



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS.

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR.

**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

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
CARLOS JESUS VENTURA MARTINEZ.**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN.
(CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR)**

CUERNAVACA, MORELOS.

MAYO, 2022.

RESUMEN

En el sistema inmune, los linfocitos cumplen diversos papeles, de entre los cuales, son las células encargadas de la inmunidad adaptativa. Estas células se encuentran clasificadas en dos tipos principalmente: linfocitos B, que secretan anticuerpos, y linfocitos T que tienen funciones de organización del sistema inmune o citotóxicas.

Se han identificado dos señales para la activación de los linfocitos T, una es la señal específica, que es mediada por el receptor de antígenos (TCR), y la otra es una señal de alarma inmunológica, la cual puede estar dada por citocinas o algunas moléculas de superficie. La señalización adecuada del TCR promueve la activación de las células mediante la inducción de tres factores de transcripción: el factor nuclear NF- κ B, la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear de células T (NFAT). Estos factores promueven la expresión de moléculas que son necesarias para la función y activación celular. Además, se ha propuesto que la proliferación celular juega un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmunológica. La ampliación clonal es el proceso por el cual los linfocitos aumentan el número de clones al ser estimulados por un antígeno, mientras que la proliferación homeostática se encarga de aumentar el número faltante de células hasta llegar a las cantidades normales.

Los neonatos, en comparación con los adultos, presentan una exposición limitada a antígenos en el útero que permiten inducir inmunidad adaptativa. Se considera que los linfocitos T neonatales están sesgados a una respuesta tolerante y a una respuesta de barrera, o Th2, lo que impide que haya una respuesta adecuada a antígenos intracelulares, mediada por la respuesta Th1. Así mismo, se ha observado que la forma de nacimiento impacta en el desarrollo neonatal, ya que los neonatos nacidos por cesárea son más propensos a presentar enfermedades autoinmunes (alergias, artritis, inflamación crónica, entre otros). Sin embargo, no se ha puesto en discusión si la activación de los factores transcripcionales, NFAT, AP-1 y NF- κ B presentan diferencias en la activación al compararse células neonatales de parto vs cesárea.

Este proyecto se centró en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de CBMC's de neonatos de término de parto y cesárea. El estudio de estas células estará enfocado en evaluar la proliferación celular y la activación de los factores transcripcionales NFAT, AP-1 y NF- κ B en función de las señales de TCR y de flagelina y conocer si existen diferencias al comparar linfocitos de parto y de cesárea.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca de maestría 960641.

A las autoridades y personal de Servicios de Salud de Morelos, de las unidades: Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, Hospital General de Cuernavaca, Hospital General de Temixco y la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación por facilidades otorgadas para la realización de muestreo en campo (expediente 1372/1706).

A las madres y bebés que permitieron la captura de las muestras.

Al Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas.

Al Centro de Investigación en Dinámica Celular.

Al Laboratorio de Inmunología celular.

A la Dra. Ma. Angélica Santana Calderón por haberme recibido en su laboratorio y apoyarme ampliamente durante el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales, al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama y a la Dra. Verónica Narvéez Padilla, por haberme apoyado durante el desarrollo del proyecto.

A la M. en C. Linda Aimara Kempis Cálánis por toda su ayuda, especialmente en el desarrollo experimental.

Al técnico del laboratorio Biol. Oscar Ramírez, a mis compañeros y amigos del laboratorio, por apoyarme en cualquier duda que tenía y darme siempre buenos consejos.

A mis amigos y familiares por haber estado siempre presentes y nunca dejaron de darme ánimos para seguir adelante.

INDICE

RESUMEN	2
AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN	5
El sistema inmunológico	5
Sistema inmune innato.....	5
Sistema inmune adaptativo.....	7
Inicio de la respuesta inmune y activación de los linfocitos T	9
Activación de los linfocitos T a través del receptor de células T (TCR)	10
Factores transcripcionales que regulan la expresión génica del linfocito T	14
NFAT	14
NF-kB	14
AP-1	15
Activación de NF-kB y AP-1 por la vía del receptor tipo Toll.....	16
Ampliación clonal de los linfocitos T	18
Proliferación homeostática.....	20
Funciones efectoras de los linfocitos T.....	20
Inmunidad neonatal.....	23
Inmunidad de neonatos nacidos por cesárea	24
ANTECEDENTES	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
METODOLOGÍA	29
Obtención de muestra de sangre de cordón umbilical	29
Purificación de células mononucleadas.....	30
Estimulación de células mononucleadas	30
Tinción de proteínas intracelulares	31
Tinción extracelular de marcadores de membrana	31
Proliferación celular.....	31
Citometría de flujo	32
Paneles de fluorocromos utilizados para la tinción intra y extra celular.	32
RESULTADOS	33
Estrategia de selección de poblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	33
Muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas de nacimientos de término por cesárea y parto natural	34
Activación de factores transcripcionales en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	35
NFATc1	36
NFATc2	37
NF-kB (p65).....	39
AP-1 (phospho cJun)	41
Proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	42
Proliferación homeostática de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	43
Proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ estimulados con CD3/CD28	46
Efecto de la Flagelina en la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS.....	57
ANEXO.....	57
BIBLIOGRAFIA	58

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico

Históricamente, el término inmunidad ha hecho referencia a la protección que desarrollan los organismos en respuesta al proceso que desencadenan las enfermedades infecciosas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunológico, y a su respuesta conjunta y coordinada frente a la introducción de sustancias extrañas se le conoce como respuesta inmune.

La función fisiológica del sistema inmunológico es la defensa en contra de las infecciones. Sin embargo, sustancias extrañas no infecciosas pueden desencadenar respuestas inmunitarias [1].

Debido a la gran cantidad de células y moléculas implicados en la respuesta inmune, el tiempo que tardan en responder y a su especificidad frente a un tipo de antígeno, se ha dividido el sistema inmunológico en dos partes bien definidas: el sistema inmune innato y adaptativo.

Sistema inmune innato

Este sistema está definido como la primera línea de defensa que entra en acción, tan pronto como son detectados los antígenos. La respuesta se genera en contra de productos de los microorganismos, de células dañadas y de señales de alarma. Esta respuesta es efectuada por: barreras físicas y químicas (piel y mucosas), células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos), linfocitos citolíticos naturales (entre ellos las células ILC y células Natural Killer o NK), proteínas sanguíneas (sistema de complemento y otros mediadores de inflamación), y células dendríticas (DC) [1],[2].

La primera línea de defensa en la inmunidad innata la constituyen las barreras epiteliales y las mucosas, las cuales actúan bloqueando la entrada de microorganismos. Si los éstos logran atravesar estas barreras, constituidas de células epiteliales, son atacados por todo el repertorio de células y moléculas que integran la inmunidad innata [3].

Por una parte, los macrófagos y neutrófilos tienen la capacidad de engullir (fagocitar) a los patógenos y de destruirlos, principalmente por mecanismos proteolíticos. Otro mecanismo efector de estas células es mediante el estallido respiratorio, en el cual las especies reactivas de oxígeno eliminan a los microorganismos. Estos fagocitos también tienen la capacidad de liberar ciertas proteínas pequeñas conocidas como “citocinas” que ayudan a que otras células también sean capaces de eliminar al patógeno mediante distintos procesos. Estas citocinas son muy importantes para el sistema inmunológico ya que permiten la activación, diferenciación, proliferación y la quimiotaxis de las células que integran a este sistema; las citocinas incluyen a factores de crecimiento, interleucinas, quimiocinas, interferones y monocinas [1]. Por otro lado, los neutrófilos comprenden cerca de 50-70% de todos los leucocitos circulantes. Los neutrófilos maduros tienen un núcleo segmentado con un citoplasma enriquecido con gránulos y vesículas secretoras. Los neutrófilos son de las primeras células en responder ante la presencia de antígenos (bacteria, fungi y protozoa), tienen un amplio repertorio de funciones antimicrobianas que incluye la fagocitosis, degranulación y la formación de trampas extracelulares. Estos mecanismos promueven la eliminación de patógenos, al aumentar primero la capacidad fagocítica del neutrófilo, sin embargo, también es posible eliminar a los patógenos al secretar redes de DNA que tienen sustancias microbicidas [4].

Por otra parte, las células Natural killer (NK) son capaces de reconocer y destruir células que han sido transformadas, tales como células cancerosas y aquellas infectadas con virus. El sistema del complemento comprende un grupo de proteínas que circulan en la linfa y la sangre cuyas funciones principales son potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis (proceso conocido como opsonización) y dirigir la lisis de células [5].

Las células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) son muy importantes en la inducción de la activación de las células T y B, las cuales constituyen la segunda línea de defensa inmune, que es conocida como inmunidad adaptativa [6], [7].

Las DC se encuentran en la mayoría de los tejidos periféricos y son las más eficientes células presentadoras de antígenos. Cuando se encuentran en contacto con antígenos

o señales de alarma, son activadas y migran a los nodos linfáticos en donde presentan el antígeno a las células T citotóxicas (Tc) y T cooperadoras (Th) en un proceso conocido como presentación de antígenos, que lleva finalmente a la activación de los linfocitos T [1], [6].

Las células del sistema innato pueden eliminar patógenos rápidamente, mediante la distinción de estructuras proteicas (estructuras comunes en grupos de microorganismos y las del propio organismo). Entre las estructuras del propio organismo se encuentra el MHC (complejo principal de histocompatibilidad), esta molécula permite identificar lo propio y los patrones moleculares asociados a daño o a patógenos, que son conservados por grupos de organismos [8]. Estos patrones moleculares son muy importantes para montar una respuesta inmune, ya que son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que se encuentran en una gran variedad de células. Estos receptores permiten la activación de moléculas de señalización que promueven la transcripción de genes relacionados a la respuesta inmunológica [1], [9]–[11].

Casi todas las células somáticas en el organismo tienen moléculas de MHC de clase I, que identifican a nuestras propias células. Las anomalías en la expresión de esta molécula permiten identificar a las células que han sido infectadas o transformadas. Existe un grupo de células llamadas células presentadoras de antígenos “profesionales” (células dendríticas, macrófagos, y linfocitos B) las cuales contienen en su membrana moléculas de MHC clase II y de clase I [12]. Estas moléculas son reconocidas por células del sistema inmune adaptativo, como los linfocitos T.

Sistema inmune adaptativo

Cuando el patógeno escapa o sobrevive al sistema inmune innato, se activa la respuesta inmune adaptativa, que actúa de manera conjunta y coordinada con el sistema inmune innato. Esta respuesta es estimulada por la exposición de un patógeno en particular, lo que promueve un aumento de la magnitud y capacidad defensiva. El sistema inmune adaptativo reconoce un gran número de sustancias y reacciona frente a ellas. En contraste con la respuesta inmune innata, la respuesta inmune adaptativa tiene una memoria inmunológica que optimiza la capacidad del sistema inmunológico de combatir

infecciones persistentes y recurrentes. Además, posee receptores que son altamente específicos para moléculas extrañas. Esta respuesta esta mediada por linfocitos B y T [1],[9].

Por una parte, los linfocitos B reconocen antígenos a través del receptor de células B (BCR), el cual se conforma de moléculas de inmunoglobulina M (IgM) y D (IgD) que se encuentran en la membrana de la célula. Una vez que las células B son activadas, proliferan y se diferencian en células plasmáticas, las cuales son productoras de anticuerpos. Estos anticuerpos que son secretados por los linfocitos B, son capaces de neutralizar los patógenos en los tejidos y fluidos del organismo o tener otros mecanismos de eliminación de patógenos [12].

Los linfocitos B pueden reconocer a los antígenos directamente, mientras que el receptor de linfocitos T (TCR) solo puede reconocer péptidos cortos, los cuales son generados por la proteólisis de proteínas antigénicas y se presentan en la membrana celular asociadas con el MHC de clase I o clase II en las células nucleadas o APC respectivamente [12],[6].

Los linfocitos T se dividen en dos poblaciones principales con funciones diferentes: los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en ingles) y los linfocitos T citotóxicos (Tc). Los linfocitos Th secretan citocinas, que son responsables de muchas respuestas celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa y expresan en la superficie de membrana una proteína llamada CD4, que es un receptor que reconoce al MHC II. En tanto que los Tc matan a las células que exponen antígenos extraños, para los cuales fueron previamente activadas, como las células infectadas con virus y otros microorganismos intracelulares. Expresan en la superficie de su membrana una proteína llamada CD8, que reconoce al MHC I. Por lo tanto, a los linfocitos Tc también se le conoce como T CD8⁺ y los linfocitos Th como T CD4⁺ [1], [9].

A su vez, se han identificado diferentes subtipos de linfocitos T cooperadores que cumplen funciones diferentes dependiendo del patógeno al que se esté enfrentando el organismo. Entre los fenotipos más importantes, los linfocitos Th se dividen en: Th1 (encargado de la eliminación de patógenos intracelulares), Th2 (que está relacionado con la eliminación de parásitos) y Tregs (permiten la homeostasis del organismo y la

tolerancia periférica) [1], [12], [13]. Más adelante se describirá más acerca de las funciones efectoras de los linfocitos T.

La coordinación de la respuesta inmune se lleva a cabo por los linfocitos T cooperadores. Estas células se diferencian a partir de linfocitos vírgenes, que han sido previamente activados, en linfocitos efectores o de memoria. Los linfocitos efectores se encargan de coordinar la actividad de otras células inmunes para resolver el reto inmunológico. Los linfocitos T de memoria son células de vida larga con una capacidad potenciada de reaccionar contra el antígeno. También existen los linfocitos T reguladores (Treg), que se encargan de proteger tejidos propios de una reacción autoinmune. Pueden diferenciarse directamente en el timo como células reguladoras o en respuesta al antígeno, cuando es presentado en un ambiente de citocinas inmunosupresoras. Los Treg's inducen la tolerancia periférica y controlan las respuestas inmunitarias [12],[9].

La respuesta citotóxica se lleva a cabo por los linfocitos T citotóxicos, ellos responden a citocinas que son secretadas ante una estimulación y así incrementan su capacidad citotóxica. La estimulación de linfocitos T CD8⁺ lleva a la síntesis de granzima y perforina, así como la expresión del ligando Fas, todos estos inducen la apoptosis de las células infectadas [5].

Inicio de la respuesta inmune y activación de los linfocitos T

El inicio y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa requiere de la captación de los antígenos y su exposición por células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, que responden si reconocen específicamente al péptido presentado. Como se mencionó anteriormente, los receptores de las células T reconocen solamente péptidos cortos que están en la membrana de las APC o células nucleadas [6],[9] [10].

En su estado inmaduro, las DC tienen una gran capacidad de endocitosis, esto les permite ingerir antígenos muy eficientemente. Las células dendríticas están presentes en muchos tejidos periféricos y se diferencian a partir de precursores de la médula ósea y, después de su diferenciación, se mantienen en constante supervisión en los tejidos [6],[14].

Una vez que las células dendríticas son activadas (debido a una señal de peligro), migran a la zona T de los nodos linfáticos donde presentan antígenos a las células Tc y Th. Las DC tienen niveles basales de moléculas de MHC clase I y II así como moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (ligandos de CD28 en células T), los cuales incrementan drásticamente durante su activación [6], [8], [9].

Se ha observado que las DC, una vez activadas, comienzan a expresar el receptor de quimiocinas CCR7, que es específico de dos quimiocinas, CCL19 y CCL21, las cuales se producen en los vasos linfáticos y en la zona T de los nodos linfáticos. Estas quimiocinas permiten la migración de las DC portadoras de antígenos hacia la zona T [6], [9].

Las señales necesarias que promueven la proliferación de los linfocitos T y su diferenciación en células efectoras y de memoria requieren de: **1)** El reconocimiento del antígeno mediante el receptor de células T; **2)** La coestimulación mediante la activación de receptores asociados a membrana; y **3)** Citocinas instructivas producidas por las APC y otros tipos celulares [1], [8],[15].

En los últimos años se ha descrito una cuarta señal que es capaz de activar a los linfocitos T y pareciera que puede suplir a la segunda señal e incluso ser más eficiente. Esta cuarta señal se da a través de receptores de reconocimiento de patrones, conocidos como receptores tipo toll (TLR) y se ha demostrado que puede inducir la activación de factores transcripcionales claves para la activación eficiente del linfocito T así como la producción de citocinas ligadas a la eliminación de patógenos intracelulares [16]–[20].

Activación de los linfocitos T a través del receptor de células T (TCR)

El receptor de las células T (TCR) es el responsable de reconocer al péptido que se encuentra acoplado al MHC en las APC o en las células nucleadas. La comunicación entre las APC, las células nucleadas y las células T ocurre mediante la sinapsis inmunológica. Este contacto es necesario para la maduración del linfocito y su respuesta inmune, que es generada a partir de la activación de factores de transcripción. Estos promueven la expresión de moléculas como interleucinas, interferones, quimiocinas,

entre otros. Los factores de transcripción más estudiados son el factor nuclear κ (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) [12].

La comunicación entre células presentadoras de antígenos y linfocitos T ocurre a través de la sinapsis inmunológica, los contactos entre estas células provocan la activación supramolecular de clústeres (CD3, CD4, CD8, CD28, entre otras). Durante la sinapsis inmunológica, las APC y los linfocitos T reorganizan sus moléculas que interactúan, desde toda la superficie celular hasta el área de contacto, para ayudar a mantener la interacción necesaria para la activación de los linfocitos T. En el centro de la interacción, las cadenas α y β del TCR interactúan con el péptido unido al surco del MHC. Las moléculas CD4 o CD8 reconocen un área diferente del MHC. También, en el centro de la sinapsis, las moléculas CD28 interactúan con su ligando en la APC, CD80 o CD86. Alrededor del agrupamiento central, existe un anillo de moléculas de adhesión CD2 y LFA1, que reconocen a CD58 e ICAM1 en la APC para ayudar a mantener una fuerte adhesión entre las células. Las interacciones entre el complejo péptido-MHC y el TCR, confieren la especificidad necesaria para la activación de los linfocitos T [1], [12].

El TCR es un complejo compuesto de dos cadenas variables ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) responsables del reconocimiento del antígeno, cadenas invariantes CD3 (γ , δ y ϵ) y cadenas ζ . Estas dos últimas inician las cascadas de señalización, mediante la fosforilación de tirosinas contenidas en dominios llamados ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif). Los correceptores CD4 y CD8, en las células Th y Tc respectivamente, facilitan el proceso de activación, al tener unida débilmente una cinasa a sus regiones intracitoplasmáticas, Lck de la familia Src, la cual fosforila los dominios ITAM (Fig. 1).

La fosforilación de los ITAM resulta en el agrupamiento de enzimas y moléculas adaptadoras en la proximidad de los receptores de la membrana plasmática. Los ITAM con tirosinas fosforiladas en la cadena ζ son el lugar de acoplamiento para la tirosincinasa de la familia Syk llamada ZAP-70. Una vez unida la ZAP-70, fosforila a varias tirosinas de moléculas adaptadoras, una de ellas es LAT. Las proteínas adaptadoras se convierten en lugares de acoplamiento para enzimas celulares como la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1), la cual inicia dos vías de señalización, mediante la reacción de hidrólisis de un fosfolípido de membrana, fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂). Esta hidrólisis genera un producto,

diacilglicerol (DAG), el cual recluta a la proteína cinasa C (PKC) y Ras-GDP a la membrana plasmática mientras el otro producto, inositol 2,4,5- trifosfato (IP3), se une a su receptor en el retículo endoplásmico y abre los canales de calcio intracelulares, permitiendo la salida de Ca^{2+} al citosol [1], [8].

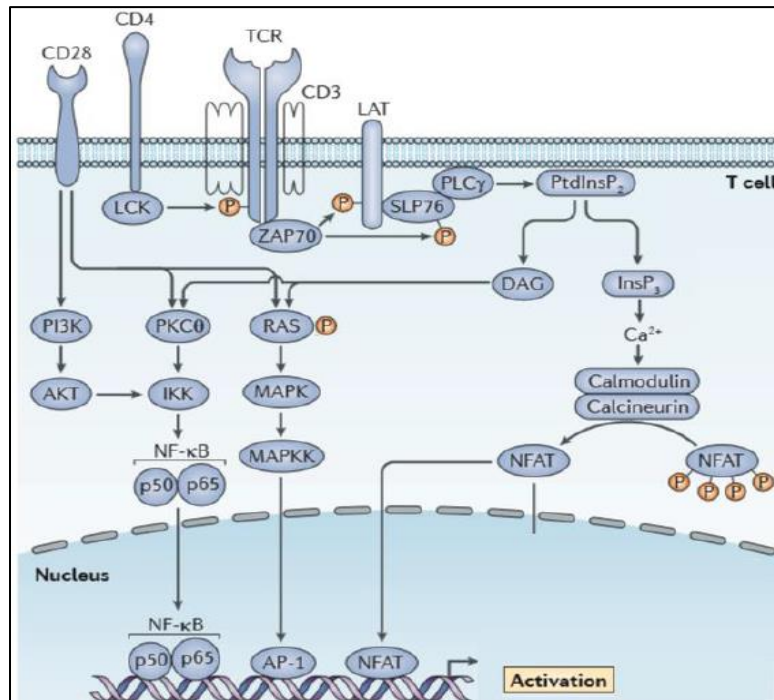


Figura 1. Activación de linfocitos T por medio del TCR (receptor de células T). La transducción de señales comienza con la fosforilación de las colas ITAM de las cadenas intracelulares de CD3 por la cinasa LCK. Posteriormente, la cinasa ZAP70 se une a los ITAM y ésta fosforila a las proteínas acopladoras SLP76 y LAT, las cuales reclutan a la fosfolipasa $\text{PCL}\gamma$. Esta proteína escinde al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdInsP_2) y provoca la liberación de diacilglicerol (DAG), el cual promueve la activación de la vía de las MAP cinasas (MAPK) y de PKC, los cuales permiten la activación de AP-1 y NF- κ B, respectivamente. Por otro lado, el inositol trifosfato (InsP_3) se une a su receptor en el retículo endoplasmático y promueve la liberación del calcio intracelular. Este aumento de calcio activa a la fosfatasa Calcineurina, la cual desfosforila al NFAT, lo que permite su translocación al núcleo [8].

El incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico activa a la calmodulina-cinasa dependiente de Ca^{2+} (CaMK) y a una fosfatasa, la calcineurina, la cual desfosforila al

NFAT en sitios específicos. Esto permite que se exponga su señal de localización nuclear, permitiendo al NFAT translocarse al núcleo, en donde induce la expresión de genes de citocinas (incluyendo IL-2, la cual promueve la proliferación de las células T)[1] [8] [16].

Por otra parte, PKC, activada por el diacilglicerol y el calcio intracelular (en las PKC clásicas) o sólo por diacilglicerol en las novel (como PKC θ en los linfocitos T), permite la activación de IKK (complejo cinasa de I κ B), la cual fosforila a la proteína inhibitoria κ (I κ B) y la marca para su degradación en el proteasoma, lo que permite que NF- κ B migre al núcleo y active la expresión de citocinas.

A la proteína acopladora LAT, se le une otro adaptador conocido como Grb-2, el cual proporciona un lugar de acoplamiento para proteínas G pequeñas de la familia Ras (para la activación de la vía de Erk) y Rho (para las vías de JUNK y p38). Vav y SOS se encuentran entre los activadores de GTPasas pequeñas más conocidos, asociados con proteínas adaptadoras en el señalosoma temprano, que activan las GTPasas Ras y Rho, respectivamente [1], [8].

El factor intercambiador de nucleótidos (GTP/GDP) de Ras, denominado SOS, cataliza el intercambio de nucleótidos (Ras-GDP en Ras-GTP). Una vez que Ras se ha activado, promueve la señalización de la cascada de cinasas llamadas MAP (de las siglas en inglés mitogen-activated protein, MAPK), esta cascada de señalización activa a la cinasa ERK. Una vez que Erk es activada, se transloca al núcleo y fosforila al factor de transcripción Elk, el cual promueve la transcripción de c-Fos, un componente de AP-1 [1], [12].

Junto con la activación de Ras a través del reclutamiento de Grb-2 y SOS, los adaptadores fosforilados reclutan y activan a una proteína de intercambio de GTP/GDP llamada Vav, que actúa sobre otra proteína ligada al nucleótido de guanina llamada Rac. El Rac-GTP que se genera, inicia una cascada paralela de las MAPK que activa a una cinasa, JNK, que fosforila la porción amino terminal de c-Jun, el segundo componente del factor de transcripción AP-1, lo que permite su translocación al núcleo y unión a c-Fos [12],[8].

Las actividades de ERK y JNK terminan por la acción de fosfatasa, lo que proporciona un mecanismo de retroalimentación negativa que termina la activación del linfocito T.

Factores transcripcionales que regulan la expresión génica del linfocito T

NFAT

El factor nuclear de las células T (NFAT) es expresado en casi todo tipo celular que ha sido examinado, incluyendo otras células del sistema inmune y otras más no pertenecientes a este sistema. La familia de NFAT consiste de cinco miembros: NFAT1 (también conocido como NFATp o NFATc2), NFAT2 (conocido como NFATc o NFATc1), NFAT3 (conocido como NFATc4), NFAT4 (conocido como NFATx o NFATc3) y NFAT5. Del NFAT1 al NFAT4 son regulados mediante calcio-calcineurina, el NFAT5 es regulado por señales de estrés osmótico. NFATc1 es un miembro importante ya que promueve la diferenciación de células efectoras Th2, por otro lado, NFATc2 y NFAT4 promueven la expresión de las citocinas de células Th1 y reprimen la expresión de los genes de las células Th2 [14],[22].

NFAT es necesario para la expresión de genes que codifican IL-2, IL-4, TNF y otras citocinas. En el citoplasma de linfocitos T en reposo, NFAT se encuentra fosforilado e inactivo. Cuando es desfosforilado por la calcineurina, en respuesta al incremento de Ca^{2+} debido a la activación del TCR, se transloca al núcleo, donde es transcripcionalmente activo. En el núcleo, NFAT forma heterodímeros con el factor transcripcional AP-1 (Fos/Jun) para inducir genes de citocinas. Sin embargo, en la ausencia de AP-1, NFAT impone un programa genético de anergia en los linfocitos. Este proceso puede ocurrir debido a una activación incompleta en la que ocurre solo el reconocimiento de la primera señal a través del TCR sin la activación de receptores coestimuladores [1] [16].

NF-κB

El factor nuclear κB (NF-κB) pertenece a una familia de factores de transcripción que juegan papeles importantes en la inflamación, inmunidad, proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Su activación inducible depende de la fosforilación y,

degradación en el proteasoma, del inhibidor de proteínas de NF- κ B (I κ B), el cual retiene a dímeros de NF- κ B inactivos en el citosol de células no estimuladas [18] [19].

El NF- κ B forma parte de la familia Rel, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homo o heterodímeros. Estas proteínas son: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB; de éstas sólo las tres últimas tienen el dominio transactivador, indispensable para reconocer el promotor de los genes diana. La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional en los promotores de los genes diana. El heterodímero p50/p65 es el más común y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína p65. Aunque los homodímeros p50 y p52 no poseen actividad transcripcional, pueden estimular la transcripción cuando se unen a la proteína nuclear parecida al inhibidor de κ B (BCL-3) [8] [19].

Las proteínas p50 y p52 se sintetizan como precursores p105 y p100 respectivamente, y son procesados por el proteasoma, donde se remueve su extremo carboxilo-terminal (C-ter), dando lugar a las formas activas p50 y p52. La familia de NF- κ B tiene un rol intrínseco en las funciones efectoras de las células Th1. Dos miembros, c-Rel y RelB son requeridos, absolutamente, para la producción de IFN- γ . Esto está correlacionado con una fuerte activación de PKC θ , lo cual dirige la diferenciación de células Th1 [24], [25].

AP-1

La proteína activadora 1 (AP-1) se ha encontrado en muchos tipos celulares. Se activa de forma específica en los linfocitos T mediante señales del TCR. AP-1 se le llama a una familia de factores transcripcionales dimétricos que se unen entre sí a través de una estructura compartida llamada cremallera de leucina. La formación de AP-1 activa implica habitualmente la síntesis de proteínas Fos y la fosforilación de la proteína Jun preexistente [12]. AP-1 parece asociarse físicamente a otros factores de transcripción en el núcleo y trabaja también combinada con NFAT[21].

Activación de NF- κ B y AP-1 por la vía del receptor tipo Toll.

La habilidad del sistema inmune del huésped para reconocer y responder a los componentes microbianos es, en gran parte, mediada por el sistema inmune innato a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés pattern recognition receptors) los cuales juegan un papel importante en la defensa inicial del huésped contra patógenos invasores. Estas moléculas también se encuentran en la membrana celular de los linfocitos T y el reconocimiento de sus ligandos, que viajan en la linfa puede proporcionar señales co-receptoras a estas células [16], [18], [19], [26].

Los receptores tipo toll (TLR del inglés toll-like receptors) son una familia conservada a lo largo de la evolución, de PRRs, debido a su capacidad de detectar una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés pathogen-associated molecular patterns), como lípidos, proteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, etc. Estos productos microbianos propician la activación de diversas vías de señalización intracelular que dictan la magnitud, tipo y duración de la respuesta inflamatoria del huésped [12].

Los TLR son glicoproteínas de membrana de tipo I que están compuestos de tres principales dominios: 1) una región hidrofóbica que contiene repeticiones ricas en leucina que se unen a patrones moleculares asociados o ligandos endógenos, 2) una región transmembranal y 3) un receptor intracelular toll/interleucina-1 (TIR) que inicia la señalización a través de proteínas adaptadoras como MyD88, Mal/TIRAP, TRAM y TRIF. Hasta la fecha se han identificado 10 tipos de TLR en humano, y cada TLR tiene un conjunto específico de ligandos que puede detectar [17],[1].

Los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la membrana plasmática y los TLR 3, 7, 8 y 9 se expresan intracelularmente en el retículo endoplasmático y en las vesículas endocíticas (Fig. 2). Específicamente, el TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) provenientes de bacterias gram-negativas, el TLR2 puede formar heterodímeros con el TLR1 o TLR6 y reconoce peptidoglicanos, lipopéptidos y lipoproteínas. TLR3 y TLR9 reconocen RNA de doble cadena (dsRNA). El TLR7 y TLR8 pueden reconocer ARN unicatenario. Por otro lado, se desconoce hasta el momento el ligando del TLR10. El TLR5 ha demostrado reconocer flagelina bacteriana y es importante su estudio en este proyecto [1], [12], [17].

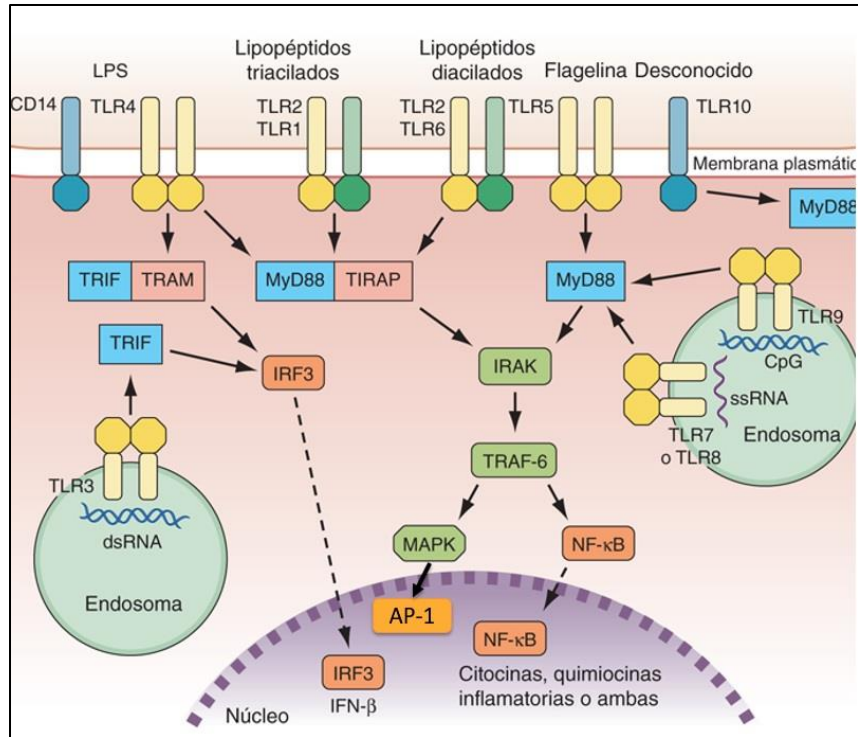


Figura 2. Vías de señalización de los receptores tipo Toll en mamíferos. Existe una gran variedad de receptores tipo Toll, endosómicos (TLR 3, 9 y 7 u 8) y de membrana (TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10). Los TLR 1, 2, 5 y 6 usan la proteína adaptadora MyD88 y activan los factores transcripcionales NF-κB y AP-1. El TLR 3 usa la proteína adaptadora TRIF y activa los factores transcripcionales IRF3 e IRF7. El TLR4 puede activar las dos vías. Los TLR 7 y 9 del endosoma usan MyD88 y activan el NF-κB e IRF7 [17].

La base fundamental de la señalización del TLR depende del reclutamiento y asociación de moléculas adaptadoras que se unen a la estructura conservada del receptor TIR. Se han descrito dos vías de señalización que permiten la activación del TLR, una que es dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la otra que es independiente de éste y dependiente de TRIF [17],[2].

La vía de señalización dependiente de MyD88 está presente en casi todos los tipos de TLR y propicia la activación de los factores transcripcionales NF-κB y AP-1. Solamente, el TLR3 y TLR4 comparten la vía de señalización que es independiente de MyD88 e induce la expresión de los factores transcripcionales IRF-3 y posteriormente la producción de interferones α y β [12].

En la vía dependiente de MyD88 en mamíferos, la unión de PAMPs al TLR, activa la vía de señalización de NF- κ B por el reclutamiento y asociación de MyD88 a la membrana celular, así como la activación de una ubiquitina ligasa. Posteriormente, MyD88 recluta a la cinasa asociada a IL-1R (IRAK), la cual fosforila a TRAF (Factor de necrosis tumoral asociado a receptor) y después se une a éste. Una vez activado TRAF, se activa a un complejo que contiene una cinasa de TGF- β activada (TAK) y una proteína de unión a TAK1 (TAB) para fosforilar el complejo cinasa de I κ B (IKK). El complejo TAK1/TAB desencadena las vías de señalización de MAPK (produce Fos y Jun) y NF- κ B. Una vez que IKK es activada, fosforila al inhibidor de NF- κ B (I κ B), y promueve su degradación en el proteasoma, permitiendo así la translocación nuclear de NF- κ B para activar la transcripción de citocinas inflamatorias [1], [12].

Por otro lado, el principal resultado de la vía de señalización independiente de MyD88 es la producción de IFN tipo 1 y la activación de factores transcripcionales que se agrupan como elementos de respuesta a interferón (IRF). Los TLR4 y TLR3 requieren de TRAM para la activación de TRIF que se asocia con TRAF3 y TRAF6. La activación de TRAF6 y RIP1 a través de TRIF permite la activación de NF- κ B. TRAF3 media la activación de IRF3 por la activación de TBK1 e IKKi. La fosforilación de IRF3 por TBK1/IKKi permite la translocación nuclear de IRF3 y la inducción de IFN- β [17].

La flagelina, que es el ligando del TLR-5, ha sido estudiada por nosotros y otros investigadores como un adyuvante en las formulaciones de las vacunas contra infecciones, particularmente por patógenos intracelulares. Se ha descrito como un potente activador de un amplio rango de tipos celulares involucrados en la inmunidad innata y adaptativa, así como promover la producción de citocinas [20], [26],[27],[19].

Ampliación clonal de los linfocitos T

Una de las primeras actividades que realizan los linfocitos después de ser activados es la producción de citocinas, que son aquellas moléculas que permiten la comunicación entre los diferentes tipos celulares, una de estas citocinas, la IL-2, en combinación con factores de crecimiento, señales coestimuladoras y provenientes del TCR promueven la proliferación del linfocito T [28].

Las células que reconocen el antígeno producen IL-2 y también responden de manera preferente a ella debido a la expresión de la cadena β de su receptor (CD25), que les da alta afinidad. Esto asegura que únicamente los linfocitos T específicos frente al antígeno sean los que proliferen. El resultado de esta proliferación es un aumento en el número de clones específicos frente al antígeno, en un proceso conocido como ampliación clonal, que genera un gran número de células que son requeridas para eliminar el antígeno a partir de una pequeña reserva de linfocitos vírgenes específicos[12], [28].

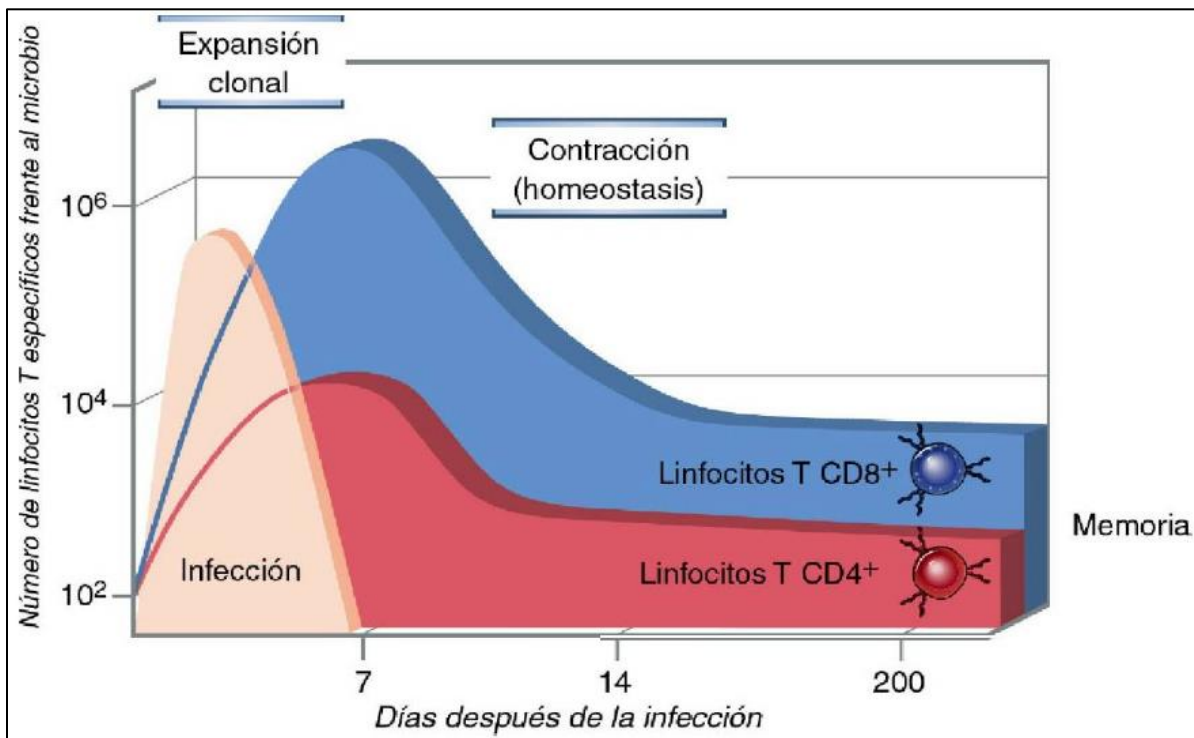


Figura 3. Ampliación clonal de linfocitos T. Se ilustra el número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos frente a antígenos microbianos, la ampliación y declinación de las células efectoras durante la respuesta inmunitaria. Los linfocitos que sobreviven la contracción, son aquellas que fungirán como linfocitos de memoria. Las cifras mostradas son aproximaciones basadas en estudios de modelos microbianos y otros antígenos en ratones endogámicos [12].

Antes de la exposición al antígeno, la presencia de los linfocitos T vírgenes específicos frente a cualquier antígeno es de 1 en 10^6 linfocitos. Después de la exposición al antígeno, la cifra de linfocitos T CD8⁺ específicos puede aumentar hasta 1 de cada 3

linfocitos T CD8⁺, lo que representa una ampliación >50,000 veces. Para los linfocitos T CD4⁺ específicos, el número de células aumenta hasta 1 de cada 100 linfocitos T CD4⁺ (Fig. 3) [10], [28],[12].

Como se puede observar en la Fig. 3, después del aumento considerable del número de linfocitos T ante una situación de infección, se observa una reducción en el número de linfocitos efectores, la principal razón de que ocurra esto es debido a que a medida que se elimina el antígeno y la respuesta inmune desaparece, las señales que mantienen vivos y en proliferación a los linfocitos activos van disminuyendo y se aumenta la expresión de Fas y FasL, que llevan a la muerte celular programada inducida por activación.

Proliferación homeostática

En el estado estable, la reserva de linfocitos vírgenes se mantiene en un número bastante constante debido a un equilibrio entre la muerte celular programada de estas células y la generación de células nuevas en los órganos linfáticos generadores. Cualquier pérdida de linfocito lleva a una proliferación compensadora de los restantes y a una mayor producción en los órganos generadores [21],[30].

Una demostración de la capacidad de la población de linfocitos de llenar el espacio disponible es un proceso llamado proliferación homeostática. Por ejemplo, si se transfieren células vírgenes a un anfitrión que tiene una deficiencia de linfocitos (linfopénico), los linfocitos transferidos empiezan a proliferar y a aumentar en número hasta que alcanzan aproximadamente las cifras normales de linfocitos [31].

La proliferación homeostática parece estar dirigida por las mismas señales, el reconocimiento débil de algunos antígenos propios y de citocinas, sobre todo de IL-7 e IL-15, las cuales son necesarias para el mantenimiento de los linfocitos vírgenes [12] [28].

Funciones efectoras de los linfocitos T

La sinapsis inmunológica tiene tres roles principales: identificar antígenos, estimular la respuesta inmune adaptativa y dirigir moléculas líticas o citocinas al área de contacto durante la fase efectora de los linfocitos.

En los seres humanos, la mayoría de los linfocitos T activados y de memoria expresan una molécula de superficie conocida como CD45RO, mientras que los vírgenes tienen la misma molécula, pero con un segmento codificado por un exón llamado A y por lo tanto se llama CD45RA. También se ha observado que estos linfocitos son distinguibles por la alta expresión de L-selectina (CD62L) y CCR7, un receptor de quimiocinas que es responsable de localizar a los linfocitos en la zona T de los nodos linfáticos. Otra molécula llamada CD69 aumenta drásticamente tras ser activados los linfocitos T, esta proteína se une al receptor para la esfingosina-1-fosfato llamada S1PR1 (S1PR1 promueve la salida de los linfocitos T de los ganglios linfáticos) y reduce su expresión en la superficie, por lo que los linfocitos son retenidos más tiempo en los ganglios linfáticos para recibir señales que promueven su diferenciación y proliferación [5] [9].

Las principales funciones de los linfocitos T CD4⁺ efectores son reclutar y activar a los fagocitos y otros leucocitos para que destruyan a los microorganismos intra y extracelulares, parásitos y, ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos. Se han identificado tres principales subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ efectores que pueden distinguirse por las citocinas que producen y por los factores de transcripción que expresan: Th1, Th2 y Th17, además de los linfocitos reguladores (Tregs) [1], [5].

La diferenciación en el subgrupo Th1 está dirigida por las citocinas interleucina 12 (IL-12) y el interferón γ (IFN- γ), y al ser activadas secretan IFN- γ y el factor de necrosis tumoral β (TNF- β) lo cual hace que estas sean capaces de coordinar respuestas inmunes mediadas por linfocitos T citotóxicos, macrófagos activados y linfocitos NK, por lo que estas células son particularmente efectivas en la protección contra infecciones intracelulares (bacterias y virus) [26].

La IL-4 estimula la diferenciación del subgrupo Th2 y éstas producen y secretan IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales regulan la producción de anticuerpos y tienen como principal blanco a los organismos parásitos como los helmintos. El fenotipo Th2 induce una inmunidad de tipo "barrera" a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes, la degranulación de células cebadas, proliferación y activación de eosinófilos, protección por aumento de la producción de mucosa y la hipercontractibilidad del músculo del intestino para facilitar la expulsión de parásitos [8].

Por otro lado, la diferenciación en el subgrupo Th17 es estimulada por la IL-6, IL-1, IL-23 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Estas células secretan citocinas como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22 y TNF- α las cuales juegan un rol muy importante en procesos inflamatorios y la activación de neutrófilos para combatir bacterias extracelulares [12].

Los linfocitos T reguladores (Tregs) tienen como principal función el mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia antígenos propios y extraños. Después de haber ocurrido una respuesta inmune hacia los patógenos, las células Tregs regulan negativamente la respuesta inmune, de este modo, protegen contra inmunopatologías. La diferenciación en este subgrupo ocurre en respuesta al TGF- β y sus principales citocinas efectoras incluyen a la IL-10, TGF- β e IL-35, las cuales tienen la capacidad de suprimir las respuestas proinflamatorias [1], [12], [32].

Durante la fase efectora de la respuesta inmune, varias citocinas contribuyen a la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ y a mantener su forma efectora y de memoria. Por un lado, la IL-12 promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ en CTL (Linfocitos T citotóxicos). También se ha observado que la IL-12 y el interferón de tipo I estimulan la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes en CTL efectores, estas citocinas las pueden producir distintos tipos de células dendríticas durante la respuesta inmune vírica o bacteriana. La IL-15 permite la supervivencia de los linfocitos T CD8⁺ de memoria. Sin embargo, la principal función efectora del linfocito T citotóxico es la eliminación de patógenos intracelulares mediante la muerte de las células infectadas. Esto lo logra a través de sus mecanismos citotóxicos y la producción y secreción de IFN- γ que ayuda a activar a los macrófagos [10] [24].

Los linfocitos citotóxicos eliminan a las células infectadas por el contacto directo entre la CTL y la célula infectada que expresa el MHC clase I que tiene unido una pequeña fracción peptídica del antígeno. La eliminación ocurre por medio de la secreción de proteínas con capacidad citotóxica que se almacenan en gránulos en el citoplasma de los CTL, las cuales son: lisozima, perforina y granzima. Por un lado, las granzimas comprenden un grupo de serin-proteasas que tienen un dominio His-Asp-Ser en sus

dominios catalíticos, tienen la capacidad, además, de activar a caspasas que inducen la muerte celular (caspasas ejecutoras). La perforina es una molécula que tiene la capacidad de perturbar la membrana celular. Mediante su polimerización, puede formar poros en la membrana, su función principal es facilitar la entrada de granzima en el citosol de la célula infectada. Una vez que granzima está en el citosol, escinde varios sustratos como las caspasas e inician la muerte apoptótica de la célula, por ejemplo, la granzima B activa la caspasa 3 así como a Bid, un miembro de la familia Bcl-2 que desencadena la vía mitocondrial de la apoptosis [8], [28].

Los CTL también utilizan un mecanismo independiente de los gránulos para matar, este mecanismo está mediado por interacciones de moléculas de membrana situadas en el CTL y la célula infectada. Tras la activación, los CTL expresan una proteína de membrana llamada ligando de Fas (FasL) que se une al receptor Fas que se expresa en las células nucleadas. Esta interacción da lugar a la activación de las caspasas y a la apoptosis de las células que expresan Fas [28].

Inmunidad neonatal

Las enfermedades infecciosas son una causa importante de muerte infantil. La infección neonatal sigue siendo una tragedia común, con cerca de 7 millones de casos y 700,000 muertes por año, y actualmente las muertes neonatales representan el 40% de la mortalidad en los menores de 5 años [33].

Después de algunos desafíos al sistema inmune, la respuesta neonatal a menudo es tolerante, sesgada o deficiente. Esto conlleva a una respuesta pobre hacia la infección y baja memoria inmune en respuesta a las vacunas [34], [35].

La sensibilidad de los recién nacidos a enfermedades infecciosas podría deberse en parte a la falta de memoria inmunológica preexistente. Otro factor importante que contribuye pudiera ser el pequeño número de células que están presentes en los tejidos linfoides periféricos durante la edad temprana. Se ha encontrado que subconjuntos de células están presentes en diferentes proporciones en neonatos y adultos humanos y, entre células del mismo subtipo, se han descrito diferencias fenotípicas. Además,

algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han descrito diferencias o desviación inmune entre células T, B y las APC en neonatos [35].

Se ha encontrado evidencia que los neonatos humanos tienen diferencias en la capacidad inmune de las células T CD4⁺, particularmente son bajos en las respuestas inmunes adaptativas mediadas por las células Th1. La falta de antígenos en las células T CD4⁺ durante el tiempo de gestación contribuye a la vulnerabilidad de los neonatos e infantes hacia enfermedades bacterianas como la tuberculosis, un patógeno en el cual las células Th1 son esenciales en los adultos humanos [36],[26].

Como se había mencionado, las células Th1 producen principalmente IFN- γ , una citocina inflamatoria muy importante en respuestas contra infecciones microbianas, mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13 los cuales participan en la inmunidad contra parásitos, pero también juegan roles importantes en las reacciones alérgicas [12].

Comparaciones entre células sanguíneas del cordón umbilical (CB) y células sanguíneas de sangre adulta periférica (APB), muestran una expresión reducida en la activación inducida de proteínas *in vitro*, incluyendo moléculas de superficie celular como CD69 y CD40L. También se encuentra disminuido el IFN- γ , citocina firma del subtipo celular Th1 [19], [20].

La respuesta desequilibrada entre células Th1 y Th2 puede explicar la susceptibilidad del recién nacido tanto a las infecciones como a las reacciones alérgicas.

Inmunidad de neonatos nacidos por cesárea

En México, de los partos de las madres de 15 a 49 años que ocurrieron en los últimos años, 3.9 millones (45.5%) fueron cesáreas, y de estas, el 50.7% se programaron. El número de nacimientos por cesárea ha ido en aumento en los últimos años, se ha comprobado que el nacimiento por cesárea puede reducir efectivamente la morbilidad y mortalidad materna y perinatal, sin embargo, el abuso de esta práctica genera una recuperación más lenta de la madre y predispone al niño a algunas enfermedades [37]–[41].

El proceso de parto normal (labor) conlleva muchas horas, y el neonato puede ser expuesto a una serie de fuerzas mecánicas, periodos de hipoxia transitoria, aumento de

las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el surgimiento de un estrés hormonal que influye fisiológicamente e impacta de por vida en la salud del bebé [38]. Sin embargo, el parto vaginal también proporciona señales de desarrollo importantes y permisivas que son necesarias para desencadenar la maduración inmunológica y fisiológica del feto en preparación para la vida postnatal [38], [39].

En los últimos años se ha encontrado evidencia de que el nacimiento por cesárea está asociado con efectos en la salud tanto a corto como a largo plazo, afectando principalmente al sistema inmunológico y el metabolismo. Los infantes nacidos por cesárea son más propensos a desarrollar desordenes respiratorios e inmunes como el asma, alergias, artritis juvenil, enfermedad de intestino inflamado, entre otras [38], [39], [42], [43].

Los riesgos de desarrollar enfermedades inmunes relacionadas al nacimiento por cesárea podrían ser debido a la falta de factores de estrés asociados con el trabajo de parto y a la regulación inmunitaria causada por una programación inmunológica alterada de la microbiota intestinal al nacer. El canal vaginal, que permite la salida del recién nacido, lo expone a un microbioma diferente de aquel encontrado durante un nacimiento por cesárea. [38], [39], [44].

Por una parte, la colonización bacteriana intestinal del neonato prepara al sistema inmunológico y cambia el equilibrio entre las células Th1 y Th2. Esta colonización intestinal modificada de los bebés nacidos por cesárea puede prolongar la inmadurez inmunológica postnatal, prevenir la preparación inmunológica adecuada y, por lo tanto, aumentar el riesgo de enfermedad inmune. Aquellos infantes nacidos por cesárea tienen un bajo número de bacterias en la flora intestinal y se mantiene perturbada hasta los 6 meses de edad, lo que pudiera indicar que la microbiota intestinal juega un papel importante en el desarrollo del sistema inmune [38], [44], [45]. La contracción del útero y la hipoxia fetal durante el parto vaginal normalmente estimula una respuesta significativa al estrés, como la reflejada por la alta concentración de catecolaminas y cortisol en los neonatos. Por lo contrario, los infantes nacidos por cesárea antes del inicio del trabajo de parto, carecen de este aumento de hormonas del estrés. Reportes anteriores mencionan que el aumento del cortisol en la circulación en el nacimiento es un indicador de

activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. El parto vaginal y sus efectos en el aumento de glucocorticoides ha sido asociado con el incremento de la maduración de los órganos, incluyendo el intestino [39], [38], [44].

Dada la magnitud de este problema, incluso intervenciones modestamente efectivas salvarían millones de vidas. Mejorar la protección contra infecciones y enfermedades a través de la modulación inmune ofrece un enfoque factible. Sin embargo, el diseño y la implementación de las intervenciones inmunomoduladoras requieren una comprensión más profunda de los cambios que ocurren en el sistema inmune neonatal durante el desarrollo, a nivel celular y molecular.

ANTECEDENTES

Se ha observado que los linfocitos T de sangre de cordón umbilical de neonatos de término tienen una respuesta inmune diferente a los adultos. Esta respuesta inmune está centrada en una inmunidad de barrera, la cual se caracteriza por presentar una cantidad considerable de células Th2 y una población escasa de células Th1, la cual es la principal encargada de la eliminación de patógenos intracelulares (virus, bacterias, etc.) [35],[1].

En estudios anteriores en nuestro laboratorio, en neonatos de término nacidos por parto vaginal, se encontró que las células T CD8⁺ de los neonatos están sesgadas a una respuesta tipo inflamación innata, con una baja respuesta citotóxica, una alta proliferación homeostática pero pobre proliferación con el estímulo CD3/CD28 [20]. También se identificó que el receptor tipo Toll 5 (TLR-5) está sobreexpresado en los linfocitos T CD8⁺ [19]. Demostramos que la activación de este TLR con la flagelina (ligando de TLR5) permitió la activación de moléculas de señalización y la producción de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ neonatales [26]. En otro trabajo del laboratorio se evaluó que la flagelina permite la activación de los factores transcripcionales NF- κ B y AP-1 (Linda K.C. 2018). Durante mi tesis de licenciatura, evalué el efecto de la flagelina en la activación de NFAT, encontramos que la flagelina reduce la activación de este factor transcripcional, particularmente en las células neonatales, sin embargo, estos datos aún se encuentran en espera de ser validados.

En un análisis de RNAseq de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre de cordón umbilical de neonatos prematuros y de término nacidos por cesárea (y parto vaginal), realizado por la M. en C. Linda Kempis, se observó que las muestras de linfocitos T CD4⁺ se agrupan por el tipo de nacimiento y no por la edad gestacional. En estos linfocitos T CD4⁺ se encontró que existen cerca de 5113 genes diferencialmente expresados, de los cuales 2442 son genes sobreexpresados en neonatos nacidos por cesárea y 2671 en nacidos por parto vaginal. Por otro lado, los linfocitos T CD8⁺ mostraron un agrupamiento por la edad gestacional y un total de 917 genes diferencialmente expresados, de los cuales 24 son sobreexpresados en neonatos de término y 893 en neonatos prematuros.

En el estudio anterior, también se identificaron vías importantes que son reguladas positivamente en linfocitos T CD4⁺ de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por parto vaginal, comparados con aquellos nacidos por cesárea. Estas vías incluyeron la regulación positiva de citocinas, metabolismo, función ribosomal y el factor transcripcional Tbet, importante para la diferenciación Th1. También se observó que los genes sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de neonatos prematuros, se agruparon en 21 vías. Estas vías fueron principalmente relacionadas al metabolismo, ciclo celular y señalización intracelular, sugiriendo que en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos prematuros son más activos que las células de neonatos de término.

En los últimos años, se han asociado diversas causas que pudieran afectar el desarrollo neonatal debido al nacimiento por cesárea: la exposición a diferentes niveles de estrés físico y hormonal, la colonización microbiana aberrante del tracto intestinal y la modificación epigenética de la expresión génica.

Por otro lado, se ha reportado que en los neonatos nacidos por parto vaginal, existe un incremento en el número de leucocitos en la sangre de cordón umbilical, alta expresión de los receptores de membrana CD16 y CD56, y un incremento de células T reguladoras. Las citocinas medidas en los partos vaginales muestran una elevada respuesta innata, con altos niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-8 y bajos niveles del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [39], [42].

En cambio, el nacimiento por cesárea se asocia con un incremento de neutrófilos y monocitos, pero una disminución de linfocitos al nacer; los monocitos presentan una

disminución en la expresión de TLR2 y TLR4. Además, se ha asociado con un incremento de IL-13 en respuesta a alérgenos, PHA y LPS, así como una disminución del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), de la respuesta proinflamatoria inducida por TLR (ej. IL-6 y TNF- α) y de la respuesta relacionada al perfil Th2 [38], [39], [42].

Sin embargo, los datos encontrados en la literatura acerca de los neonatos nacidos por cesárea nos dan pocas características acerca de la proliferación y activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Si bien es cierto que se ha reportado que existe una reducción en el número de linfocitos en los neonatos nacidos por cesárea en comparación con los nacidos por parto vaginal, no se han realizado estudios acerca de cómo responden estas células ante un estímulo. Principalmente, nos enfocamos en dos de las actividades más importantes durante la respuesta inmune: la proliferación y la activación de factores transcripcionales que son responsables de la activación funcional de los linfocitos.

En este trabajo, evaluamos la proliferación homeostática y con el estímulo CD3/CD28, y activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a través del TCR en presencia y ausencia de flagelina. Para esto, hicimos uso de citometría multiparamétrica, utilizando células mononucleadas de sangre de cordón umbilical como células de partida de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal.

JUSTIFICACIÓN

La mayor prevalencia de enfermedades alérgicas y diabetes durante la edad adulta en los neonatos nacidos por cesárea es una motivación importante para estudiar las respuestas celulares de los linfocitos T en sangre de cordón umbilical de estos neonatos. Los datos que se tienen en la literatura son limitados y el uso indiscriminado del nacimiento por cesárea sigue aumentando a nivel mundial y aún más en México. Este estudio nos permitirá una comprensión más profunda de los cambios en la respuesta celular desde la perspectiva del nacimiento por cesárea en comparación con el parto vaginal. Así mismo, es importante evaluar si el tratamiento con flagelina puede equilibrar la activación celular de neonatos nacidos por parto o cesárea, que pudiera llevar a una activación más equilibrada del sistema inmune neonatal.

HIPÓTESIS

La proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ será menor en CBMC's de neonatos nacidos por parto vaginal en comparación con los de cesárea. Por otra parte, la activación mediante la vía de TLR-5 será capaz de equilibrar la activación de los factores transcripcionales NFAT, AP-1 y NFκB en ambos casos.

OBJETIVOS

General:

Caracterizar la proliferación y activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre de cordón umbilical (CBMC's) de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea.

Particulares:

1. Analizar la proliferación homeostática y con los estímulos CD3/CD28 y CD3/flagelina de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea en comparación con los nacidos por parto vaginal.
2. Evaluar la activación de CBMC's de neonatos nacidos por cesárea al estimular por la vía del TCR y/o TLR5. Evaluaremos la activación de los factores transcripcionales NFAT, NF-κB y AP-1

METODOLOGÍA

Obtención de muestra de sangre de cordón umbilical

Para acceder a la obtención de la muestra de sangre de cordón umbilical, se contó con un permiso de Servicios de Salud Morelos para coleccionar dichas muestras del Hospital General de Temixco y sangre de adulto del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (expediente 1372/1706). Antes de la colecta de la sangre de cordón, se informó a la madre del estudio y se le pidió la firma de una carta de consentimiento informado, en la que se explica la utilidad de la sangre y que no representa ningún procedimiento invasivo para ella o su bebé. Únicamente se realizó la colecta de sangre de neonatos nacidos sanos y por parto natural o cesárea en el Hospital General de Temixco "Enf. Ma. De la Luz Delgado Morales"

Las muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por cesárea fueron obtenidas a partir de la punción de la vena del cordón, antes de la expulsión de la placenta. La sangre fue depositada en bolsas de colecta de sangre que contienen una solución salina con anticoagulante. Para los neonatos nacidos por parto natural se realizó el mismo procedimiento, con diferencia que no se realizó punción de la vena, sino que se esperó a que cortaran el cordón y se colectó la sangre en tubos falcon estériles con anticoagulante.

Purificación de células mononucleadas

Se obtuvieron células mononucleares a partir de sangre de cordón umbilical de neonatos de término y de cesárea (provenientes del Hospital general de Temixco "Enf. María de la Luz Delgado Morales"). Se utilizó una solución de un polisacárido hidrofílico altamente ramificado (Lymphoprep, Stemcell) con el que se generó un gradiente de densidad que separa en distintas fases a los eritrocitos y granulocitos, dejando arriba del Lymphoprep una capa blanca la cual se recupera (contiene células mononucleadas). Posteriormente se dejan en incubación con medio RPMI suplementado al 5% por una noche, con el fin de que los monocitos queden unidos a las cajas.

Estimulación de células mononucleadas

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 utilizada para el entrecruzador y los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 fue de 1 µg/ml. Se utilizaron distintos tiempos de estimulación, dependiendo del factor transcripcional, NFAT: 15 min, NF-κB (p65): 60 min, AP-1 (fosfo-cJun): 90 min, debido a que en estos tiempos se tiene la mayor activación de cada factor.

El TLR5 se estimuló con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3, Tonbo) y con Flagelina (InvivoGen), también se utilizó el entrecruzador goat anti-mouse (BIOSS). La concentración del entrecruzador y el anticuerpo anti-CD3 fue de 1 µg/ml y el de la flagelina fue de 25 ng/ml. Los tiempos de estimulación fueron los mismos que se utilizaron con el estímulo CD3/CD28.

Tinción de proteínas intracelulares

Posterior a la estimulación, se fijaron las células con paraformaldehído 1.5% a temperatura ambiente. Se les agregó metanol frío, se agitó y se incubó en frío. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos acoplados a fluoróforo, se consideran: anti-fosfo cJun (Genetex), anti-NFATc1 (Santa Cruz Biotech) y anti-fosfo NFATc1 (Invitrogen), anti-NFATc2 (Biorbyt), y anti-fosfo NFATc2 (Bioss), anti-p65 (Santa Cruz Biotech) y anti-fosfo p65 (Miltenyi Biotec). Después de la tinción, se dejaron incubando por 25 min, al cabo del cual, se realizó un lavado con FACS Juice (PBS 1X + SFB 2%), se decantó y finalmente se fijaron con paraformaldehído al 1.5%. Las concentraciones utilizadas para cada uno de los anticuerpos utilizados se describen en el apartado de anexos.

Tinción extracelular de marcadores de membrana

Después de la tinción intracelular, se realizó la tinción extracelular para identificar los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se colectaron las células y se les hizo un lavado con PBS 1X. Se agregaron los anticuerpos acoplados a fluoróforo (CD3 y CD4) y se incubaron por 25 min en oscuridad a 4°C. Para nuestros estudios fueron indispensables los marcadores de membrana CD3 VioletFluor 450 (TONBO), CD4 APC (TONBO) o CD8 APC (TONBO), para identificar a las poblaciones de células cooperadoras y citotóxicas. Posteriormente, se hizo un lavado con FACS Juice, se decantó, se fijaron con paraformaldehído 1.5% y se guardaron en oscuridad. Las concentraciones utilizadas para cada uno de los anticuerpos utilizados se describen en el apartado de anexos.

Proliferación celular

El ensayo de proliferación celular se hizo con el reactivo carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen, 200 mM) el cual se agregó a una concentración final de 1 μ M (diluido con PBS 1X), a las células en suspensión (densidad celular de 1×10^7 células/ml) con PBS 1X frío. Se incubaron por 5 min a 37°C en oscuridad, se detuvo el marcaje con suero fetal bovino (SFB 100%) en un volumen 1/5 por 5 min, se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se hizo un segundo lavado con FACS Juice. Finalmente, se repartieron las células en una caja de 24 pozos, con una densidad celular de 2×10^6 células/ml, posteriormente, se realizó la

estimulación correspondiente. Para estimular el TCR/CD28: CD3 (1 µg/ml), CD28 (1 µg/ml) y Goat anti-mouse IgG (1 µg/ml); para estimular el TLR5: CD3 (1 µg/ml), flagelina (25 ng/ml) y Goat anti-mouse IgG (1 µg/ml). Al terminar las 96h de estimulación, se realizó el procedimiento de tinción extracelular para teñir las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, al término de la tinción, se fijaron las células con paraformaldehído al 1.5%.

Citometría de flujo

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 utilizó también la compensación de los fluoróforos para restar el solapamiento de los espectros de emisión. Los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo v10.0.7, el análisis estadístico con GraphPad Prism V8 y Microsoft Excel.

Paneles de fluorocromos utilizados para la tinción intra y extra celular.

La tabla 1 muestra los fluorocromos que se usaron para teñir. Los factores transcripcionales marcados con * utilizan como anticuerpo secundario un anti-rabbit unido al fluoróforo FITC (TONBO), mientras que los demás anticuerpos se encuentran unidos directamente al fluoróforo correspondiente. Aquellos que muestran una **p-** se refiere a la fosforilación en el aminoácido correspondiente.

Fluorocromo	Panel NFATc1	Panel NFATc2	Panel p65 fosfo	Panel p65 total	Panel cJun fosfo
FITC	p-NFATc1 Ser264*	NFATc2	CD8	p65*	p-cJun Ser63*
PerCp-Cy5.5	NFATc1				
APC	CD4	CD4	p-p65 Ser529	CD4	CD4
Violet 450	CD3	CD3	CD3	CD3	CD3
Cy7		p-NFATc2 Ser326			

Tabla 1. Fluorocromos utilizados para medir la activación de factores transcripcionales y la presencia de moléculas de la membrana celular de los linfocitos T.

Los anticuerpos de moléculas de membrana se colocaron posterior a la estimulación y se siguió el protocolo de tinción extracelular, posteriormente se realizó la perforación de la membrana con metanol y se siguió el protocolo de tinción intracelular para teñir los factores transcripcionales.

RESULTADOS

Estrategia de selección de poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Las CBMC's de cordón umbilical están compuestas por diversos tipos celulares, entre ellos se encuentran los linfocitos (B, T y NK), monocitos y granulocitos (basófilos, neutrófilos y eosinófilos), entre otros. Para identificar a nuestras células de interés, se realizó el etiquetado fluorescente de marcadores de membrana que son específicos de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. A continuación, se presenta la estrategia que se empleó para seleccionar a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a partir de anticuerpos que se unen a los marcadores de membrana CD3 (forma parte del TCR) y CD4 (co-receptor de linfocitos T CD4⁺).

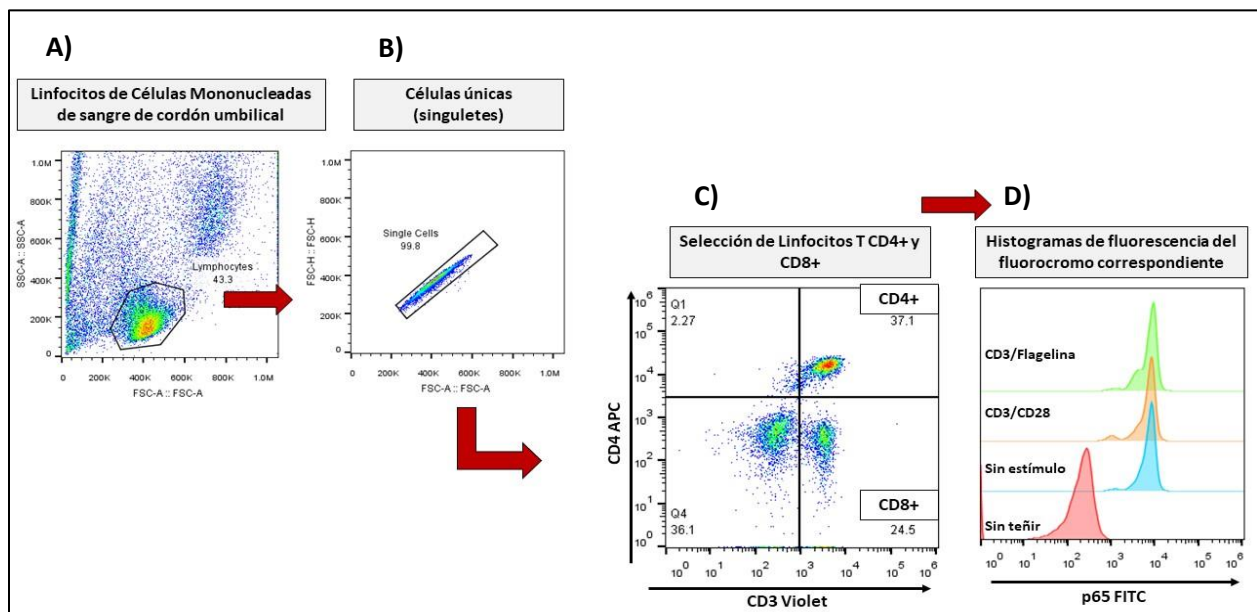


Figura 4. Estrategia de selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se muestra la estrategia empleada para la selección de los linfocitos T y el análisis de fluorescencia. A) Selección de linfocitos de las células mononucleadas de sangre de cordón. B) Selección de células únicas (singuletes). C) Células T CD4⁺ doble positivas (CD3+CD4+) y T CD8⁺

(CD3+CD4-). D) Análisis de la intensidad media de fluorescencia de cada uno de los factores transcripcionales y estímulos realizados.

En la figura 4 se muestra la estrategia que se utilizó para seleccionar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En el panel 4A se seleccionaron las células que corresponden a los linfocitos, por las características de tamaño, volumen y granularidad. Posteriormente, en el panel 4B, se observó el área y altura de las células (FSC-A y FSC-H), lo que permitió seleccionar las células únicas, aquellas que pasaban individualmente en el haz de luz laser del citómetro.

El paso siguiente fue seleccionar estas células únicas y a partir de ellas observar los marcadores de membrana (CD3 y CD4), aquellas que eran CD3+CD4⁺ fueron los linfocitos T cooperadores (T CD4⁺) y los que eran CD3+CD4⁻ fueron los linfocitos T citotóxicos (T CD8⁺), panel 4C. Finalmente, se seleccionaron ambas poblaciones de linfocitos y se realizó el análisis de fluorescencia del fluoróforo acoplado al anticuerpo correspondiente (panel 4D).

Muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas de nacimientos de término por cesárea y parto natural

Para proceder a realizar los experimentos, se tuvieron en cuenta las características de los neonatos al nacer, esto nos permitió saber si existieron procesos patológicos que pudieran afectar el resultado de los experimentos. Aquellas muestras de neonatos que si presentaron procesos patológicos fueron descartadas, las que no, se muestran a continuación.

En la tabla 2 se muestran las características de los neonatos al nacer: la temperatura que presentaron estuvo entre 36 y 37.5 °C, por lo que no muestran fiebre al nacer, el peso se encuentra entre 3.1 y 4 kg. El Capurro se refiere a las semanas de gestación (SDG) al nacer y se encuentra entre 39 y 41 SDG para los neonatos de cesárea y entre 37 y 40 SDG para los de parto vaginal, que entra en lo que se considera neonatos de término. El APGAR se encuentra entre 8 y 9 tanto en neonatos de cesárea como de parto vaginal de un total de 9 puntos, por lo que presentaron una buena tolerancia al alumbramiento.

Neonato	Sexo	Temperatura (°C)	Peso (Kg)	Capurro (SDG)	APGAR
Neonatos nacidos por cesárea					
1	M	37.0	3.500	39	9/9
2	M	36.7	4.000	40	9/9
3	M	36.0	3.110	40	8/9
4	F	37.1	3.180	41	8/9
5	M	37.0	4.205	39	8/9
6	M	37.0	3.290	41	8/9
Neonatos nacidos por parto vaginal					
1	F	36.0	3.165	41	8/9
2	M	36.0	2.650	37	8/9
3	M	36.5	3.780	38	8/9

Tabla 2. Datos de los bebés nacidos por cesárea y parto. Se muestran las principales características que se miden en los recién nacidos para evaluar su estado de salud.

Los neonatos de los que se obtuvieron las muestras, mostraron un muy buen estado de salud, no presentaron fiebre y toleraron bien el proceso de alumbramiento, el Capurro nos indicó que todos fueron neonatos de término.

Activación de factores transcripcionales en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

La citometría de flujo es una herramienta que permite analizar un gran número de moléculas y organelos celulares, tanto en la superficie celular, como en el interior (citoplasma, núcleo, RE, mitocondrias, entre otros). Distintos autores han reportado el uso de la citometría de flujo para fenotipificar poblaciones sanguíneas, además de la caracterización de un gran número de metabolitos, factores transcripcionales, proteínas de membrana, proteínas solubles, entre otros [46]–[49].

Para evaluar el balance en la activación de los tres principales factores de transcripción, se procedió a evaluarlos individualmente, después de que se activaron por el estímulo TCR/CD28 o TCR/Flagelina. Cada uno de los factores transcripcionales fue medido a nivel de la proteína total y fosforilada, excepto cJun, el cual en experimentos anteriores nos indicaron que no presenta cambios a nivel de la proteína total.

La activación de NFAT se evaluó analizando la disminución de la fluorescencia de los anticuerpos phospho-NFATc1 y phospho-NFATc2; la activación de NF-κB y cJun, mediante el aumento en la fluorescencia de phospho-p65 y phospho-cJun,

respectivamente. Se calculó la media y la desviación estándar de los 6 neonatos nacidos por cesárea y 3 nacidos por parto vaginal. Se hizo un test de Kruskal-Wallis para conocer si existen diferencias estadísticamente significativas.

NFATc1

Para evaluar la activación de este factor transcripcional, evaluamos al NFATc1 total y fosforilado como se muestra en la Figura 5. En los linfocitos T CD4⁺ de cesárea, se observó una disminución del IMF del NFATc1 total con el estímulo CD3/CD28 en comparación con el control sin estimular ($p < 0.05$, Fig. 5A). Por otro lado, el IMF del NFATc1 fosforilado no cambió significativamente con el estímulo CD3/CD28 y CD3/Flagelina en linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal y cesárea (Fig. 5B).

En los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de cesárea (Fig. 6) se observó una disminución del IMF del NFATc1 total y fosforilado tanto con el estímulo CD3/CD28 ($p < 0.05$) como con el estímulo CD3/Flagelina ($p < 0.05$). Por otro lado, en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de parto vaginal, se observó una tendencia al aumento del IMF del NFATc1 total en comparación con los valores sin estimular, aunque los valores no fueron significativos.

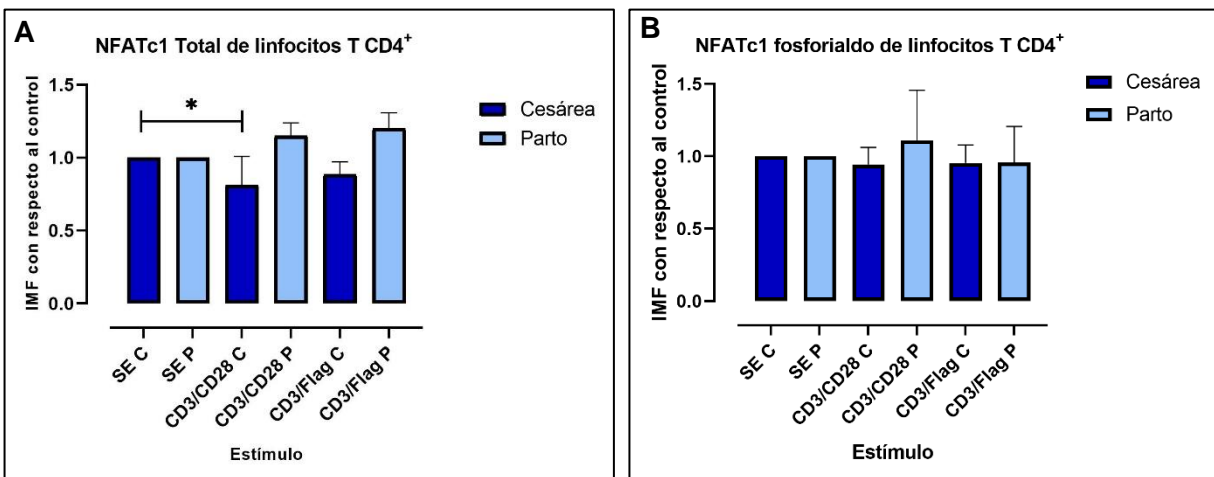


Figura 5. IMF de NFATc1 total (A) y fosforilado (B) en linfocitos T CD4⁺. Se grafica la media y desviación estándar de cada estímulo a los 15 min. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente. SE: sin estímulo, Flag: flagelina.

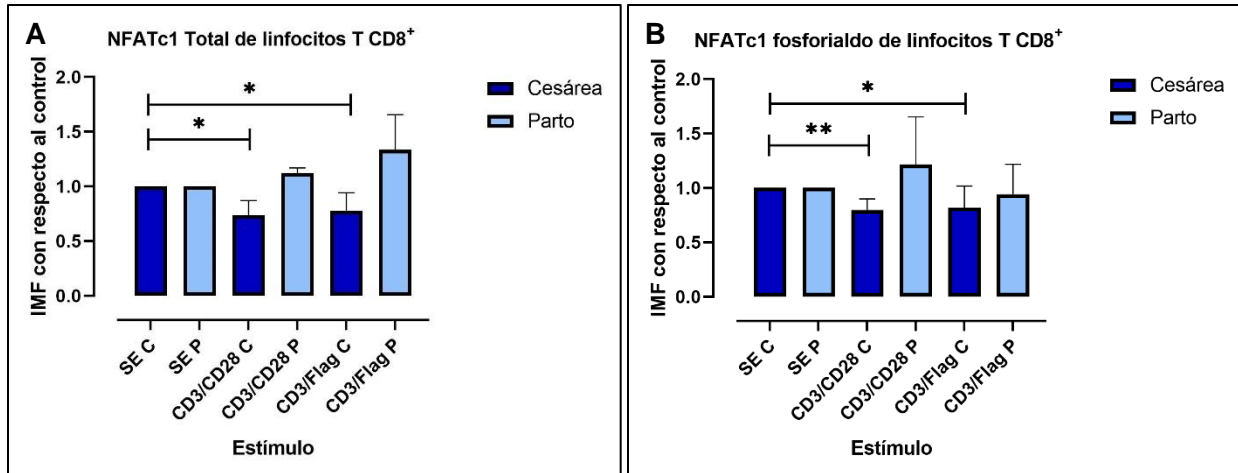


Figura 6. IMF de NFATc1 total (A) y fosforilado (B) en linfocitos T CD8⁺. Se grafica la media y desviación estándar de cada estímulo a los 15 min. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente. SE: sin estímulo, Flag: flagelina.

La activación del factor transcripcional NFATc1, se debería observar con un aumento de la proteína total y una disminución de la proteína fosforilada, ya que este factor se desfosforila para translocarse al núcleo. En los neonatos nacidos por cesárea se observó, como esperábamos, una disminución en la proteína fosforilada en respuesta a los estímulos con CD3/CD28 y CD3/Flagelina en los linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, también observamos una disminución de la fluorescencia en la proteína total, que es opuesto a lo esperado. Por lo que se abordarán posibles escenarios de esto que ocurre en la sección de discusión.

NFATc2

Para evaluar la activación de NFATc2, seguimos el mismo protocolo realizado para el factor NFATc1, es decir, estimular con CD3/CD28 y CD3/flagelina por 15 min, posteriormente, teñir las poblaciones de linfocitos y finalmente realizar la tinción intracelular de la proteína total y fosforilada. En la figura 7 se muestran los valores de IMF de NFATc2 total y fosforilado en linfocitos T CD4⁺, se observa que existe un aumento de la proteína total al estimarse con CD3/Flagelina en los neonatos de cesárea ($p < 0.05$). En el caso de la proteína fosforilada, no se observaron resultados significativos en ninguno de los estímulos.

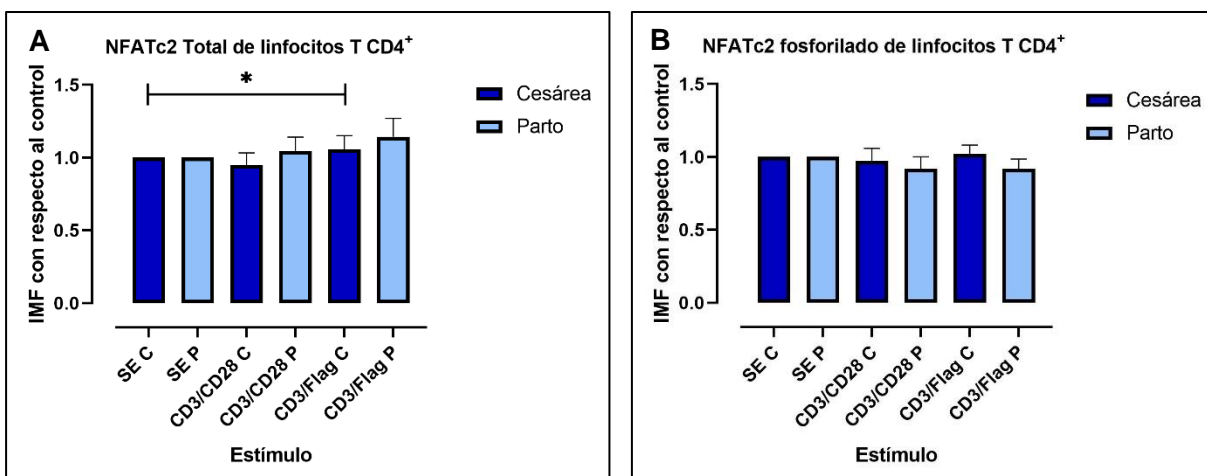


Figura 7. IMF de NFATc2 total (A) y fosforilado (B) en linfocitos T CD4⁺. Se grafica la media y desviación estándar de cada estímulo a los 15 min. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente. SE: sin estímulo, Flag: flagelina.

En la figura 8 se muestra el IMF del NFATc2 total y fosforilado en linfocitos T CD8⁺ de neonatos de cesárea y parto vaginal. No se observaron diferencias significativas ni en la proteína total ni la fosforilada.

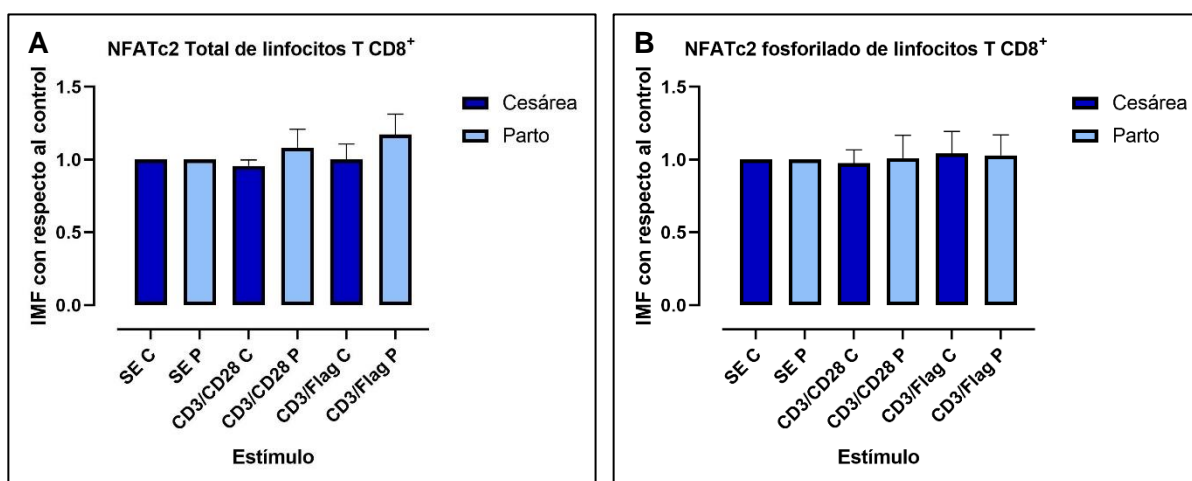


Figura 8. IMF de NFATc2 total (A) y fosforilado (B) en linfocitos T CD8⁺. Se grafica la media y desviación estándar de cada estímulo a los 15 min. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente. SE: sin estímulo, Flag: flagelina.

No fue posible percibir cambios en la fluorescencia al evaluar el factor transcripcional NFATc2, esto pudiera deberse a que el tiempo empleado no es el óptimo para lograr medir un cambio en la proteína total y fosforilada. Sin embargo, fue posible observar una tendencia de aumento en la proteína total de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los neonatos de parto vaginal.

NF-kB (p65)

Posterior a la estimulación de las CBMC's por 60 min, se procedió a realizar la tinción extracelular para identificar los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y después la tinción intracelular de la proteína p65 total y fosforilada.

En la figura 9 se muestra el IMF de p65 total (A) y fosforilado (B) de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea y parto vaginal. En los linfocitos T CD4⁺ de cesárea se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) de la proteína fosforilada con el estímulo CD3/Flagelina en comparación con el control sin estimular, mientras que en las células tratadas con CD3/CD28 no hubo cambios en la fosforilación de la proteína. A nivel de la proteína total, no hubo diferencias significativas con respecto al control. Por otro lado, los linfocitos T CD4⁺ de parto vaginal, no mostraron diferencias significativas a nivel de proteína total y fosforilada con respecto al control.

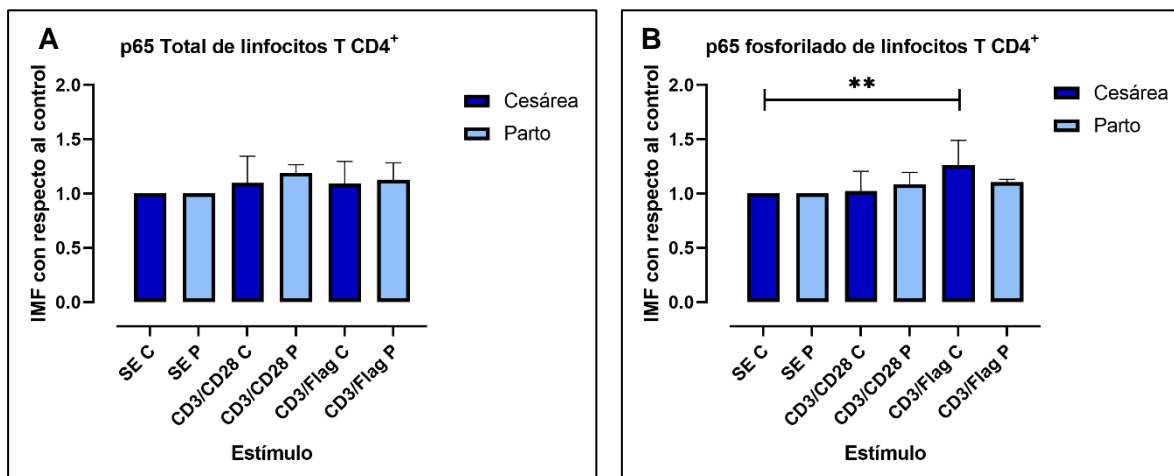


Figura 9. IMF de p65 total (A) y fosforilado (B) en linfocitos T CD4⁺. Se grafica la media y la desviación estándar de cada estímulo a los 60 min. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente. SE: sin estímulo, Flag: flagelina.

En la figura 10 se muestran los valores de IMF de p65 total (A) y fosforilado (B) de linfocitos T CD8⁺ de neonatos de cesárea y parto vaginal. Al evaluar p65 fosforilado, se encontró un aumento significativo con el estímulo CD3/CD28 en neonatos de parto con respecto al control sin estimular ($p < 0.05$). Por otro lado, es posible observar una tendencia de aumento de la fosforilación de p65 con el estímulo CD3/Flagelina en los linfocitos de neonatos nacidos por cesárea. No se observaron cambios en la fluorescencia de la proteína p65 total en neonatos de parto y cesárea al comparar con el control sin estimular.

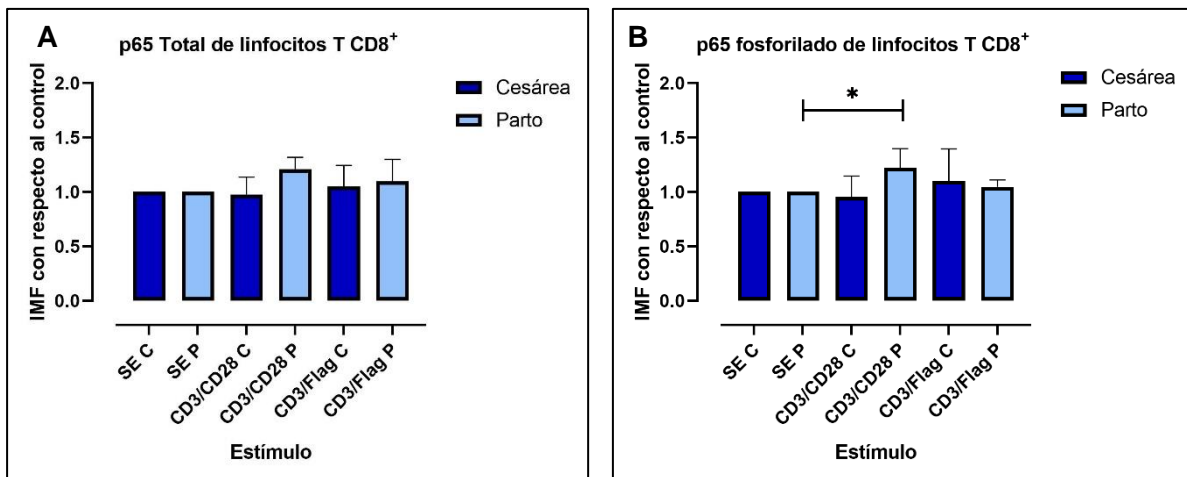


Figura 10. IMF de p65 total (A) y fosforilado (B) en linfocitos T CD8⁺. Se grafica la media y la desviación estándar de cada estímulo a los 60 min. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente. SE: sin estímulo, Flag: flagelina.

Al analizar la activación de NF- κ B, la proteína p65 fosforilada en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea, mantuvo niveles casi basales con el estímulo CD3/CD28, pero mostró un aumento considerable con el estímulo CD3/Flagelina ($p < 0.01$) y se observó una tendencia de aumento de la fosforilación con el mismo estímulo en los linfocitos T CD8⁺. Para el caso de la proteína total, no se observaron diferencias significativas. Esto nos indica que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea fueron capaces de reconocer a la flagelina y activar la vía del TLR-5.

AP-1 (phospho cJun)

Posterior a la estimulación de las CBMC's de neonatos de parto y cesárea por 90 min, se procedió a realizar la tinción extracelular de marcadores de membrana, después se realizó la tinción del factor transcripcional cJun fosforilado. En estudios previos habíamos encontrado que cJun total no cambia durante la activación, por lo que no se incluyó en esta evaluación.

En la figura 11 se muestra el IMF de cJun fosforilado en linfocitos T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) de neonatos nacidos por cesárea y parto. En los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea se observó un aumento de la proteína fosforilada con el estímulo CD3/Flagelina ($p < 0.05$). Por otro lado, en los neonatos nacidos por parto, se observó un aumento de la fosforilación de cJun con el estímulo CD3/CD28 ($p < 0.05$) y CD3/Flagelina ($p < 0.05$) con respecto al control sin estimular.

Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de parto y cesárea no mostraron diferencias significativas a nivel de la proteína fosforilada. Sin embargo, se observa una tendencia de aumento de la fosforilación en ambos grupos con el estímulo CD3/Flagelina, en comparación con el control sin estimular.

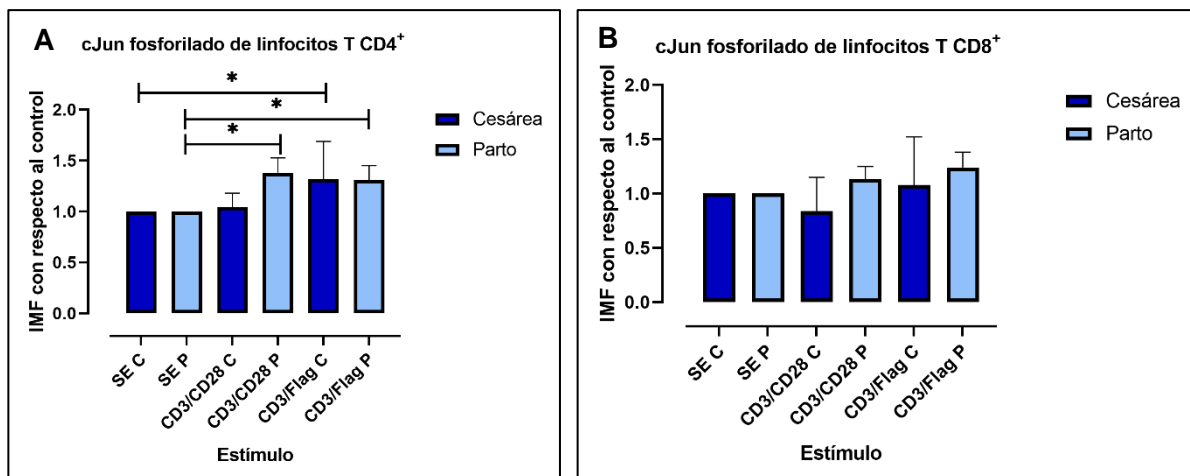


Figura 11. IMF de cJun fosforilado en linfocitos T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B). Se grafica la media y la desviación estándar de cada estímulo a los 90 min. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente. SE: sin estímulo, Flag: flagelina.

Los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal mostraron una mayor activación del factor transcripcional AP-1 con los estímulos realizados. Sin embargo, en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal y de los nacidos por cesárea, se observó que respondieron al estímulo CD3/Flagelina.

Proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Una de las fases más importantes de la respuesta inmune (bajo estimulación antigénica), es la proliferación de los linfocitos T. Esta actividad tiene lugar cuando ocurre la activación de los linfocitos T, y comienzan a producirse citocinas (p.e. IL-2) que estimulan la proliferación celular. Es necesario conocer el efecto que tiene el tipo de nacimiento en esta fase de la respuesta inmune, esto nos permitirá conocer si existen diferencias en la proliferación celular en los neonatos nacidos por parto vaginal y en los nacidos por cesárea.

Sin embargo, otro tipo de proliferación que experimentan los linfocitos T, es la proliferación homeostática, este se caracteriza por el aumento del número de células vírgenes para compensar una disminución en la cantidad normal de células, en ausencia de un estímulo antigénico. Este proceso nos permite saber, si los linfocitos neonatales proliferan a pesar de no ser estimulados por alguna vía. Como se mencionó en los antecedentes, los neonatos, en general, muestran un estado linfopénico al nacer, lo que promovería la proliferación homeostática [20], [30].

Para evaluar la proliferación celular de los linfocitos neonatales en función y ausencia de los estímulos, se utilizó el reactivo CFSE (carboxifluoresceína), el cual es altamente permeable a la membrana celular. Cuando interacciona el CFSE con las células, se difunde de manera pasiva al citoplasma celular, una vez dentro, es modificado por esterasas, las cuales escinden los grupos éster del reactivo, provocando que disminuya su permeabilidad. Con cada división celular, el CFSE también se divide a cada célula resultante, por lo que la fluorescencia de las células hijas es menor a las células madres. Esta disminución de la fluorescencia fue captada en el citómetro de flujo, en el que se analizaron histogramas con varios picos, que comienzan con una intensidad de fluorescencia alta, hasta la más baja.

Para evaluar la proliferación en función del estímulo CD3/CD28, se incubaron 2×10^6 CBMC's y se estimularon en una placa de plástico estéril por 96 h con los anticuerpos anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) y con el entrecruzador Goat-anti mouse IgG (1 $\mu\text{g/ml}$).

Además de estimular la proliferación celular con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, se realizó a la par otro experimento para analizar el efecto de la flagelina en la proliferación celular. Para esto, se estimuló con anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$), Flagelina (25 ng/ml) y entrecruzador Goat anti-mouse IgG (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 96h. Estos datos se muestran posteriormente.

Proliferación homeostática de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Para evaluar la proliferación homeostática de los linfocitos neonatales, se tiñeron 10×10^6 CBMC's siguiendo el protocolo de tinción con CFSE (5 μM). De las células teñidas, se incubaron 2×10^6 CBMC's en una placa de plástico estéril por 96 h, esto fue realizado en ausencia de anticuerpos de entrecruzamiento y solamente con suficiente medio RPMI suplementado al 5% de SFB. Con estos experimentos lograremos saber si los linfocitos neonatales son capaces de proliferar en ausencia de estímulos, debido al estado linfopénico que presentan al nacer.

Posterior a las 96 h de incubación, se procedió a teñir las CBMC's con anticuerpos que reconocen las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Para realizar esto, se ocuparon los anticuerpos: anti-CD4 APC (TONBO) y anti-CD8 VioletFluor (TONBO), las diluciones empleadas se muestran en el apartado de anexos. Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído (1.5%).

En la figura 12 se muestra la estrategia de selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se seleccionaron las células, que por sus características morfológicas (medidas con los láseres Forward scatter y Side scatter), son linfocitos (A). Posteriormente, se seleccionaron las células únicas o singuletes, las cuales son células que pasan una por una en los láseres del citómetro (B). De ese gate de células, se seleccionaron los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (C). Finalmente, se analizó la disminución de la fluorescencia del CFSE debido a la proliferación celular de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (D, E).

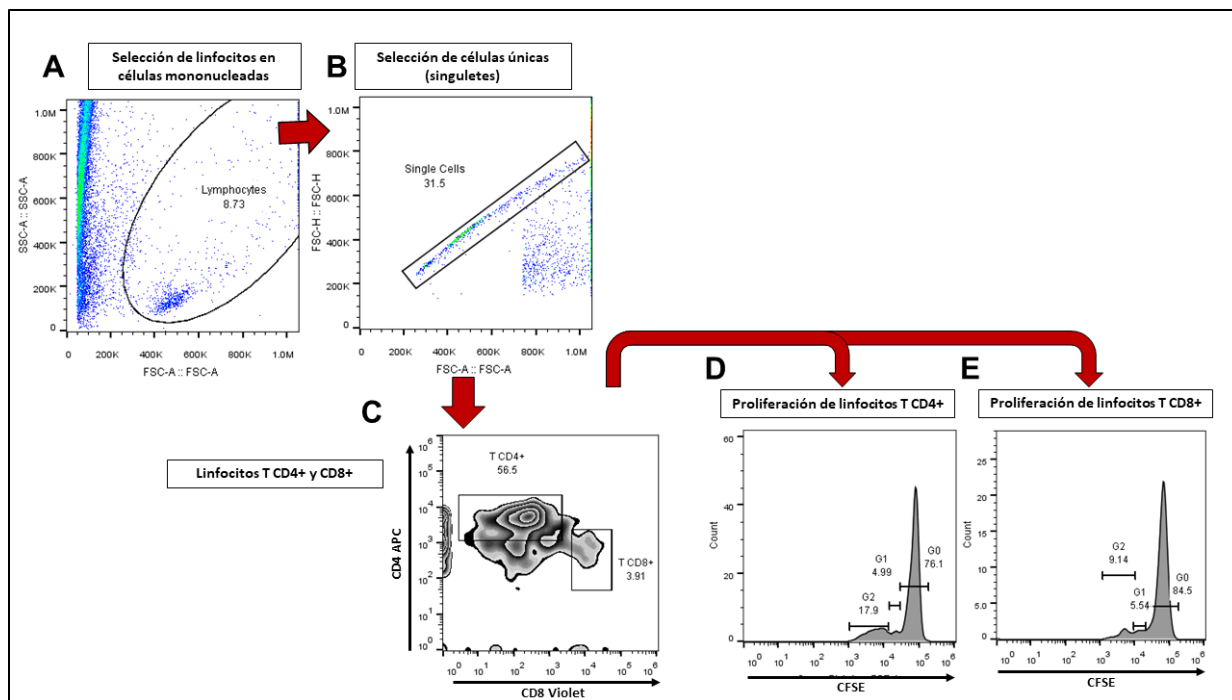


Figura 12. Estrategia de selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ incubados por 96 h. **A)** Selección de linfocitos que proliferaron. **B)** Selección de células únicas (singletes). **C)** Poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. **D, E)** Disminución de fluorescencia de CFSE de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, cada pico representa una generación formada.

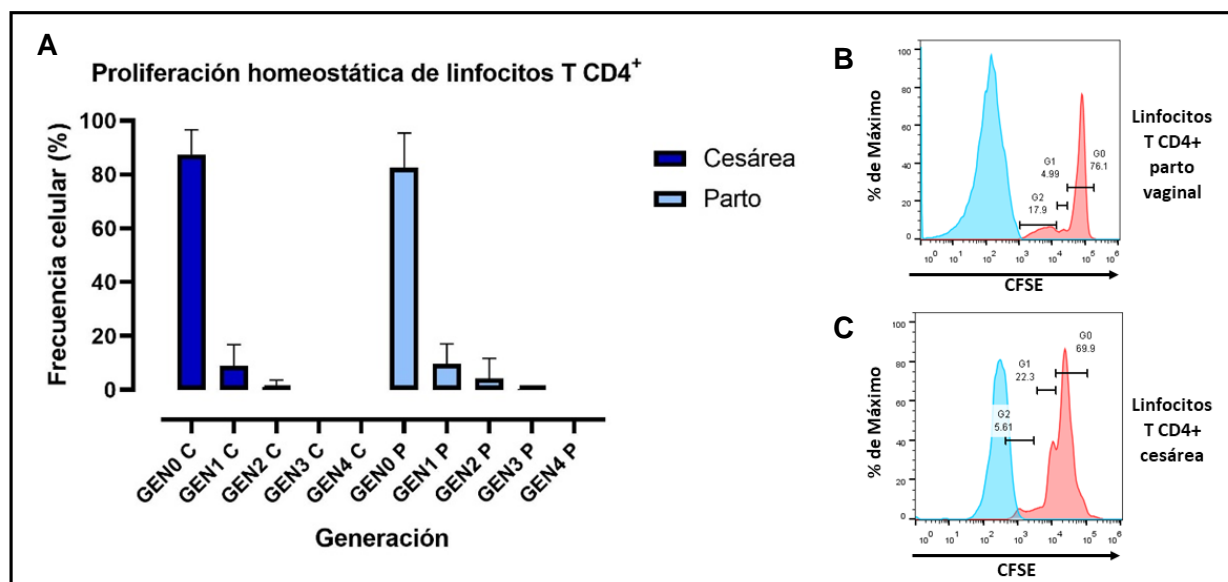


Figura 13. Proliferación homeostática de linfocitos T CD4⁺. **A)** Frecuencia celular de las generaciones de linfocitos medidas con CFSE. **B)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal. **C)** Histograma

de las generaciones que se obtuvieron en linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea. Color azul: control sin teñir, rojo: células incubadas por 96 h, cada pico representa una generación formada. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente.

En la figura 13 y 14 se muestran las generaciones que se formaron a partir de la proliferación homeostática de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de cesárea y parto. Se observa que los linfocitos T, tanto de neonatos de parto vaginal como de cesárea, proliferan a pesar de no ser estimuladas. Se obtuvieron en promedio dos generaciones en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los neonatos de cesárea, mientras que en los neonatos de parto se obtuvieron tres generaciones en los linfocitos T CD4⁺ y dos generaciones en los linfocitos T CD8⁺.

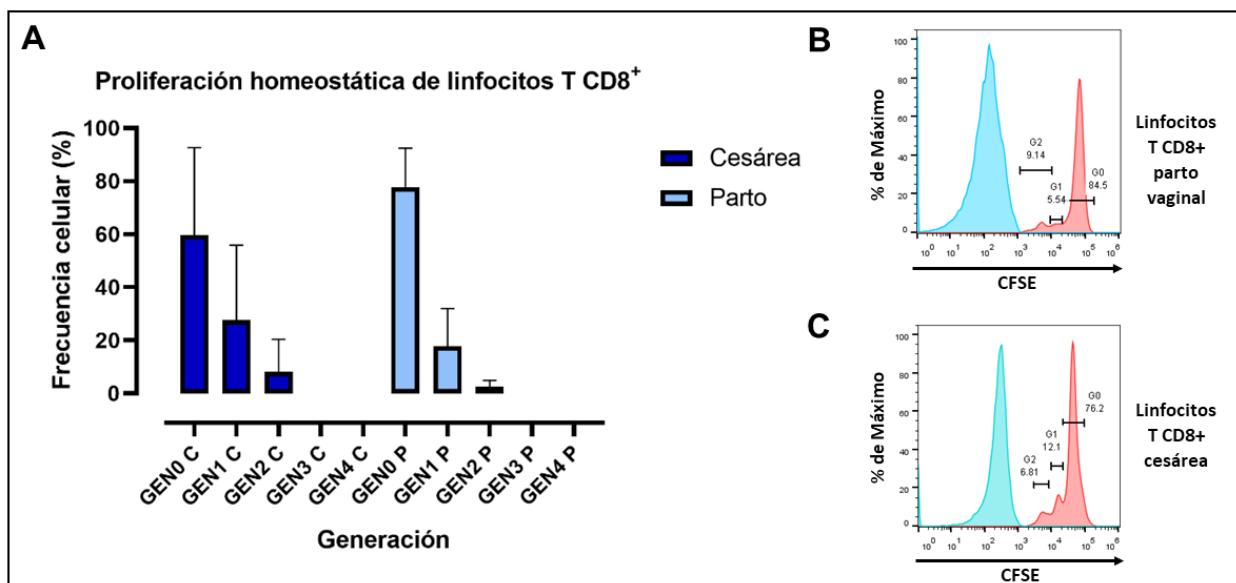


Figura 14. Proliferación homeostática de linfocitos T CD8⁺. **A)** Frecuencia celular de las generaciones de linfocitos medidas con CFSE. **B)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de parto vaginal. **C)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en linfocitos T CD8⁺ de neonatos de cesárea. Color azul: control sin teñir, rojo: células incubadas por 96 h, cada pico representa una generación formada. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente.

Con los resultados obtenidos en esta sección, se puede decir que los neonatos, tanto de parto vaginal como de cesárea, son capaces de proliferar en ausencia de un estímulo. Como se mencionó en la introducción, esto puede ser debido al estado linfopénico con el que nacen los neonatos. Es importante tener en cuenta esta actividad en los siguientes experimentos, ya que es necesario restarle este proceso a las células que son estimuladas.

Proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ estimulados con CD3/CD28

Para evaluar la proliferación celular con el estímulo CD3/CD28, se siguió el mismo protocolo que fue descrito en los experimentos de proliferación homeostática, con la excepción de que en esta ocasión las células si fueron estimuladas con anti-CD3 (1 µg/ml), anti-CD28 (1 µg/ml) y el entrecruzador Goat anti-mouse IgG (1 µg/ml). Estos experimentos no permitirán conocer la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ neonatales de responder a la estimulación con la proliferación celular.

Al final el tiempo de estimulación, los linfocitos fueron teñidos con anti-CD4 APC (TONBO) y anti-CD8 VioletFluor (TONBO), siguiendo el protocolo de tinción extracelular; las diluciones empleadas se encuentran en el apartado de anexos.

En la figura 15 se muestra la estrategia de selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se seleccionaron las células, que por sus características morfológicas son linfocitos (A). Posteriormente, se seleccionaron las células únicas o singuletes, las cuales son células que pasan una por una en los láseres del citómetro (B). De ese gate de células, se seleccionaron los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (C). Finalmente, se analizó la disminución de la fluorescencia del CFSE debido a la proliferación celular de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (D, E), cada uno de los picos observados representa una generación formada por la división celular.

A partir de los datos de frecuencia celular de los histogramas obtenidos en la figura 15D y E, se realizaron las gráficas de barras correspondientes. Se tomó en cuenta la proliferación homeostática que presentaron los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de parto vaginal y cesárea. Los porcentajes de este proceso fue restado de los porcentajes de frecuencia celular obtenidos en los experimentos de estimulación con CD3/CD28.

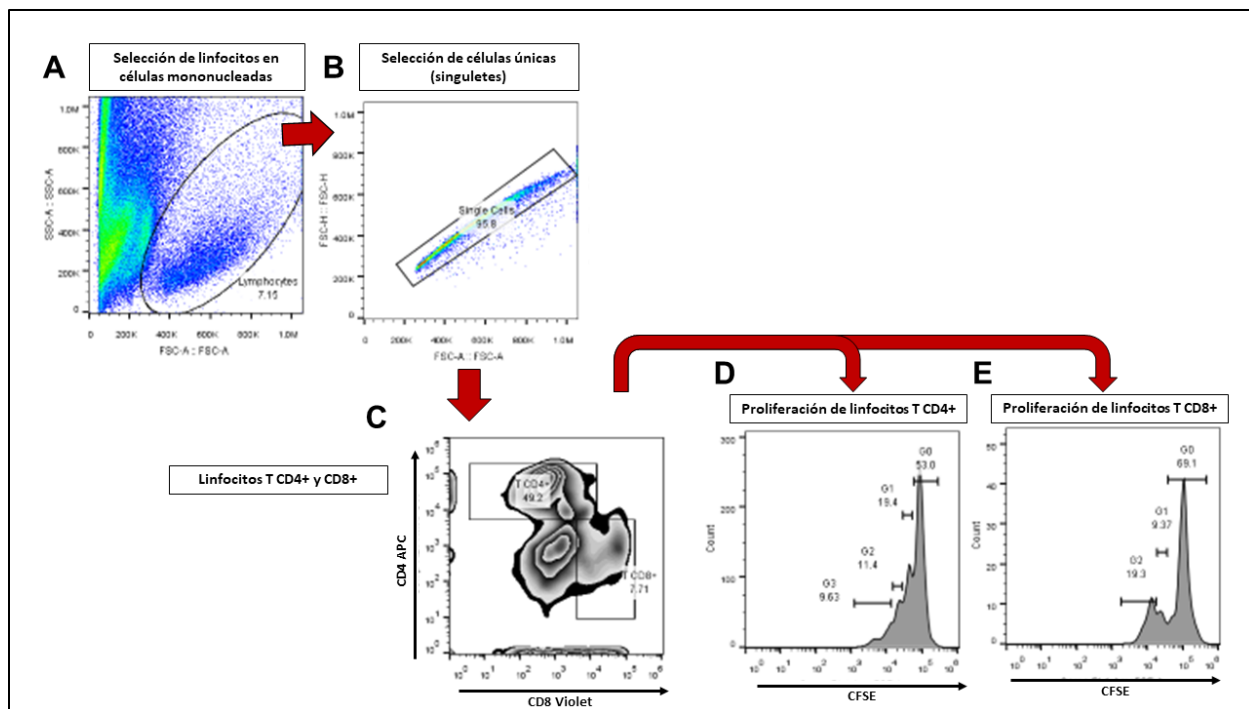


Figura 15. Estrategia de selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ incubados por 96 h.
A) Selección de linfocitos que proliferaron. **B)** Selección de células únicas (singletes).
C) Poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. **D, E)** Disminución de fluorescencia de CFSE de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, cada pico representa una generación formada.

En la figura 16A, se muestra la frecuencia celular de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea y parto que proliferaron con el estímulo CD3/CD28 durante 96 h, así como las generaciones que se formaron, debido a las divisiones celulares, durante este periodo de tiempo. En la figura 12 B y C, se muestran los histogramas con los que se analizó la proliferación, se representa el control sin teñir (naranja), el control de la generación 0 (azul) y los linfocitos estimulados (rojo).

En la figura 16A se observa que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea son capaces de proliferar tras la estimulación, llegando a formar hasta 4 generaciones con diferentes porcentajes de frecuencia celular, siendo en promedio la generación 1 la más predominante. Por otro lado, se observó que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto, proliferan pobremente tras ser estimulados. Estos formaron un

máximo de 3 generaciones con porcentajes de frecuencia celular por debajo del 20%, y la generación 0 fue la más predominante.

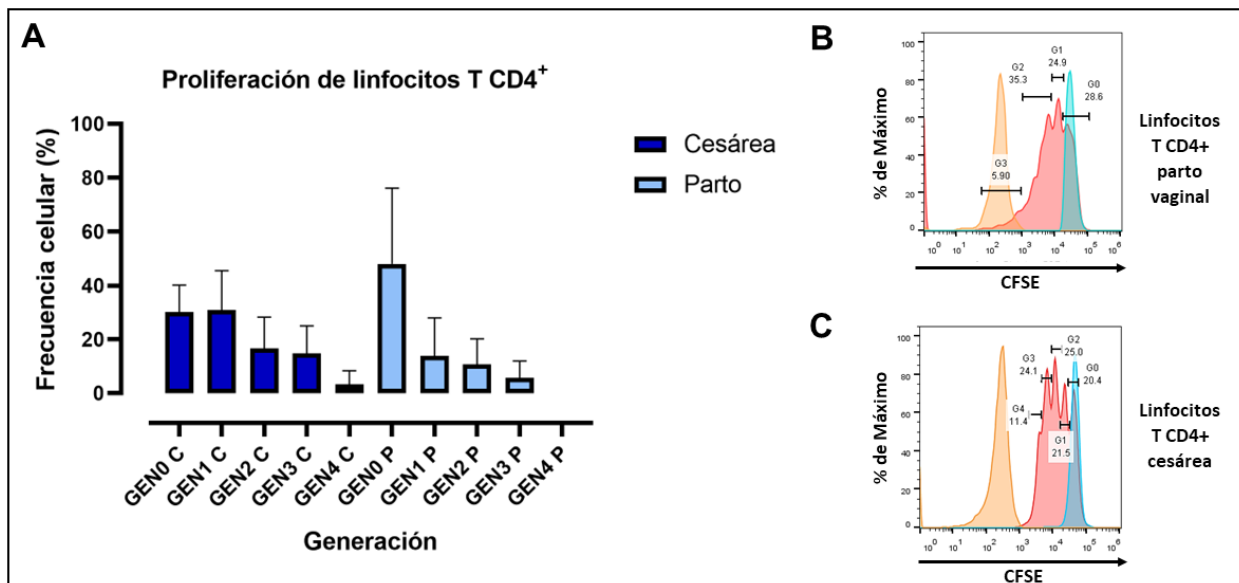


Figura 16. Proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados con CD3/CD28. A) Frecuencia celular de las generaciones de linfocitos medidas con CFSE. **B)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal. **C)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea. Color azul: control generación 0, naranja: control sin teñir, rojo: células estimuladas por 96 h, cada pico representa una generación formada. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente.

En la figura 17A se muestra la gráfica de barras con las frecuencias celulares obtenidas de la proliferación celular. Se observa que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de cesárea, son capaces de responder con la proliferación celular tras la estimulación, llegando a formar hasta 4 generaciones con diferentes porcentajes de frecuencia celular, siendo en promedio la generación 0 ligeramente más predominante. Por otro lado, los linfocitos T CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal respondieron pobremente a la proliferación celular tras ser estimulados (Fig. 17A, azul claro). Estas células formaron hasta 2 generaciones con porcentajes de frecuencia celular por debajo del 35%, por lo que la generación 0 fue la más predominante.

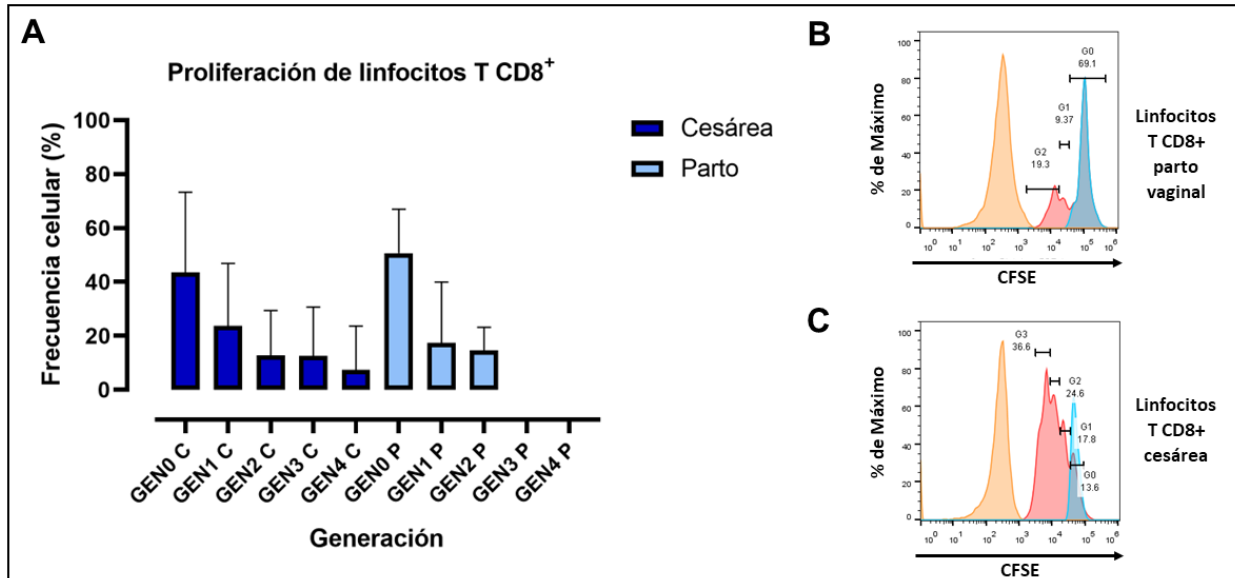


Figura 17. Proliferación de linfocitos T CD8⁺ estimulados con CD3/CD28. A) Frecuencia celular de las generaciones de linfocitos medidas con CFSE. **B)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de parto vaginal. **C)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en linfocitos T CD8⁺ de neonatos de cesárea. Color azul: control generación 0, naranja: control sin teñir, rojo: células estimuladas por 96 h, cada pico representa una generación formada. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente.

Se ogra observar una diferencia entre las células en la capacidad de respuesta ante un estímulo. Por un lado, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea proliferan de la manera en que aumentan su número de generaciones y se distribuye su frecuencia celular a lo largo de las generaciones formadas. Sin embargo, esto no se observó en los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal, ya que estos solamente llegaron a formar hasta tres generaciones, con la mayor cantidad de frecuencia celular en la generación inicial (G0). Esto nos indica que los linfocitos de neonatos de cesárea tienen una mayor proliferación celular en respuesta al estímulo CD3/CD28.

Efecto de la Flagelina en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Al igual que en los experimentos de proliferación con células estimuladas con CD3/CD28, en esta sección se tiñeron CBMC's con el reactivo CFSE y fueron estimuladas con anti-

CD3 (1 µg/ml), flagelina (25 ng/ml) y entrecruzador Goat anti-mouse IgG (1 µg/ml) por 96h. Posteriormente, se colectaron las células y se les realizó la tinción de membrana para identificar a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

En la figura 18 se muestra la estrategia de selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se seleccionaron las células, que por sus características morfológicas son linfocitos (A). Posteriormente, se seleccionaron las células únicas o singuletes, las cuales son células que pasan una por una en los láseres del citómetro (B). De ese gate de células, se seleccionaron los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (C). Finalmente, se analizó la disminución de la fluorescencia del CFSE debido a la proliferación celular de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (D, E), cada uno de los picos observados representa una generación formada por la división celular.

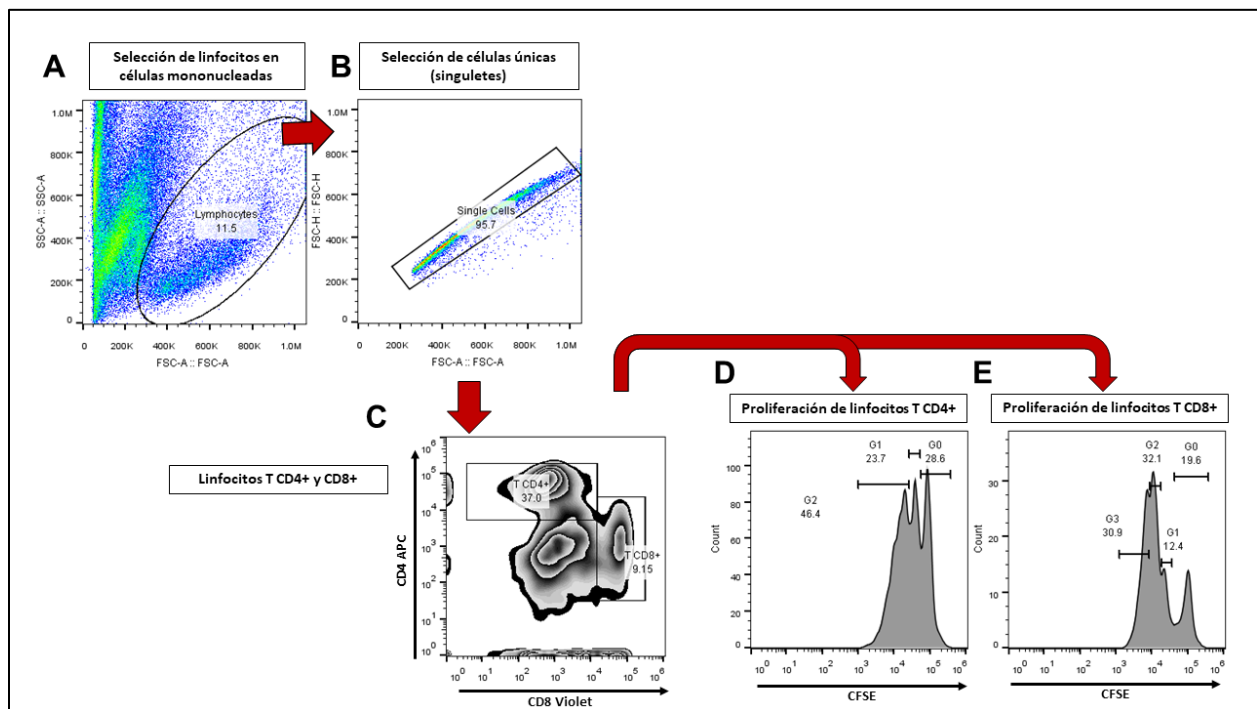


Figura 18. Estrategia de selección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ incubados por 96 h.

A) Selección de linfocitos que proliferaron. **B)** Selección de células únicas (singuletes). **C)** Poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. **D, E)** Disminución de fluorescencia de CFSE de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, cada pico representa una generación formada.

En la figura 19A se observa que los linfocitos T CD4⁺ de cesárea responden pobremente al estímulo CD3/Flagelina en comparación con lo observado con el estímulo CD3/CD28 (Fig.16A), ya que solamente se logró obtener un máximo de dos generaciones. La generación que predomina en la población celular, fue la inicial (generación 0). En cambio, en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal, se observó que respondieron de manera similar a lo observado con el estímulo CD3/CD28 (Fig. 16A). Se observó que estos linfocitos formaron hasta 3 generaciones, de las cuales, la generación que predominó en la población celular fue la inicial (G0).

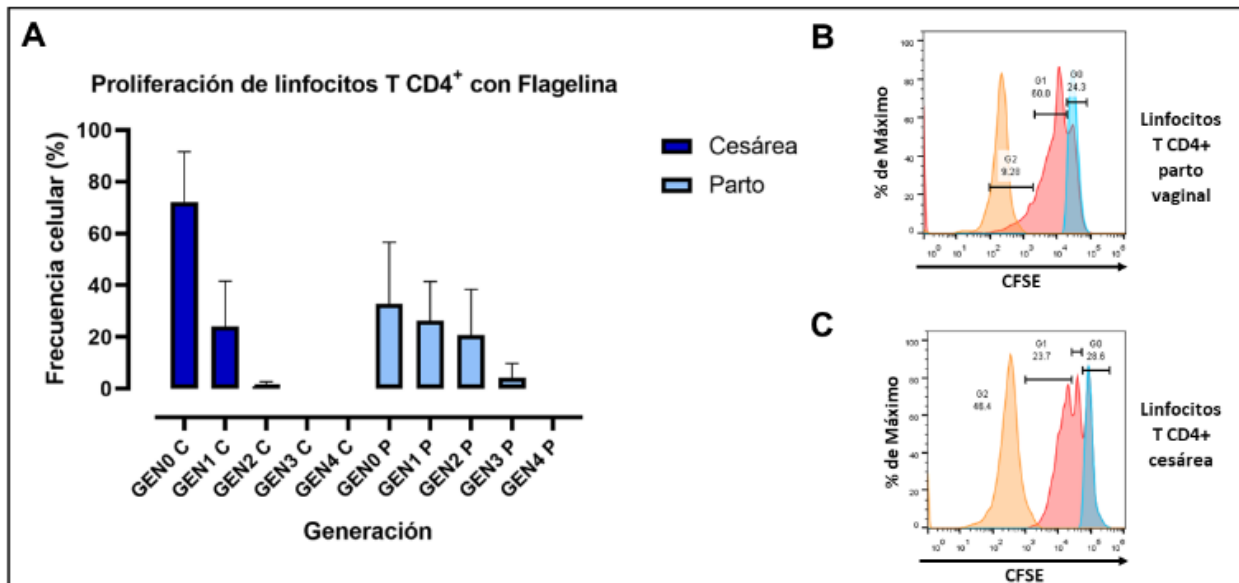


Figura 19. Proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados con CD3/Flagelina. A) Frecuencia celular, de las generaciones de linfocitos medidas con CFSE **B)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal. **C)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea. Color azul: control generación 0, naranja: control sin teñir, rojo: células estimuladas por 96 h, cada pico representa una generación formada. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente.

En la figura 20A se muestra que los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de cesárea tuvieron una menor proliferación con el estímulo CD3/Flagelina en comparación con el estímulo CD3/CD28 (Fig. 17A). Se observaron únicamente dos divisiones celulares, en donde predomina la generación inicial. Por otro lado, en la figura 15A (color azul claro) se

muestra que los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de parto vaginal respondieron mejor al estímulo CD3/Flagelina en comparación con el estímulo CD3/CD28 (Fig. 17A). Se observó que se formaron hasta 3 generaciones, de las cuales, la generación que predominó fue la inicial (G0).

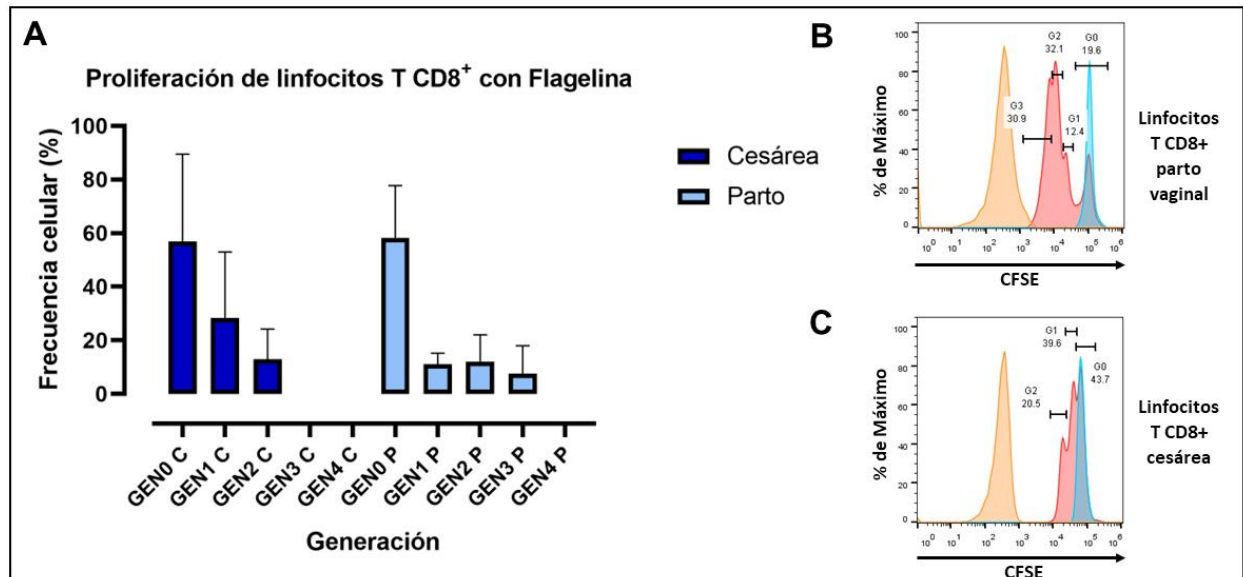


Figura 20. Proliferación de linfocitos T CD8⁺ estimulados con CD3/Flagelina. A) Frecuencia celular de las generaciones de linfocitos medidas con CFSE. **B)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de parto vaginal. **C)** Histograma de las generaciones que se obtuvieron en linfocitos T CD8⁺ de neonatos de cesárea. Color azul: control generación 0, naranja: control sin teñir, rojo: células estimuladas por 96 h, cada pico representa una generación formada. Los términos P y C denotan células obtenidas de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta sección, nos permiten comprender que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por parto y cesárea tienen la capacidad de responder al estímulo de la flagelina y promover la proliferación celular. Estos datos, junto con los datos obtenidos de la activación de los factores transcripcionales, tendremos un mejor panorama de la activación de los linfocitos T, el cual se discutirá en el apartado de discusión.

DISCUSIÓN

En este trabajo, logramos identificar que la activación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de neonatos de cesárea difiere de los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal. Estas diferencias las logramos identificar a nivel de la activación de los factores transcripcionales NFAT, NF-κB y AP-1, los cuales son claves para la activación efectiva de los linfocitos T. También logramos identificar diferencias en la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, entre los neonatos de parto vaginal y cesárea. Estas diferencias nos permiten conocer más sobre los efectos que tiene la forma del nacimiento en la activación de los linfocitos T, y como puede ser modulada la activación de los factores transcripcionales para poder establecer una mejor activación de los linfocitos T.

Observamos diferencias en la responsividad de los linfocitos T de neonatos nacidos por parto o cesárea. En general, las células de neonatos nacidos por cesárea fueron más responsivas a los estímulos, esto fue observado principalmente en la proliferación celular de células estimuladas con CD3/CD28. Se ha reportado que los neonatos nacidos por cesárea tienden a tener en la etapa adulta más problemas de asma, alergias y trastornos de inflamación crónica [39], [42], [43], [50]. Parecería que en los linfocitos, tanto CD4⁺ como CD8⁺, de los neonatos nacidos por parto hay una tolerancia a la estimulación, que se ha descrito como un alto umbral de activación [20], [34], [51], que no tienen las células provenientes de neonatos nacidos por cesárea.

A nivel de los factores transcripcionales, la disminución de la fluorescencia de NFATc1 total la observamos en respuesta a la estimulación con CD3/CD28 y CD3/Flagelina tanto en células T CD4⁺ como en células T CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea. Existen dos posibles escenarios para explicar esta observación: i) que las células responden a los estímulos con una disminución en la activación de NFAT o ii) que al translocarse al núcleo y unirse a AP-1 y al DNA, se pierde el epítipo y ya no podemos detectar la proteína total. Para poder discernir entre ambas, se tendrían que hacer western blots de muestras de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ purificados, de los cuales se tomaría la fracción de los núcleos y el citoplasma, en donde debería estar la proteína total y la desfosforilada.

Es interesante que el estímulo CD3/Flagelina haya permitido la activación tanto de p65 como de cJun, aunque no en todas las muestras. Cabe recalcar, que el TLR5 muestra

un papel potencial como señal coestimuladora, mediante la inducción de los factores AP-1 y NF- κ B, los cuales son capaces de inducir la expresión de genes que codifican citocinas, receptores y moléculas de señalización. En un estudio previo del laboratorio (Otoniel Rodríguez Jorge, tesis doctoral), se encontró que la vía de activación por CD3/CD28 se encuentra bloqueada en varios puntos por moléculas con señalización negativa (DUSP1, CTLA4) en los linfocitos T de neonatos nacidos por parto. En cambio, se encontró que toda la vía de señalización a través de TLR5 mantenía los niveles de expresión de las células de adulto, o incluso se encontraba sobreexpresado. Esto sugiere que a través del TLR5 se puede lograr la activación de los linfocitos, como se ha visto en publicaciones previas del laboratorio (Labastida Conde, et al). Estos resultados son de gran importancia médica, ya que la flagelina podría actuar como un coadyuvante en las vacunas, y así mejorar la memoria inmunológica. Esto también influye en el balance de los factores transcripcionales NFAT, AP-1 y NF- κ B de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ neonatales, para lograr montar una respuesta inmune efectiva.

Al analizar los tres factores transcripcionales en neonatos nacidos por cesárea, es posible que NFATc1 se encuentre translocado en el núcleo de los linfocitos T CD8⁺ con poca presencia del factor AP-1 (cJun) y NF- κ B (p65) cuando se estimula por el TCR y CD28. Debido a esto, es posible que la expresión de genes en linfocitos T CD8⁺ no esté dirigida a aumentar la capacidad citotóxica de estos, cuando se estimula por esta vía. Esto puede ser ocasionado por el desequilibrio en la activación de los factores transcripcionales. En cuanto a los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea, es posible que exista una mayor proporción del factor NFATc1 en comparación con NF- κ B, lo que pudiera provocar una diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia el fenotipo Th2. Por otra parte, la flagelina parece mejorar la activación de estos factores transcripcionales, promoviendo un aumento de la activación de p65 en linfocitos T CD4⁺ y genera una tendencia de aumento de activación de p65 y cJun en linfocitos T CD8⁺. Se ha reportado que los linfocitos neonatales muestran un aumento en la cantidad de calcio intracelular, el cual está relacionado con la vía de activación de NFAT, por lo que es posible que la activación de este factor se encuentre aumentada [52].

En los neonatos nacidos por cesárea, al evaluar la proliferación celular tras la estimulación por CD3/CD28, se observó que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ fueron capaces de proliferar. Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas a través del TCR/Flagelina se observó una disminución de casi la mitad de la capacidad de responder al estímulo. Esto indica que es necesaria la señal coestimuladora de CD28 para promover la proliferación, lo que genera un aumento en el número de generaciones. Similar a esto, al evaluar la proliferación homeostática, se observó la formación de dos generaciones en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, por lo que estas células tienden a proliferar aún en ausencia de un estímulo. Esto puede ser debido a que se ha reportado que los neonatos nacen con un estado linfopénico, lo que promueve la proliferación homeostática [31]. El incremento de la frecuencia celular, debido a la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con el estímulo CD3/CD28 que presentaron los neonatos nacidos por cesárea, podría contribuir al desarrollo de estados inflamatorios. Así mismo, la posible diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ al fenotipo Th2 podría generar una mayor propensión a generar enfermedades alérgicas en los neonatos nacidos por cesárea.

Por otra parte, al evaluar la proliferación con el estímulo CD3/CD28 en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, no se observó un aumento en el número de generaciones. Sin embargo, al estimular por el TCR/Flagelina, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tuvieron un ligero aumento en el número de generaciones. Estos linfocitos mostraron una mayor capacidad de proliferar al activar la vía de señalización del TLR5. Esto pudiera deberse a que en los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal, la vía del TLR5 mantiene niveles de expresión de células de adulto, lo que pueda permitir una mejor respuesta de los linfocitos T.

Finalmente, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ mostraron una reducida proliferación homeostática, a pesar de esto, presentan una tendencia de proliferar aún en ausencia de un estímulo, que es mayor al de las células de adultos [20].

Al comparar la proliferación celular entre neonatos de cesárea y parto, con el estímulo CD3/CD28, los linfocitos de parto mostraron baja proliferación en comparación con los de cesárea. Esto pudiera deberse a que los neonatos de parto experimentan una serie de fuerzas mecánicas y exposición a diversas hormonas que modifican el estado del

sistema inmune, provocando que éste sea altamente regulado durante los primeros días de vida. De los estudios realizados hasta ahora en el laboratorio, señalan que la vía del TCR/CD28 se encuentra bloqueada, sin embargo, aún no está claro si esta vía puede estar también siendo regulada negativamente o no, en los neonatos nacidos por cesárea. Por otro lado, los neonatos de cesárea no experimentan cambios drásticos durante el alumbramiento, inclusive algunas madres no llegan a presentar labor de parto continuo, por lo que esto pudiera llegar a afectar el desarrollo del sistema inmunológico neonatal [41], [42], [50].

Por otra parte, el número de generaciones de la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ estimulados por el TCR/Flagelina fue mayor en linfocitos de neonatos de parto en comparación con los nacidos por cesárea. Este aumento en neonatos de parto puede estar relacionado con la exposición que tiene el recién nacido con la microbiota de las paredes del útero y el conducto vaginal, lo que permitiría un encuentro previo del sistema inmune con bacterias.

Finalmente, los neonatos nacidos por parto y cesárea mostraron una proliferación homeostática reducida en comparación con su capacidad de proliferar ante el estímulo CD3/CD28. Sin embargo, se ha reportado que en adultos sanos existe una muy baja o nula proliferación homeostática, mientras que los neonatos sí llegan a formar hasta 3 generaciones. Esto ocurre debido a que existen condiciones de linfopenia en los recién nacidos, la cual promueve el aumento del número de linfocitos vírgenes para compensar la disminución de células.

CONCLUSIONES

La forma de nacimiento provocó diferencias en la activación de los linfocitos T, en los neonatos nacidos por cesárea se observó que mantienen un umbral de activación bajo, es decir, se activan más fácilmente que los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal. Esto se observó especialmente en la proliferación con el estímulo CD3/CD28, y pudiera deberse a los cambios en los estados de oxigenación y a los diversos estímulos físicos y hormonales que los neonatos nacidos por parto vaginal experimentan.

Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ neonatales son capaces de sensar la flagelina y junto con la estimulación del TCR, aumentaron la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF-κB. En neonatos nacidos por parto vaginal, aumentó el número de generaciones de linfocitos estimulados por el TCR/TLR5, mientras que los linfocitos de neonatos de cesárea respondieron pobremente a este mismo estímulo.

Finalmente, se logró observar que los linfocitos de neonatos nacidos por cesárea y parto presentan proliferación homeostática, posiblemente causada por el estado linfopénico de los neonatos al nacer.

PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos ahora existe un mejor entendimiento de la activación de los factores NFAT, NF-κB y AP-1 en neonatos nacidos por cesárea y parto. Sin embargo, es necesario aumentar el número de muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea para obtener valores estadísticos. También es importante conocer si existen diferencias en la expresión de genes que estén provocando la respuesta proliferativa observada en los neonatos de parto al compararlos con los de cesárea.

ANEXO

Anticuerpos y diluciones empleadas:

Anticuerpo	Marca	Fluoróforo	Concentración	Dilución
NFATc1 Total	Santa Cruz Biotech.	Percp Cy-5.5	200 µg/ml	10 µl + 30 FACS
NFATc1 Ser264	Invitrogen	*	1 mg/ml	1 µl + 79 FACS
NFATc2 Total	Biorbyt	FITC	100 µg	2 µl + 38 FACS
NFATc2 Ser326	BIOSS	Cy7	100 µg	2 µl + 38 FACS
NF-κB p65	Santa Cruz Biotech.	*	100 µg/ml	10 µl + 70 FACS
NF-κB Ser529	Miltenyi Biotec	APC	1 mg/ml	8 µl
cJun Ser63	Genetex	*	100 µg/µl	4 µl + 156 FACS
Goat anti rabbit	TONBO	FITC	1.5 mg/ml	3 µl + 157 FACS
CD4	TONBO	APC	0.125 µg/Test	10 + 150 FACS
CD3	TONBO	Violet 450	0.5 µg/Test	10 + 150 FACS
CFSE	Invitrogen		200 µM	1 µM
CD3	TONBO		0.5 mg/ml	1 µg/ml
CD28	TONBO		0.5 mg/ml	1 µg/ml
Goat anti mouse	BIOSS		1 mg/ml	1 µg/ml
Flagelina	InvivoGen		10 µg	10 µg + 90 H ₂ O libre de endonucleasas**

*Utiliza anticuerpo secundario Goat anti rabbit FITC.

** Se usaron 25 ng/ml para realizar la estimulación por el TLR5.
FACS: Suero fetal bovino al 2% (diluido con PBS 1X).

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. A. Santana y F. Esquivel-Guadarrama, "Cell Biology of T Cell Activation and Differentiation", vol. 250, núm. 06, 2006.
- [2] C. A. Thaiss, N. Zmora, M. Levy, y E. Elinav, "The microbiome and innate immunity", *Nat. Rev. Immunol.*, 2016.
- [3] A. Matejuk, "Skin Immunity", *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*., vol. 66, núm. 1, pp. 45–54, 2018.
- [4] X. P. X. Liew y P. Kubes, "The Neutrophils's role during health and disease", *J. physiology*, pp. 1223–1248, 2020.
- [5] R. V Uzhachenko y A. Shanker, "CD8 + T Lymphocyte and NK Cell Network : Circuitry in the Cytotoxic Domain of Immunity", *Front. Immunol.*, vol. 10, núm. August, pp. 1–7, 2019.
- [6] C. Macri, E. S. Pang, T. Patton, y M. O. Keeffe, "Dendritic cell subsets", *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2017.
- [7] M. Guilliams, A. Mildner, y S. Yona, "Review Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes", *Immunity*, vol. 49, núm. 4, pp. 595–613, 2018.
- [8] J. Smith-Garvin y G. Koretzky, "T cell activation", *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 591–619, 2009.
- [9] D. A. Cronkite y T. M. Strutt, "The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes", *Hindawi*, 2018.
- [10] D. W. Clapp, "Developmental Regulation of the Immune System", *Semin. Perinatol.*, vol. 30, núm. 2, pp. 69–72, 2006.
- [11] G. Magri, "Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling", *Phonology*, vol. 31, núm. 03, pp. 525–556, 2014.
- [12] S. P. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, *Inmunología celular y molecular*. 2015.
- [13] G. E. Kaiko, J. C. Horvat, K. W. Beagley, y P. M. Hansbro, "Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response?", *Immunology*, vol. 123, núm. 3, pp. 326–338, 2008.
- [14] K. Liu, "In Vivo Analysis of Dendritic Cell", vol. 392, 2009.
- [15] L. M. Sompayrac, *How the Immune System Works*. 2016.
- [16] B. D. Sinnott, B. Park, M. C. Boer, A. Deborah, y C. L. Lancioni, "Direct TLR-2 Costimulation Unmasks the Proinflammatory Potential of Neonatal CD4 + T Cells", *J. Immunol.*, 2016.
- [17] T. Kawai y S. Akira, "Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity", *Immunity*, vol. 34, núm. 5, pp. 637–650, 2011.

- [18] M. Crespo *et al.*, “Neonatal T-cell maturation and homing receptor responses to Toll-like receptor ligands differ from those of adult naive T cells: relationship to prematurity”, *Int. Pediatr. Res. Fund.*, vol. 71, núm. 2, 2012.
- [19] O. Rodríguez-jorge, L. A. Kempis-calanis, W. Abou-jaoudé, D. Y. Gutiérrez-reyna, C. Hernandez, y O. Ramirez-pliego, “Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4 + T cell activation”, vol. 88, pp. 1–11, 2019.
- [20] A. O. Galindo-Albarrán *et al.*, “CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response”, *Cell Rep.*, vol. 17, núm. 8, pp. 2151–2160, 2016.
- [21] F. Macian, “NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function”, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, núm. 6, pp. 472–484, 2005.
- [22] E. Serfling, A. Avots, S. Klein-Hessling, R. Rudolf, M. Vaeth, y F. Berberich-Siebelt, “NFATc1/A: The other face of NFAT factors in lymphocytes”, *Cell Commun. Signal.*, vol. 10, núm. 1, p. 1, 2012.
- [23] E. I. Y. Cáncer, N. P. E. R, y I. M. S, “FACTOR NUCLEAR κ B (NF- κ B): SIGNALOSOMA Y SU IMPORTANCIA EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y CÁNCER”, vol. 56, núm. 2, pp. 133–146, 2008.
- [24] A. Oeckinghaus y S. Ghosh, “The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, núm. 4, pp. a000034–a000034, 2009.
- [25] A. Voisin y Y. Grinberg-bleyer, *The many-sided contributions of NF- κ B to T-cell biology in health and disease*, 1a ed., vol. 361. Elsevier Inc., 2021.
- [26] R. G. Labastida-Conde *et al.*, “Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4+T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection”, *Vaccine*, vol. 36, núm. 29, pp. 4188–4197, 2018.
- [27] B. Cui, X. Liu, Y. Fang, P. Zhou, Y. Zhang, y Y. Wang, “Flagellin as a vaccine adjuvant”, *Expert Rev. Vaccines*, vol. 0, núm. 0, 2018.
- [28] S. Cytokine, J. M. Curtsinger, C. M. Johnson, F. Matthew, y S. Cytokine, “CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine”, *J. Immunol.*, 2003.
- [29] K. R. Qazi *et al.*, “Extremely Preterm Infants Have Significant Alterations in Their Conventional T Cell Compartment during the First Weeks of Life”, *J. Immunol.*, 2020.
- [30] I. R. Amaia, G. M. M. P. Inés, M. J. Polaino, M. M. R. María, F. G. Manuel, y Y. M. Pacheco, “An in vitro system of autologous lymphocytes culture that allows the study of homeostatic proliferation mechanisms in human naive”, *USACAP*, 2018.
- [31] M. Á. Muñoz-fernández, “Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory t-cell values and diminished IL-7”, *Int. Pediatr. Res. Fund.*, vol. 71, núm. 5, 2012.
- [32] K. Motwani *et al.*, “Human Regulatory T Cells From Umbilical Cord Blood Display

- Increased Repertoire Diversity and Lineage Stability Relative to Adult Peripheral Blood”, vol. 11, núm. April, pp. 1–17, 2020.
- [33] UNICEF, “Cada Vida Cuenta”, pp. 2–3, 2018.
- [34] I. Debock y V. Flamand, “Unbalanced neonatal CD4 + T-cell immunity”, vol. 5, núm. August, pp. 1–7, 2014.
- [35] T. R. Kollmann, B. Kampmann, S. K. Mazmanian, A. Marchant, y O. Levy, “Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases : Lessons from Immune Ontogeny”, *Cell Press*, 2017.
- [36] A. Quaiser *et al.*, “Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents”, *Scand. J. Immunol.*, vol. 84, núm. 5, pp. 291–298, 2016.
- [37] D. Nacionales, “COMUNICADO DE PRENSA NÚM . 209 / 20 7 DE MAYO DE 2020 ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA DE LA MADRE”, núm. 878 mil, 2020.
- [38] R. M. Tribe, “Parturition and the perinatal period : can mode of delivery impact on the future health of the neonate ?”, vol. 23, pp. 5709–5722, 2018.
- [39] A. Mar, E. Mart, y T. Hern, “Prenatal and Perinatal Environmental Influences Shaping the Neonatal Immune System : A Focus on Asthma and Allergy Origins”, 2021.
- [40] A. P. Betran, J. Ye, B. Moller, y J. P. Souza, “Trends and projections of caesarean section rates : global and regional estimates”, 2021.
- [41] C. Antoine y B. K. Young, “Cesarean section one hundred years 1920 – 2020 : the Good , the Bad and the Ugly”, *J. Perinat. Med.*, vol. 49, núm. 1, pp. 5–16, 2021.
- [42] A. Sevelsted, J. Stokholm, K. Bønnelykke, y H. Bisgaard, “Cesarean Section and Chronic Immune Disorders”, vol. 135, núm. 1, 2015.
- [43] P. Kothiyal *et al.*, “Differences in maternal gene expression in Cesarean section delivery compared with vaginal delivery”, *Sci. Rep.*, pp. 1–9, 2020.
- [44] C. E. Cho y M. Norman, “immune system in the offspring”, *YMOB*, vol. 208, núm. 4, pp. 249–254, 2013.
- [45] R. G. Nichols, E. R. Davenport, y R. G. Nichols, “The relationship between the gut microbiome and host gene expression : a review”, *Hum. Genet.*, vol. 140, núm. 5, pp. 747–760, 2021.
- [46] C. M. Mousset, W. Hobo, R. Woestenenk, F. Preijers, y H. Dolstra, “Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry”.
- [47] J. P. McCoy, *Molecular Biology Immuno- phenotyping* .
- [48] S. V. Rodríguez *et al.*, “Multiparameter flow cytometry analysis of leukocyte markers for diagnosis in preterm neonatal sepsis”, *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 0, núm. 0, pp. 1–11, 2019.
- [49] B. J. C. Quah y C. R. Parish, “New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes”, *J.*

Immunol. Methods, vol. 379, núm. 1–2, pp. 1–14, 2012.

- [50] O. E. Keag, J. E. Norman, y S. J. Stock, “Long-term risks and benefits associated with cesarean delivery for mother , baby , and subsequent pregnancies : Systematic review and meta-analysis”, vol. 56, pp. 1–22, 2018.
- [51] A. B. Zaghouani, Habib, Hoeman CM, “Neonatal immunity: Faulty T-helper and the shortcomings of dendritic cells.”, *Trends Immunol*, vol. 30, núm. 12, pp. 585–591, 2009.
- [52] A. C. Palin, V. Ramachandran, S. Acharya, y D. B. Lewis, “Human Neonatal Naive CD4+ T Cells Have Enhanced Activation-Dependent Signaling Regulated by the MicroRNA miR-181a”, *J. Immunol.*, vol. 190, núm. 6, pp. 2682–2691, 2013.

DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **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**, que presenta el alumno **Carlos Jesús Ventura Martínez (10036247)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Ramón Antonio Gonzalez García-Conde CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM	APROBADO	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha: 2022-03-30 11:16:45 | Firmante

rs0dahh8RoNzA1S+J4fcvIrcp4b7CSsyvvpCnbKcCXfTQjWZRcv0F4OVzULPQwsGj5ZggaeqpVHCu7YtFJ2nxcQaBB3Mko1OJWkbt5P7Uw4M6k.JRHYD+tJv/wxlDxjEkoJ9q4wCiNfRYelaLDr2+Bik9Q/ASBMWE9ge+NtTOWJ6/xV18AYndhcdmQudsfZODuGu79h17B2SjKcSymGB2thV8lbpRyH3y9OZNRzpmDEQqLjnJ9u3fJg7n0jJNbbUxlTKMSPZHvm2S5B10v7mPj4d3au7fJdNwmLcGnt7DIJFFIQhBppKicH6ojEydJD5co/Jj+R035bvxt0w==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha: 2022-03-30 13:36:21 | Firmante

OJn/avTngEMDjLvaXSM05F4Kszu/xDYCJLmUOJ+qAiDuYbDMtTglhzvcuImiSEglg6APVEBmzGNQOZZarjAG6Zcr4n1ZsDXLhZyayBfJb7zZrpt/WNSp92GHJEi1Bz1a/uMLUWdKwf9ecSx+/Mmy7jT+ScmnuoWTwCnGebZSr1ZUuO2hDnsV8UIMStGOBdh9I4DxwEcqEjijUwUppapQ8Rj8vp0jVeHj76Ex8A3yIq7+gzGyKsvZHMjzxmMuyhtMjYcflJuYxh8wZZJCCxAQ3aIRLbe9KoaKv29/L4TL1MUldWWGNZO5y8yC8YgelNwOIDxVFIB0bFeonDb+TkYQ==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha: 2022-03-31 06:55:27 | Firmante

WeKKBdqVfI6jpmRW8mArDCQbZBZCgm7jh0Sr9Pk4XPDta4rschnEg6iAIFKLRLKliANcOFA6X9dCbi7e9Lhafm69vGHR92RBqZeZUQXpHEE82PbYbiFnkZS5K22IFOrziHOeJfHZnRh7oHOy9FwY40+BaptSlp0Kl94wzrbRvM8Lq+b9niQhO/qYKxmkVjaAwA6hR6UIID9yTiDEE8Hku/en5962+g8Is63N5BQz6YHUZBxK3nax8qE9TxdLitiAFiAuUG5Z9vksch0ileNijEg2ZTLhmlMHIAoy/2YW+dCl5icMoF3DiO5yFmefU8mJXtDfKL7AA1Ly6yWq1Q==

MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA | Fecha: 2022-04-01 06:41:40 | Firmante

HM+hOu2Dca9ZdtJV4SQ8xQZTOhZ+xHp+K3chDNKklaEWb8n7dqmAkJ7dggCWj946L9PrQcWdkmQaZarCgQX1Qr1jQeYLyadgWqDjN30Y64Wlub6SPo3dwxO2Oyi3Kol81wOgdLR8UuxTu8xuSkhaVMeVULokiOPcG6GZOuWJRdpGsamRXhFJQEYFpxNUPtVg1zb3hTQbG0Bpy2SchTRLdofuQL+2BAEnI5X+7EpVUq18tpHBlaN8z0bfPcO8hpk3/TM+kPzIWWZFF113j0M0OUNOm4lpQ7OFIArpuT841ESTTw0LJEP+HTdX7uRKs74J7AuM4Z7UL4Ydz2XZkg==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha: 2022-04-04 10:53:07 | Firmante

rGDiqnmQ9DQqjFEwmQEtvMXyooVC5TQTRkx45wWONJDNXH/txlrvwhreqiQGxgnz3UGkMtfhF1yhIEhYGU/p6VZ9+d/llfZxj1z3CV5QhbTVvk/ni3RhrWVJGkoUnQy9I9SAA56xsK/MF3fRzXsk+bad/GmO5OEFamMHYVj6pj+BU7hTvHPi6VP0gpDsQkULp/sgDDtaDg967bKbw5cacEutfFiPx7WXLlaj+zCTq4tAI3XoHJyK5dBSEijs5diM22M/8TuA76bGqqV2Q2LgujPRSw+Ab5bP9PBkj1YDs56XICYtc2BouNfa2fPQ2Tufe6IA/eOy8thVdlGcuQ==

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



xBakYiSZR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/v9viG5XN7ziQhM691ZA43sVMX4PrNlzy>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023