytes. *Immunology*, 142(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.008>
32. Yong, C. S., Abba Moussa, D., Cretenet, G., Kinet, S., Dardalhon, V., & Taylor, N. (2017). Metabolic orchestration of T lineage differentiation and function. *FEBS Letters*, 591(19), 3104–3118. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12849>
33. Gerriets, V. A., & Rathmell, J. C. (2012). Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends in Immunology*, 33(4), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.002>
34. Wik, J. A. (2022). T cell metabolism in infection. *Frontiers in Immunology*, 13, 840610. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840610>
35. Buck, M. D., O'Sullivan, D., & Pearce, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 110–120. <https://doi.org/10.1038/nri3783>
36. Wik, J. A. (2022). T cell metabolism in infection. *Frontiers in Immunology*, 13, 840610. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840610>
37. Gerriets, V. A., & Rathmell, J. C. (2012). Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends in Immunology*, 33(4), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.002>
38. Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews*, 238(1), 247–262. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x>
39. Thomas, F., Kalvakolanu, M. A., Collier, M. B., & Ley, M. J. (2007). Endotoxin-induced tolerance and the NF- κ B pathway: Role of repeated LPS exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(6), 1449–1458. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.11.015>
40. Pace, L., & Wenzel, J. (2020). Epigenetics of T cell fate decision. *Immunology*, 162(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.017>
41. Braun, M. Y., et al. (2021). The natural history of T cell metabolism. *Frontiers in Immunology*, 12, 679693. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.679693>

42. Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews*, 238(1), 247–262. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x>
43. Hoeks, C., Duran, G., Hellings, N., & Broux, B. (2022). When helpers go above and beyond: Development and characterization of cytotoxic CD4+ T cells. *Frontiers in Immunology*, 13, 951900. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.951900>
44. UNICEF. (2018). *Cada vida cuenta* (2.^a ed., Vols. 2–3). UNICEF.
45. Basha, S., Surendran, N., & Pichichero, M. (2014). Immune responses in neonates. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(9), 1171–1184. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.942288>
46. Debock, I., & Flamand, V. (2014). Unbalanced neonatal CD4(+) T-cell immunity. *Frontiers in Immunology*, 5, 393. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00393>
47. Hayakawa, S., Ohno, H., & Kobayashi, M. (2017). Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period. *Clinical & Experimental Immunology*, 190(2), 268–279. <https://doi.org/10.1111/cei.13008>
48. 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, 597433. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.597433>
49. Pieren, D. K. J., Boer, M. C., & de Wit, J. (2022). The adaptive immune system in early life: The shift makes it count. *Frontiers in Immunology*, 13, 1031924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031924>
50. Dockrell, H. M., & Butkeviciute, E. (2022). Can what we have learnt about BCG vaccination in the last 20 years help us to design a better tuberculosis vaccine? *Vaccine*, 40(11), 1525–1533. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.068>
51. Grindulis, H., Baynham, M. I., Scott, P. H., Thompson, R. A., & Wharton, B. A. (1984). Tuberculin response two years after BCG vaccination at birth. *Archives of Disease in Childhood*, 59(7), 614–619. <https://doi.org/10.1136/adc.59.7.614>
52. Puniya, B. L., Todd, R. G., Mohammed, A., Brown, D. M., Barberis, M., & Helikar, T. (2018). A mechanistic computational model reveals that plasticity of CD4+ T cell differentiation is a function of cytokine composition and dosage. *Frontiers in Physiology*, 9, 878. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00878>
53. Rudd, B. D. (2020). Neonatal T cells: A reinterpretation. *Annual Review of Immunology*, 38, 229–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-091319-083608>

54. Kempis-Calanis, L. A., Rodríguez-Jorge, O., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Ventura-Martínez, C. J., Spicuglia, S., Medina-Rivera, A., Thieffry, D., González, A., & Santana, M. A. (2023). Neonatal CD4+ T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with proliferation and yet a limited immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MA0622-083R>
55. Kempis-Calanis, L. A., Rodríguez-Jorge, O., et al. (2023). Unique characteristics of neonatal T cells. *Medical Research Archives*.
56. Rudd, B. D. (2020). Neonatal T cells: A reinterpretation. *Annual Review of Immunology*, 38, 229–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-091319-083608>
57. Galindo-Albarrán, A. O., López-Portales, Ó. H., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Rodríguez-Jorge, O., Sánchez Villanueva, J. A., Ramírez-Pliego, O., Bergon, A., Llorid, B., Holota, H., Imbert, J., Hernández-Mendoza, A., Ferrier, P., Carrillo-de Santa Pau, E., Valencia, A., Spicuglia, S., & Santana, M. A. (2016). CD8+ T cells from human neonates are biased toward an innate-immune-response. *Cell Reports*, 17, 2151–2160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.056>
58. Gutiérrez-Reyna, D. Y., et al. (2020). IL-12 signaling contributes to the reprogramming of neonatal CD8+ T cells. *Frontiers in Immunology*, 11, 600923. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600923>
59. Martin, J. N., Jr., & Rayburn, W. F. (2011). Normal labor and its duration. In C. Y. Cheng & J. K. R. et al. (Eds.), *Obstetrics: Normal and problem pregnancies* (6th ed., pp. 475–498).
60. Kiilerich, P., Cortes, R., Lausten-Thomsen, U., Borbye-Lorenzen, N., Holmgaard, S., & Skogstrand, K. (2021). Delivery modality affects neonatal levels of inflammation, stress, and growth factors. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 709765. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.709765>
61. Cho, C. E., & Norman, M. (2013). Cesarean section and development of the immune system in the offspring. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(4), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.08.009>
62. Lay, C., Chu, C. W., Purbojati, R. W., Acerbi, E., Drautz-Moses, D. I., de Sessions, P. F., Jie, S., Ho, E., Kok, Y. J., Bi, X., Chen, S., Mak, S. Y., Chua, M. C., Goh, A. E. N., Chiang, W. C., Rao, R., Chaithongwongwatthana, S., Khemapech, N., Chongsrisawat, V., Martin, R., JULIUS Study Group, Roeselers, G., Ho, Y. S., Hibberd, M. L., Schuster, S. C., & Knol, J. (2021). A synbiotic intervention modulates meta-omics signatures of gut redox potential and acidity in elective caesarean born infants. *BMC Microbiology*, 21(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02230-1>

63. Cho, C. E., & Norman, M. (2013). Cesarean section and development of the immune system in the offspring. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(4), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.08.009>
64. Liu, Y., Sun, K., Gan, Y., Liu, H., Yu, J., Xu, W., Zhang, L., & Chen, D. (2023). RNA-sequencing reveals gene expression and pathway signatures in umbilical cord blood affected by birth delivery mode. *Phenomics*, 3(3), 228–242. <https://doi.org/10.1007/s43657-022-00086-7>
65. Martínez, C. J. V. (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 (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
66. Maloy, S. (2013). Amino acids. En S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 108–110). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00051-6>
67. Maloy, S. (2013). Amino acids. En S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 108–110). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00051-6>
68. Li, P., Yin, Y.-L., Li, D., Kim, S. W., & Wu, G. (2007). Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 237–252. <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>
69. Torres, N., Tobón-Cornejo, S., Velazquez-Villegas, L. A., Noriega, L. G., Alemán-Escondrillas, G., & Tovar, A. R. (2023). Amino acid catabolism: An overlooked area of metabolism. *Nutrients*, 15(15), 3378. <https://doi.org/10.3390/nu15153378>
70. Torres, N., Tobón-Cornejo, S., Velazquez-Villegas, L. A., Noriega, L. G., Alemán-Escondrillas, G., & Tovar, A. R. (2023). Amino acid catabolism: An overlooked area of metabolism. *Nutrients*, 15(15), 3378. <https://doi.org/10.3390/nu15153378>
71. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). Garland Science.
72. Torres, N., Tobón-Cornejo, S., Velazquez-Villegas, L. A., Noriega, L. G., Alemán-Escondrillas, G., & Tovar, A. R. (2023). Amino acid catabolism: An overlooked area of metabolism. *Nutrients*, 15(15), 3378. <https://doi.org/10.3390/nu15153378>
73. Wu, G. (2023). Amino acid metabolism in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 158. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01463-7>
74. Escondrillas, G., & Tovar, A. R. (2023). Amino acid catabolism: An overlooked area of metabolism. *Nutrients*, 15(15), 3378. <https://doi.org/10.3390/nu15153378>

75. Holdsworth, S. R., & Wynn, J. L. (2020). Amino acids and immune metabolism: Reallocating to battle infection. *Nature Reviews Immunology*, 20(4), 233–247. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0263-8>
76. Buck, M. D., O'Sullivan, D., & Pearce, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(9), 1345–1360. <https://doi.org/10.1084/jem.20151159>
77. Raynor, J. L., & Chi, H. (2024). Nutrients: Signal 4 in T cell immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 221(3), e20221839. <https://doi.org/10.1084/jem.20221839>
78. Wang, P., Zhang, Q., Tan, L., Xu, Y., Xie, X., & Zhao, Y. (2020). The regulatory effects of mTOR complexes in the differentiation and function of CD4⁺ T cell subsets. *Journal of Immunology Research*, 2020, Article 3406032. <https://doi.org/10.1155/2020/3406032>
79. Tomé, D. (2021). Amino acid metabolism and signalling pathways: potential targets in the control of infection and immunity. *Nutr. Diabetes* 11. <https://doi.org/10.1038/s41387-021-00164-1>
80. Van de Velde, L.-A., Guo, X.-J., Barbaric, L., Smith, A. M., Oguin III, T. H., Thomas, P. G., & Murray, P. J. (2016). Stress kinase GCN2 controls the proliferative fitness and trafficking of cytotoxic T cells independent of environmental amino acid sensing. *Cell Reports*, 17(9), 2247–2258. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.079>
81. Raman, P., Rao, A. J., & Diamond, M. P. (2019). Arginine supplementation in pregnancy: Potential to prevent preeclampsia and improve fetal outcomes. *Advances in Nutrition*, 10(5), 765–777. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz044>
82. Stein, T. P., Schluter, M. D., & Schluter, M. (2014). Arginine supplementation for improving maternal and neonatal outcomes in hypertensive disorders of pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 15(4), 515–525. <https://doi.org/10.1177/1470320313517566>
83. Van Goudoever, J. B., Heird, W. C., & Schanler, R. J. (2013). Free amino acids in human milk: A potential role for glutamine and glutamate in neonatal development. *Journal of Nutrition*, 143(5), 1977S–1982S. <https://doi.org/10.3945/jn.112.171013>
84. Zhang, Y., Li, X., Wang, J., & Chen, Y. (2022). Arginine metabolism in immune cells: Regulation and therapeutic perspectives. *Frontiers in Immunology*, 13, 972994. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972994>
85. Smith, J. A., & Reynolds, A. J. (2022). Cationic amino acid transporter-2 (CAT-2) induction regulates arginine metabolism during macrophage activation. *Journal of Immunology*, 209(7), 1200–1212. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200012>

86. O'Neill, L. A. J., & Artyomov, M. N. (2021). Immunometabolism of arginine in macrophage polarization. *Cell*, 184(12), 3049–3063. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.028>
87. Geiger, R., Rieckmann, J. C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., Zamboni, N., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2016). L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell*, 167(3), 829–842.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>
88. Yu HR, Hsu TY, Tsai CC, Huang HC, Cheng HH, Lai YJ, Lin YJ, Chen CC, Li SC, Yang K. (2021). The Functional DNA Methylation Signatures Relevant to Altered Immune Response of Neonatal T Cells with L-Arginine Supplementation. *Nutrients*. 13;13(8):2780. doi: 10.3390/nu13082780.
89. Rynor, J. L., & Chi, H. (2024). Nutrients: Signal 4 in T cell immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 221(3), e20221839. <https://doi.org/10.1084/jem.20221839>
90. Wang, Z., Luo, C., Zhao, M., Zhang, M., & Tang, Y. (2022). Changes in amino acid profiles in human breast milk during lactation: Implications for infant nutrition. *Nutrients*, 14(7), 1357. <https://doi.org/10.3390/nu14071357>
91. Holeček, M. (2022). Serine metabolism in health and disease and as a conditionally essential amino acid. *Nutrients*, 14(9), 1987. <https://doi.org/10.3390/nu14091987>
92. Fuchs, B. C., & Bode, B. P. (2021). Amino acid transporters ASCT1 and ASCT2: Functional and regulatory aspects in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 24(1), 64–70. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000693>
93. Liu, Y., & Zhang, J. (2020). The role of serine metabolism in tumor progression and immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, 10, 1509. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01509>
94. Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metabolism*, 25(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>
95. Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., & Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.004>
96. Ma EH, Bantug G, Griss T, Condotta S, Johnson RM, Samborska B, Mainolfi N, Suri V, Guak H, Balmer ML, Verway MJ, Raissi TC, Tsui H, Boukhaled G, Henriques da Costa S, Frezza C, Krawczyk CM, Friedman A, Manfredi M, Richer MJ, Hess C, Jones RG. (2017). Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metab*. 7;25(2):482. doi: 10.1016/j.cmet.2017.01.014.
97. Kempis-Calanis LA, Rodríguez-Jorge O, Gutiérrez-Reyna DY, Ventura-Martínez CJ, Spicuglia S, Medina-Rivera A, Thieffry D, González A, Santana MA. Neonatal CD4+ T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with

- proliferation and yet a limited immune response. *J Leukoc Biol.* 2024 Jun 28;116(1):64-76. doi: 10.1093/jleuko/qiad162. PMID: 38146769.
98. Kempis, L. (2021). Análisis Transcriptómico de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos humanos a nivel basal y activados en presencia o ausencia de flagelina (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
 99. Ventura-Martínez, C. J., Kempis-Calanis, L. A., Mijares-Guevara, S., Cedillo-Baños, A., Carreón-Cortés, I. Y., Vázquez Rodríguez, S., Helguera-Repetto, A. C., Irlles, C., Spicuglia, S., Rodríguez-Jorge, O., & Santana, M. A. (2026). Premature birth and cesarean section affect neonatal CD4⁺ T cell gene expression and cellular function. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.64898/2026.02.21.707199>
 100. Martínez, C. J. V. (2026). Estudio integrativo de la activación de los linfocitos T neonatales (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
 101. Martínez, C. J. V. (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 (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
 102. Buck, M. D., O'Sullivan, D., & Pearce, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 110-120. <https://doi.org/10.1038/nri3783>
 103. Martí i Líndez, AA., Reith, W. (2021). Arginine-dependent immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 5303–5324. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>
 104. Wu, Q., Chen, X., Li, J., & Sun, S. (2020). Serine and metabolism regulation: A novel mechanism in antitumor immunity and senescence. *Aging and Disease*, 11(6), 1640–1653. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0314>
 105. Buck, M. D., O'Sullivan, D., & Pearce, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 110-120. <https://doi.org/10.1038/nri3783>
 106. Churchill Livingstone. Secretaría de Salud. (2020). Subsistema de información sobre nacimientos (Sinac): Registro de cesáreas. Secretaría de Salud.
 107. Livingstone. Secretaría de Salud. (2020). Subsistema de información sobre nacimientos (Sinac): Registro de cesáreas. Secretaría de Salud.
 108. Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J. A., & Rivera-Dommarco, J. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
 109. Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J. A., & Rivera-Dommarco, J.

- (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
110. Cho, C. E., & Norman, M. (2013). Cesarean section and development of the immune system in the offspring. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(4), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.08.009>
 111. UNICEF. (2023) Cada vida cuenta (2.^a ed., Vols. 2–3). UNICEF.
 112. Rudd, B. D. (2020). Neonatal T cells: A reinterpretation. *Annual Review of Immunology*, 38, 229–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-091319-083608>
 113. Martínez, C. J. V. (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 (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
 114. Crowther, R. R., Schmidt, S. M., Lange, S. M., McKell, M. C., Robillard, M. C., Zhao, J., Haffey, W. D., Wyder, M. A., Greis, K. D., Setchell, K. D. R., & Qualls, J. E. (2022). Cutting edge: L-arginine transfer from antigen-presenting cells sustains CD4⁺ T cell viability and proliferation. *Journal of Immunology*, 208(4), 793–798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.21006552>
 115. Yu, H.-R., Tsai, C.-C., Chang, L.-S., Huang, H.-H., Cheng, H.-H., Wang, J.-Y., Sheen, J.-M., Kuo, H.-C., Hsieh, K.-S., Huang, Y.-H., Yang, K.-D., & Hsu, T.-Y. (2017). L-arginine-dependent epigenetic regulation of interleukin-10, but not transforming growth factor- β , production by neonatal regulatory T lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, 8, 487. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00487>
 116. Crowther, R. R., Schmidt, S. M., Lange, S. M., McKell, M. C., Robillard, M. C., Zhao, J., Haffey, W. D., Wyder, M. A., Greis, K. D., Setchell, K. D. R., & Qualls, J. E. (2022). Cutting edge: L-arginine transfer from antigen-presenting cells sustains CD4⁺ T cell viability and proliferation. *Journal of Immunology*, 208(4), 793–798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.21006552>
 117. Elahi, S., Ertelt, J. M., Kinder, J. M., Jiang, T. T., Zhang, X., Xin, L., Chaturvedi, V., Strong, B. S., Qualls, J. E., Steinbrecher, K. A., Kalfa, T. A., Shaaban, A. F., & Way, S. S. (2013). Immunosuppressive CD71⁺ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*, 504(7478), 158–162. <https://doi.org/10.1038/nature12675>
 118. Van de Velde, L. A., Subramanian, C., Smith, A. M., Barron, L., Qualls, J. E., Neale, G., Alfonso Pecchio, A., Jackowski, S., Rock, C. O., Wynn, T. A., & Murray, P. J. (2017). T cells encountering myeloid cells programmed for amino acid-dependent

- immunosuppression use Rictor/mTORC2 protein for proliferative checkpoint decisions. *Journal of Biological Chemistry*, 292(1), 15–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.766238>
119. Raynor, J. L., & Chi, H. (2024). Nutrients: Signal 4 in T cell immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 221(3), e20221839. <https://doi.org/10.1084/jem.20221839>
120. Geiger, R., Rieckmann, J. C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., Zamboni, N., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2016). L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell*, 167(3), 829–842.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>

BIBLIOGRAFÍA RESUMEN

1. Cho, C. E., & Norman, M. (2013). Cesarean section and development of the immune system in the offspring. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(4), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.08.009>
2. The Lancet. (2018). Stemming the global caesarean section epidemic. *The Lancet*, 392(10155), 1279. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32394-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32394-8)
3. Kenkel, W. M. (2021). Birth signalling hormones and the developmental consequences of caesarean delivery. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(1), e12912. <https://doi.org/10.1111/jne.12912>
4. Ventura-Martínez, C. J., Kempis-Calanis, L. A., Mijares-Guevara, S., Cedillo-Baños, A., Carreón-Cortés, I. Y., Vázquez Rodríguez, S., Helguera-Repetto, A. C., Irlés, C., Spicuglia, S., Rodríguez-Jorge, O., & Santana, M. A. (2026). Premature birth and cesarean section affect neonatal CD4⁺ T cell gene expression and cellular function. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.64898/2026.02.21.707199>
5. Kempis, L. (2021). Análisis Transcriptómico de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos humanos a nivel basal y activados en presencia o ausencia de flagelina (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
6. Martí i Líndez, AA., Reith, W. (2021). Arginine-dependent immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 5303–5324. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>
7. Wu, Q., Chen, X., Li, J., & Sun, S. (2020). Serine and metabolism regulation: A novel mechanism in antitumor immunity and senescence. *Aging and Disease*, 11(6), 1640–1653. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0314>

8. Wang, Z., Luo, C., Zhao, M., Zhang, M., & Tang, Y. (2022). Changes in amino acid profiles in human breast milk during lactation: Implications for infant nutrition. *Nutrients*, 14(7), 1357. <https://doi.org/10.3390/nu14071357>
9. Raman, P., Rao, A. J., & Diamond, M. P. (2019). Arginine supplementation in pregnancy: Potential to prevent preeclampsia and improve fetal outcomes. *Advances in Nutrition*, 10(5), 765–777. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz044>
10. UNICEF. (2023) Cada vida cuenta (2.^a ed., Vols. 2–3). UNICEF.
11. Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J. A., & Rivera-Dommarco, J. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

BIBLIOGRAFÍA DE FIGURAS

Metabolismo de la L-Arginina y su relevancia en linfocitos T: Martí i Líndez, A. A., & Reith, W. (2021). Arginine-dependent immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 5303–5324. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>

Metabolismo de la L-Serina y su relevancia en linfocitos T: Wu, Q., Chen, X., Li, J., & Sun, S. (2020). Serine and metabolism regulation: A novel mechanism in antitumor immunity and senescence. *Aging Disease*, 11(6), 1640–1653. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0314>

Figura 1: Producción de citocinas efectoras de células T CD4⁺ de adultos y neonatos. Kempis-Calanis, L. A., Rodríguez-Jorge, O., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Ventura-Martínez, C. J., Spicuglia, S., Medina-Rivera, A., Thieffry, D., González, A., & Santana, M. A. (2024). Neonatal CD4⁺ T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with proliferation and yet a limited immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, 116(1), 64–76. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad162>

Figura 12: Cuantificación de citocinas efectoras secretadas en función del modo de nacimiento. Ventura-Martínez, C. J., Kempis-Calanis, L. A., Mijares-Guevara, S., Cedillo-Baños, A., Carreón-Cortés, I. Y., Vázquez Rodríguez, S., Helguera-Repetto, A. C., Irlés, C., Spicuglia, S., Rodríguez-Jorge, O., & Santana, M. A. (2026). Premature birth and cesarean section affect neonatal CD4⁺ T cell gene expression and cellular function. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.64898/2026.02.21.707199>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 02 de mayo de 2026

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: "Efecto de la suplementación con L-arginina y L-serina sobre el perfil de citocinas de los neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea" que presenta la L. en C. Ingrid Yaritzit Carreón Cortés (10002742), para obtener el título de Maestría en Ciencias.

Dirección de tesis: Dr. Otoniel Rodríguez Jorge

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM - UAEM	APROBADO
Dra. Gabriela Rosas Salgado FM - UAEM	APROBADO
Dra. Leonor Pérez Martínez IBt - UNAM	APROBADO
Dra. Delia Vanessa López Guerrero FN - UAEM	APROBADO
Dra. Linda Aimara Kempis Calanis Posdoc. CIDC - UAEM	APROBADO





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LINDA AIMARA KEMPIS CALANIS | Fecha:2026-05-03 18:09:11 | FIRMANTE

cupFrXFujilFULvGKHME65QdYbOtQEpsiojmikZOR9fnukCCcsu0c7CsW8x4DsayLeoEv0wc7O1fWZsrn8qZwBkv0KEOMRZPCskmpMlqxafxHTsggtjxEdml4M79+5jJxZ4OGUH5T
NW94gXb+J6+kgzoP2O3wSs3EI3SaYSJWM2x/L8RQSFF3XteAJJEzo1TXErRL8laNHHC0epiLkyYRrbFzN3stHzoBecSXAQOI7Mu9oEyzUEXevNuIC320Ps/o6LXhHMRQ/axpD
O3wA2N3Vk91UasAOQ5tkZB1gjZptHF7YiuScXxvPyJVf2FSseXcmUxOKZaawOfL0b435D3A==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2026-05-04 15:53:03 | FIRMANTE

vyJWYDJG466oq3zB5zr3lb0Nwh8vbKpHavN4DccjGAl2yYDWv5QVa/LLdklaxrq73rWe0VVoLwIPnzJv/rCP6sFTjzUS8517onDGeV3XlwohKboMfm2I4qROdigWxwtEK+8ZgVshbE
pDJOXkuFdtGt/m1GCtO0F1SXiZQwkhHqbj+/D+2UWc6e87Jy+JNW1WRX6qyv8CWmSExzKU7ZPBsAUHEhHaxskjyGoGUUVHg7SglNni7CGjKXmRSaG74X7AYLwk5yEqiyJ0ho
+9KY6slpr1dtAl6Ejk7cdqkWI2A/U0EshIMY0LS8kEvAHAX191nHusJl4DZGtms7Qs7Elxdnw==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2026-05-05 18:50:13 | FIRMANTE

I5Y0ybLRYONV9ITx8o+103bVtQc5qwnCnvXLupTvlN1jkg0rnsVjdN7KPgv4CC3E3gsz15OGZrR8Fm95n0y7F5poepBdS3BJJGE47h1xUP+ybFJKHHJEIOQM7PstutxE/E0UqCE
mTAfoYAG31XhRZJE6SkjGyC8QNSXDK7HUiifNegFx7B25rrvF2VYy/dlBjuWHQRKWrI9tJWjW4yR0MecaJLIYXM/n44sTCAJ38MGG5J9UQsk+OtdOv9nkCnrkT6y4krhADqNsbj/
Ex/8UqHgY2plquGwD2xseg7YjblctpXgcZhT4zaormv2VgUeSgETy92+waAo49OVsCe6A==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2026-05-05 21:19:03 | FIRMANTE

WjmGYwGCNO2qEmpXFDZtCT21h7YX39RsSwSaExisqYtGVwrTkb7MmgCRu4vmKuE8u8NrRdGrG2Uw7bRXCIDWtDGpHHpZUPurpShjVo2vgGNTKksdWjXUMNz93k37DZda
D0+1+fbYVM8YU5ERSZyyk9Jjkg8o7DVSHNNdj5LStq5lpolhAgyXZkm8bewV2VdIPNW6ZVhbeukVXxW3tkccNAWw96Wehq/RyycW8Sm8VShs3OKL9wiaz0chZpHMriCeGinxMi
2UtnE58f1GK+iZqZg+XGOBKHLb0knO0e9AKcni74vDd7Jt8yYqieimgBOoqTjv3flAcg972Y8uTWnFA==

LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ | Fecha:2026-05-31 09:31:27 | FIRMANTE

NtLhT/ceoNpzaMZFcMtDF30SpvfiAS/xYUvP3EIMxYTOF5tvA9q/yH6lqs1/Nn7UJWzAMu3ghTi6ETW5Ow/uiZmsohUXgeaQ0xwe4L3lpwD9SoPEvnwUTDjy74wp5c1lja0zrc63EP
Uay8lw5+dkisL0dl5xZq19lq4BzS9Y9oDQq260lftXAsvpl1ySHmMcfs6p8D31zwle3gq9Emb42QzAgdPn4ZrxKGCEpZ8p7bT4WR9bgsd6rsnChdlfkU96Hl2bERhBWMyBAqwReAxl
eDjEezUX7Q7w/LWwT5+doHlt4WakAA3sXqWQadLXIF2bgqn11tMLCm6gpBkUq/2g==

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



qxthWj3hK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2glYIKXfpLXR9EBZNUzchgu5WHGrVR9e>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029