



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular

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

**Influencia de las células eritroides CD71⁺ y T reguladoras sobre
la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos humanos
nacidos por cesárea y parto vaginal**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ALEJANDRA CEDILLO BAÑOS

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Angélica Santana Calderón

Miembros del comité tutorial:

Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla

Dra. Delia Vanessa López Guerrero

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2023

AGRADECIMIENTOS

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

A las mamás de todos los bebés que nos permitieron el uso de las muestras de sangre para este estudio.

A CONAHCYT por financiar el trabajo y otorgarme una beca.

RESUMEN

Las células T neonatales son diferentes de las células adultas, con una alta respuesta tolerogénica y una inmunidad sesgada hacia fenotipo Th2. En el período neonatal, hay un enriquecimiento en células T reguladoras y células eritroides inmaduras con el fenotipo CD71⁺ que proporcionan un ambiente inmunosupresor. La vía de nacimiento también puede influir en la respuesta del sistema inmunológico, ya que el nacimiento por cesárea conduce a una predisposición al asma infantil y, más tarde en la vida, a condiciones inflamatorias crónicas.

En este trabajo se evaluó el efecto de la vía de nacimiento y la influencia de las células T reguladoras y de las eritroides inmaduras CD71⁺ sobre la activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ neonatales en respuesta a la estimulación a través del TCR. En general, se observó una mayor activación de las células de los bebés nacidos por cesárea. También se encontró que la eliminación de las células eritroides inmaduras CD71⁺ conduce a una mayor activación de las células T, lo que sugiere un papel importante de estas células en el ambiente inmunosupresor en etapas tempranas neonatales, particularmente sobre las muestras derivadas de neonatos nacidos por cesárea.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Sistema inmune	7
1.1.1 Inmunidad innata.....	7
1.1.2 Inmunidad adaptativa	8
1.2 Linfocitos T	9
1.2.1 Linfocitos T CD4+.....	9
1.2.2 Linfocitos T CD8+.....	9
1.3 Activación de linfocitos T	10
1.3.1 Primera señal: reconocimiento del antígeno por el TCR.....	10
1.3.2 Segunda señal: moléculas coestimuladoras	10
1.3.3 Tercera señal: citocinas	11
1.4 Fenotipos efectores de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	11
1.4.1 Linfocitos Th1 y Tc1	12
1.4.2 Linfocitos Th2 y Tc2	13
1.4.3 Fenotipos Th17 y Tc17.....	13
1.4.4 Linfocitos Treg.....	14
1.5 Inmunidad neonatal	15
1.6 Nacimiento por cesárea.....	16
1.7 Diferencias en la vía de nacimiento	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Células Treg en neonatos.....	19
2.2 Células eritroides CD71 ⁺ en neonatos.....	20
2.3 Vía de nacimiento y expresión de citocinas	21
2.4 Justificación	22
2.5 Objetivo general.....	22
2.6 Objetivos particulares	22
2.5 HIPÓTESIS.....	23
3. METODOLOGÍA	23
3.1 Purificación de Células Mononucleares de Sangre de Cordón.....	23
3.2 Depleción de células Eritroides CD71 ⁺ y/o T reguladoras	24
3.3 Estimulación de Linfocitos T	24
3.4 Evaluación de producción de citocinas en Linfocitos T CD8 ⁺ y T CD4 ⁺ por citometría de flujo	25

3.5 Evaluación de la expresión de genes de citocinas por RT-qPCR en CBMCs	25
3.5.1 Diseño de cebadores para cDNA	25
3.5.2 Extracción de RNA	26
3.6 Análisis estadísticos	26
4. RESULTADOS	26
4.1 Muestras biológicas	26
4.2 Controles de depleción	27
4.3 Evaluación de la activación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ por citometría de flujo	29
4.3.1 Activación de Linfocitos T de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea	30
4.3.2 Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T de neonatos nacidos por parto vaginal	33
4.3.3 Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T de neonatos nacidos por cesárea	34
4.3.4 Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T de acuerdo con la vía de nacimiento.....	36
.....	37
4.4 Efecto de las depleciones sobre la expresión de genes de citocinas en CBMCs de neonatos nacidos por parto vaginal	38
4.5 Discusión.....	40
4.6 Conclusiones.....	42

Abreviaturas

TCR: Receptor de Célula T

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I

MCH-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II

CBMCs: Células Mononucleares de Sangre de Cordón

IFN- γ : Interferón- γ

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema inmune

El sistema inmune es el encargado de defendernos contra infecciones y células no funcionales, a través de respuestas inmunitarias, reaccionando contra los componentes de microbios o sustancias que son reconocidas como extrañas. Diferentes tipos celulares y moléculas participan de forma coordinada para poder eliminar a estas sustancias [1].

La inmunidad se clasifica en dos tipos, que difieren en velocidad y especificidad de la respuesta: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

1.1.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa que tenemos contra los patógenos. Está compuesta por barreras físicas como los epitelios y por barreras químicas como las mucosas. Así también está compuesto por diferentes tipos celulares como los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células asesinas naturales y por proteínas solubles, como las que conforman el sistema del complemento [1].

Esta inmunidad es la primera en responder ante las infecciones y tiene la capacidad de reconocer patrones moleculares compartidos por varios microbios, pero que no están presentes en las células del huésped, por lo que reconocen lo propio de lo extraño. Este reconocimiento es sobre estructuras compartidas, y no es específica hacia cada patógeno [2].

Cuando las respuestas montadas por la inmunidad innata no son suficientes para eliminar a los patógenos, se activa la inmunidad adaptativa más tarde en el tiempo, que está dirigida al reconocimiento específico del patógeno.

1.1.2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa está compuesta por linfocitos T y B, las cuales son las únicas células que expresan receptores específicos de antígenos, TCR y BRC respectivamente. Debido a la expresión de estos receptores, la respuesta será específica para cada antígeno y reforzará la respuesta montada por la inmunidad innata. Cuando un linfocito reconoce su antígeno específico, prolifera considerablemente en un proceso que se conoce como ampliación clonal. Todos los linfocitos descendientes expresarán el receptor de forma clonal, es decir, todos reconocerán al mismo antígeno. La mayoría de estos descendientes morirán por apoptosis después de haber eliminado al patógeno, proceso conocido como contracción. Sin embargo, una pequeña porción de células permanecerá como células de memoria de vida larga. Estas células mantienen su capacidad de reconocer al mismo antígeno en un segundo reencuentro de forma más rápida y fuerte, a dicha capacidad se le conoce como “memoria inmunológica” [1], [2].

La inmunidad innata y la adaptativa mantienen una estrecha comunicación a través de las células dendríticas (células presentadoras de antígenos profesionales) y de las citocinas, que son moléculas que dirigen funciones del sistema inmune como la activación, diferenciación y proliferación.

1.2 Linfocitos T

Los linfocitos T reciben este nombre debido a que son células que maduran en el timo, aunque sus progenitores provienen de la médula ósea. Los linfocitos T clásicos expresan el TCR α/β y existen dos subconjuntos: los CD4⁺ o cooperadores y los linfocitos CD8⁺ o citotóxicos. Estos fenotipos los adquieren en el timo por procesos de selección negativa y positiva, donde se eliminan por apoptosis a las células que reconocen antígenos propios con alta afinidad y se seleccionan a las células que reconocen antígenos con una afinidad intermedia las cuales salen a la periferia como células vírgenes. Existen otros tipos de linfocitos T que se encuentran en menor cantidad, como los que expresan el TCR γ/δ y los linfocitos innatos. En este trabajo nos enfocamos a los linfocitos T clásicos TCR α/β .

1.2.1 Linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ se caracterizan por expresar en su superficie la molécula CD4 y reciben el nombre de cooperadores por dirigir las respuestas de otras células inmunitarias a través de la producción de citocinas y el contacto celular. A través de su TCR reconocen a sus antígenos específicos, que son presentados en el contexto del MHC-II, el cual se expresa en células presentadoras de antígenos, como lo son las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos [2].

1.2.2 Linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ se caracterizan por expresar en su superficie la molécula CD8 y reciben el nombre de citotóxicos, debido a que se encargan de eliminar a células infectadas, tumorales o dañadas. Esto lo logran mediante la liberación de moléculas efectoras como la perforina y las granzimas, que conducen a la muerte apoptótica

de las células blanco, También pueden inducir apoptosis a través del ligando Fas (FasL) que interacciona con el receptor Fas de las células blanco. A través de su TCR reconocen a sus antígenos específicos que son presentados en el contexto del MHC-I, el cual se expresa en todas las células nucleadas [2].

1.3 Activación de linfocitos T

Para que un linfocito T virgen pueda ser completamente activado y diferenciarse a hacia un fenotipo efector o de memoria, necesita de tres señales: la señal 1 que se induce a través del TCR, la señal 2 se da a través de moléculas coestimuladoras y la señal 3 la proporcionan las citocinas del ambiente.

1.3.1 Primera señal: reconocimiento del antígeno por el TCR

La presentación del antígeno por las células presentadoras de antígenos, principalmente las células dendríticas, se da a través de su MHC cargado con el péptido antigénico, que es reconocido por el TCR de los linfocitos T afines. Esta interacción es indispensable como primera señal, para asegurar que la respuesta será específica al antígeno. El TCR forma un complejo asociado con las moléculas CD3 y ζ , que le permiten inducir las señales intracelulares. Una interacción fuerte y prolongada entre TCR y el MHC asociado a péptido, junto con señales coestimuladoras, produce una óptima activación y diferenciación, mientras que exposiciones cortas pueden ocasionar respuestas truncadas [3].

1.3.2 Segunda señal: moléculas coestimuladoras

Además de la señal del antígeno, durante la activación los linfocitos T también necesitan de segundas señales que inducen su supervivencia y proliferación. A estas señales se les conoce como moléculas coestimuladoras y se expresan en la

superficie de las células presentadoras de antígeno. Las principales señales coestimuladoras son de las familias B7/CD28 y TNF/TNFR. La familia mejor caracterizada es la de B7/CD28. Las moléculas CD28 se expresan en la superficie de los linfocitos T y sus ligandos, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), se encuentran regulados al alza en las células presentadoras de antígeno activadas. También existen moléculas coinhibitorias que limitan la expansión celular, los miembros de la familia coinhibitoria de CD28 son CTLA-4 y PD-1 [1], [3]. Si la activación del linfocito ocurre solo en presencia de la primera señal y en ausencia de coestimuladores, la célula se puede volver anérgica, es decir que no prolifera y no se enciende la respuesta inmunitaria. Las señales de moléculas inhibitorias también disminuyen o evitan la activación celular [4].

1.3.3 Tercera señal: citocinas

El ambiente inflamatorio, es decir, la producción de citocinas proinflamatorias por parte de la inmunidad innata, son necesarias para una adecuada activación, sobrevivencia, proliferación y establecimiento de los linfocitos T efectores y de memoria. La interleucina 12 (IL-12) y el interferón tipo I (IFN I) son citocinas proinflamatorias importantes en la respuesta a patógenos especialmente para los linfocitos T CD8⁺. Cuando los linfocitos citotóxicos son activados en ausencia de terceras señales, las células fallan en desarrollar su función efectora citolítica [3], [5].

1.4 Fenotipos efectores de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Las condiciones en las que son activados los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes influyen en el destino de su diferenciación en distintas subpoblaciones.

Dependiendo del tipo de citocinas que reciben, se expresarán factores de transcripción que inducen la adquisición de los diferentes fenotipos efectores.

Existen tres principales fenotipos efectores para los linfocitos T CD4⁺ (llamados Th1, Th2 y Th17) y CD8⁺ (llamados Tc1, Tc2 y Tc17). Los diferentes fenotipos efectores de la inmunidad adaptativa permiten una óptima respuesta especializada contra los distintos tipos de patógenos presentes en el organismo [6].

1.4.1 Linfocitos Th1 y Tc1

Los linfocitos CD4⁺ Th1 se caracterizan por producir IFN- γ pero también pueden producir TNF- α . El ambiente necesario para inducir el fenotipo Th1 requiere principalmente de la Interleucina-12 (IL-12) y del IFN- γ , que activan a los factores transcripcionales STAT4 Y STAT1 respectivamente. Estos, a su vez, inducen la expresión del factor transcripcional T-bet, considerado como factor firma de este fenotipo [1], [6].

De las células CD8⁺ el fenotipo Tc1 es el mejor descrito, similar a los linfocitos Th1. También se caracterizan por la producción de IFN- γ , dependen de la IL-12 y del mismo IFN- γ para su diferenciación. La activación del factor transcripcional T-bet es necesaria para su potencial efector citotóxico. Para establecer las células de memoria se requiere del factor transcripcional Eomes [6], [7]

Su capacidad productora de IFN- γ permite activar y potenciar la capacidad fagocítica de los macrófagos y la actividad citotóxica de las células Tc1 permite eliminar células infectadas. Por lo anterior, estos fenotipos proveen una respuesta efectiva contra patógenos intracelulares, pero la sobrepolarización de este fenotipo se han asociado a enfermedades autoinmunes [1], [6]

1.4.2 Linfocitos Th2 y Tc2

Los linfocitos Th2 son productores de Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5) e Interleucina-13 (IL-13). La IL-4 induce la diferenciación de los Th2 al activar el factor de transcripción STAT6, que junto con señales del TCR, induce la expresión del factor transcripcional GATA-3, factor firma de este fenotipo [1], [6]

El fenotipo Tc2 es inducido en presencia de la IL-4, estos linfocitos igual que los Th2 también producen IL-5 e IL-13 y en menor medida la IL-4. Las células Tc2 expresan el factor de transcripción GATA-3 pero menos que los Th2. En circunstancias como la inflamación alérgica de las vías respiratorias las células Tc2 son poco citotóxicas [7].

La IL-4 es importante para el cambio de isotipo hacia IgE en las células B, y junto con la IL-13 también aumentan la producción de moco y el peristaltismo intestinal, la IL-5 activa a los eosinófilos. Los fenotipos Th2 y Tc2 tienen lugar en respuesta a los parásitos helmínticos y los alérgenos, los trastornos patológicos asociados a una respuesta inadecuada por parte de estos fenotipos son las enfermedades alérgicas y el asma [1], [6].

1.4.3 Fenotipos Th17 y Tc17

El fenotipo Th17 se caracteriza por su capacidad de producir Interleucina-17A (IL-17A) e Interleucina-17F (IL-17F), otras citocinas que producen son la Interleucina-22 (IL-22) y la Interleucina-21 (IL-21). Este fenotipo se induce en presencia de la combinación de la Interleucina-1 (IL-1), la Interleucina-6 (IL-6), la Interleucina-23 (IL-23) y del Factor de Crecimiento Transformador- β (TGF- β). Su factor de

transcripción firma es ROR γ t y otro factor importante para su diferenciación es STAT3[1], [6].

Las células Tc17 son productoras de las citocinas IL-17 e IL-21, expresan los factores de transcripción ROR γ t y ROR α . La diferenciación hacia este fenotipo es determinada por las citocinas IL-6 o IL-21 junto con TGF- β y la IL-23 estabiliza su fenotipo. Estos linfocitos son menos citotóxicos que los Tc1 [6], [7].

Las citocinas IL-17A e IL-17F son claves para el reclutamiento, activación y migración de los neutrófilos, los cuales ingieren y destruyen a las bacterias y los hongos. De este modo, los linfocitos Th17 y Tc17 son especialmente importantes en la defensa contra patógenos extracelulares. Una respuesta exacerbada de este fenotipo se ha relacionado con enfermedades autoinmunes [1], [6].

1.4.4 Linfocitos Treg

Las células T reguladores mejor descritas son linfocitos T CD4⁺ que se caracterizan por expresar constitutivamente en su superficie la cadena α del receptor de alta afinidad de la Interleucina-2 (IL-2R α) también conocido como CD25. El factor transcripcional firma de este subconjunto es FoxP3, fundamental para su desarrollo y función. Los linfocitos T reguladores se diferencian desde el timo (nTregs o tTregs) y los linfocitos T CD4⁺ vírgenes que se inducen hacia el fenotipo regulador en la periferia se conocen como iTregs. El TGF- β y la IL-2 en conjunto inducen su desarrollo, al mismo tiempo la IL-2 es necesaria para su supervivencia y funcionalidad.

Las Tregs son conocidas por su papel supresor, establecen tolerancia frente a los antígenos propios en la periferia, controlando a las células T autorreactivas y limitan

las respuestas excesivas ejercidas por las células Th1, Th2 y Th17. La deficiencia en la subpoblación reguladora está asociada con enfermedades autoinmunes [1].

Los mecanismos por los que mantienen la supresión son:

- Producción de citocinas inmunosupresoras como IL-10, IL-35 y TGF- β .
- Alta expresión de moléculas coinhibitorias como CTLA-4, que al unirse a las moléculas B7 de las células presentadoras de antígenos, reducen su capacidad de activar a los linfocitos T.
- Alteración metabólica: tienen alto consumo de IL-2, dejando desprovistas a otras células de este factor de crecimiento, reduciendo así su proliferación y diferenciación. También producen adenosina que suprime a las células T efectoras.
- Supresión por citólisis: las células Tregs activadas producen granzimas y perforina con capacidad citolítica similar a la de los linfocitos T CD8⁺ y eliminan a células efectoras [8].

1.5 Inmunidad neonatal

Los neonatos poseen un sistema inmunitario diferente al de los adultos, debido a que sus demandas son diferentes, pues deben equilibrar la transición desde un ambiente intrauterino normalmente estéril hacia un ambiente externo rico en antígenos extraños. Una respuesta vigorosa hacia todos los antígenos nuevos podría llevar a un estado crónico de hiperinflamación, lo que sería perjudicial para el establecimiento del estado tolerante, necesario para los antígenos comunes del ambiente, la microbiota y los nuevos autoantígenos periféricos [9].

Debido a la limitada exposición a antígenos dentro del útero, el sistema inmune adaptativo de los neonatos posee un fenotipo virgen y carece de memoria inmunológica [10]. Las células de cordón umbilical tienen una naturaleza tolerante, pues producen altas cantidades de IL-10 y adenosina y cantidades menores de TNF- α , IFN- γ e IL-12 comparado con las células de adultos [10], [11], [12], [13].

Las células presentadoras de antígenos neonatales tienen una producción deficiente de la IL-12 bioactiva, por lo que no son eficaces activando a los linfocitos T CD8⁺ para que alcancen su potencial efector citotóxico [14]. Además, la inmunidad adaptativa neonatal tiene un sesgo inherente hacia la polarización Th2 frente a la Th1 tras la vacunación. Así también, se necesitan dosis de refuerzo para sostener la respuesta inmune y mantener la memoria inmunológica [11]. Este sesgo se ve reflejado hasta el nivel de la estructura de la cromatina, donde los genes de las citocinas de tipo Th2 se encuentran hipometilados, facilitando su rápida transcripción [15]. Lo anterior influye en que la respuesta inmune de los neonatos sea ineficiente ante muchas infecciones intracelulares, las cuales representan una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial en la población neonatal y en infantes menores de cinco años [16].

1.6 Nacimiento por cesárea

La cesárea es un procedimiento quirúrgico utilizado para tener un bebé a través de incisiones en el abdomen y el útero de la madre [17]. Es un procedimiento que puede salvar las vidas de las madres y los bebés cuando el parto vaginal supone un mayor peligro. Sin embargo, al igual que otras cirugías tiene sus riesgos. Cuando no está médicamente indicada los riesgos podrían superar los beneficios.

Cada vez se presta más atención sobre el impacto que puede tener la vía de nacimiento en la salud de los niños, sobre todo porque en las últimas décadas se ha observado una tendencia creciente en las cesáreas practicadas. A nivel mundial, los nacimientos por cesárea han aumentado desde un 7% en la década de 1990 hasta un 21% en la actualidad. En México la tasa de nacimientos por cesárea alcanzó el 37.8% del total de nacimientos en 2018 [18]. En 2020, por primera vez el número de nacimientos por cesárea superó al de partos vaginales y llegó a ser más del 50% [19], a pesar de que la Organización Mundial de la Salud recomienda que las cesáreas tengan un límite deseable del 15% del total de nacimientos [20].

1.7 Diferencias en la vía de nacimiento

Las diferencias en las que influye la vía de nacimiento más publicadas se relacionan en la colonización de la microbiota intestinal de los recién nacidos. Los bebés que nacen por parto natural transitan por el canal vaginal donde son expuestos a la microbiota vaginal materna, que será la que colonizará el intestino del neonato. Mientras que los bebés nacidos por cesárea serán colonizados principalmente por la microbiota de la piel materna y el ambiente de bacterias de los hospitales.

Lactobacillus y *Bifidobacterium* son algunas de las especies de bacterias comensales que son dominantes en la colonización por la vía vaginal. Estas especies limitan la inflamación y participan en la regulación del peso corporal del hospedero, respectivamente [21].

Estas diferencias pueden influir en una respuesta inmune diferencial en los infantes de acuerdo con la vía de nacimiento, dado que el sistema inmune de la mucosa intestinal está ligado a los demás elementos inmunes del resto del organismo

En un estudio realizado en una amplia cohorte de niños australianos con seguimiento hasta los cinco años de edad, se observó que los infantes nacidos por cesárea tienen mayor riesgo de padecer enfermedades respiratorias y desórdenes metabólicos, comparado con aquellos nacidos por parto vaginal espontáneo [22]. Estos datos son consistentes con un meta análisis donde se reportó que las infecciones en el tracto respiratorio, el asma, rinitis alérgica y el peso corporal incrementado (como riesgo de obesidad) son más comunes en personas nacidas por cesárea que en aquellas nacidas por parto vaginal [21].

Sin embargo, también existen diferencias causadas por la vía de nacimiento que están relacionadas con el propio proceso fisiológico que implica el trabajo de parto. Este proceso es diferente e incluso puede ser anulado en el caso de las cesáreas programadas.

El trabajo de parto involucra una elevación transitoria de hormonas de adaptación al estrés, como son la oxitocina, la vasopresina, el cortisol y las catecolaminas. Además de favorecer una adaptación fisiológica del neonato a la vida extrauterina, también favorecen su maduración, con efectos beneficiosos sobre sus funciones respiratorias e inmunológicas [23]. Se ha demostrado que los niveles de cortisol y de adrenalina son más altos en la sangre de cordón de neonatos nacidos por parto vaginal debido a un mayor estrés perinatal. Dichas hormonas son necesarias para la maduración de los pulmones del recién nacido [21], [24].

En el laboratorio se han encontrado cambios de expresión genética entre los linfocitos T de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal, en particular en las células T CD4⁺ (Kempis-Calanis, datos no publicados). Asimismo, se ha encontrado que las células T provenientes de neonatos nacidos por cesárea tienen una

respuesta más fuerte y proliferan más en respuesta a la estimulación (Ventura-Martínez, datos no publicados), lo que sugiere que los linfocitos T neonatales adquieren tolerancia durante el parto vaginal, que no adquieren las células de neonatos nacidos por cesárea.

2. ANTECEDENTES

La alta susceptibilidad de los neonatos hacia las infecciones se ha asociado con un ambiente inmunosupresor activo en esta etapa temprana del desarrollo, de manera que las células con actividad inmunosupresora pueden estar involucradas.

2.1 Células Treg en neonatos

Se ha reportado que, en sangre de cordón umbilical humana, las células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) se encuentran enriquecidas en etapas tempranas de gestación y disminuyen inversamente con la edad gestacional. Así, las proporciones son más altas en neonatos de 23-34 semanas de gestación (9.7% del total de linfocitos T) que en los neonatos de término (7.5%), éstos últimos presentaron niveles similares a la sangre periférica de adultos (7.0%) [25].

En otro estudio realizado en sangre de cordón y sangre periférica de recién nacidos, se observó que las proporciones de Tregs aumentan de forma transitoria tras el nacimiento. Se reportó un aumento significativo en etapas neonatales tempranas (7-8 días después del nacimiento) comparado con las muestras colectadas el mismo día del nacimiento, y luego estos porcentajes disminuyen en etapas más tardías (2-4 semanas después del nacimiento). Además, este aumento de Tregs coincide con un aumento en células activadas con funciones supresoras. El aumento de Tregs activadas en recién nacidos de etapas tempranas puede desempeñar un papel

importante en la regulación inmunológica, al suprimir la activación excesiva de células T causada por la exposición inmediata a antígenos del medio ambiente después del nacimiento [26].

2.2 Células eritroides CD71⁺ en neonatos

Se ha demostrado que las células precursoras del linaje eritroide (CD235a⁺), que expresan el receptor de Transferrina, también conocido como CD71, regulan las respuestas inmunitarias.

Las células eritroides CD71⁺ son eritrocitos inmaduros nucleados con funciones inmunosupresoras [27]. Son raras en la circulación periférica de adultos sanos, sin embargo, se eleva su frecuencia en mujeres embarazadas y ejercen actividad inmunosupresora promoviendo la tolerancia feto-materna [28].

Las células eritroides CD71⁺ se enriquecen en la sangre de cordón, donde se encuentran con mayor frecuencia en los primeros 7 días de vida. A partir de los 28 días su frecuencia comienza a disminuir considerablemente con el paso del tiempo. Se ha demostrado en neonatos humanos que las células eritroides CD71⁺ reducen la capacidad productora de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En ratones, al conferir actividad inmunosupresora reducen la protección contra infecciones, pues al eliminarlas *in vivo* se anuló el efecto supresor sobre las células inmunitarias, resultando en una eficiente eliminación de los patógenos y una mayor supervivencia de los ratones neonatales [29].

En ratones, el mecanismo por el que estas células controlan la activación de otras células inmunitarias es mediante la producción de arginasa II, una enzima encargada de hidrolizar la L-arginina, aminoácido importante para la proliferación y

activación de las células T [27], [30]. En humanos, se demostró que el mecanismo por el cual estas células inmunosuprimen es mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y también mediante la actividad de la arginasa II [27], [29].

En otro estudio realizado en ratones, se encontró que la presencia de la subpoblación de células eritroides CD71⁺, que expresan el receptor inhibitorio de activación VISTA, se favorece la diferenciación de las células T CD4⁺ vírgenes hacia un fenotipo regulador mediante la producción de TGF- β . La eliminación *in vivo* de las células eritroides no cambió la frecuencia de las células T reguladoras, pero sí su fenotipo, pues aumentaron la expresión de CD25. Por otro lado, la eliminación de las células Tregs mostró un incremento en los porcentajes de las células eritroides CD71⁺ [31]. VISTA también se expresa altamente en la superficie de células eritroides CD71⁺ de sangre periférica de neonatos humanos, por lo que podrían tener un efecto similar al de los ratones [29].

2.3 Vía de nacimiento y expresión de citocinas

En un estudio en el que se evaluó la producción de citocinas comparando la vía del nacimiento, se reportó que la secreción de IL-13 e IFN- γ es más alta en CBMCs de neonatos de cesárea, mientras que los niveles de IL-10 se encuentran reducidos comparado con aquellos nacidos por parto vaginal. Esto podría estar asociado con una mayor susceptibilidad a enfermedades inflamatorias y alérgicas en los niños nacidos por cesárea [32].

2.4 Justificación

Si bien, una colonización diferente de la microbiota intestinal, dependiente de la vía de nacimiento, está relacionada con diferencias en la respuesta inmune de los infantes, es importante considerar que el propio trabajo de parto también podría influir directamente sobre las células inmunitarias.

Comprender mejor los factores que influyen en la maduración y el desarrollo del sistema inmune es sustancial. En un país como México, en donde las cesáreas corresponden a más de la mitad de los nacimientos, se torna necesario considerar los efectos que la cesárea podría tener sobre el desarrollo del sistema inmune de los infantes, sin olvidar las características particulares del ambiente inmunosupresor que se encuentra en la etapa neonatal. Por lo anterior, en este proyecto se propone comparar la influencia que tiene la vía de nacimiento sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ neonatales y evaluar el papel que ejercen las células eritroides CD71⁺ y las Tregs sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea.

2.5 Objetivo general

Comprender la influencia de las células T reguladoras y de las células eritroides CD71⁺ en la activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea.

2.6 Objetivos particulares

1. Comparar la expresión de las proteínas CD25, IFN- γ , IL-4, e IL-13, en respuesta a la activación con anticuerpos anti-CD3 y CD28 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea

2. Evaluar el efecto de eliminar a las células eritroides CD71⁺ y/o a las células T reguladoras sobre la expresión de las proteínas CD25, IFN- γ , IL-4, e IL-13 en linfocitos activados T CD4⁺ y T CD8⁺ de neonatos de parto vaginal y de cesárea.
3. Evaluar la expresión de los genes *IL-4*, *IL-10*, *CD25* e *IFN- γ* en respuesta a la activación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en CBMCs de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea.
4. Evaluar el efecto de eliminar a las células eritroides CD71⁺ y/o a las células T reguladoras sobre la expresión de los genes *IL-4*, *IL-10*, *CD25* e *IFN- γ* en respuesta a la activación con anticuerpos anti-CD3 y CD28 en CBMCs de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea.

2.5 HIPÓTESIS

La eliminación de las células T reguladoras y las células eritroides CD71⁺ permitirá una mayor activación de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ de neonatos, siendo más notoria la activación en los linfocitos T de neonatos de cesárea.

3. METODOLOGÍA

3.1 Purificación de Células Mononucleares de Sangre de Cordón

Se capturaron muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos de término (nacidos a partir de las 37 semanas de gestación) nacidos por parto vaginal o por cesárea. La sangre fue colectada después del parto y antes de la expulsión de la placenta en el Hospital General de Temixco y se procesaron el mismo día de la

recolección. A partir de la sangre de cordón, se purificaron las CBMCs mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep™.

Este paso fue seguido de una etapa de adherencia a plástico durante toda la noche para eliminar los monocitos.

3.2 Depleción de células Eritroides CD71⁺ y/o T reguladoras

Las CBMCs de cada muestra de neonato, fueron divididas en cuatro fracciones. Una fracción se usó como control sin depleciones (TOTAL); en la segunda fracción se eliminaron las células eritroides CD71⁺ (-CD71); en la tercera se eliminaron las células T reguladoras (-Treg); por último, en la cuarta fracción se depletaron ambas poblaciones celulares (-CD71/Treg). La depleción se realizó mediante perlas magnéticas con proteínas A/G acopladas a los anticuerpos correspondientes (anti-CD25 y/o anti-CD71) y el uso de un magneto.

Para verificar que las células Treg y eritroides CD71⁺ se eliminaron eficientemente se hizo una tinción con anti CD25-BV605, CD4-PerCP-Cy5.5 y CD71-APC y se valoró en el citómetro de flujo Attune, antes y después de las depleciones.

3.3 Estimulación de Linfocitos T

Una vez realizada la depleción, cada grupo de células se subdividió en dos fracciones; una fracción de células fueron activadas en presencia de anticuerpos murinos anti-CD3/CD28 y anti-IgG a una concentración final de 1 ug/mL y la segunda fracción sin ningún estímulo se usó como control basal. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. 6 horas antes de finalizar el estímulo se agregó al cultivo Brefeldina A 1000X a una concentración final de 1X, para favorecer la retención de las citocinas en el interior de las células.

3.4 Evaluación de producción de citocinas en Linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ por citometría de flujo

Para evaluar la producción de las citocinas en respuesta a la estimulación, se hizo una tinción de IL-4, IL-13, CD25, e IFN- γ en las CBMCs. También se realizó una tinción de CD8 y CD4 para evaluar la respuesta por separado en los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ y se evaluó mediante la técnica de citometría de flujo.

3.5 Evaluación de la expresión de genes de citocinas por RT-qPCR en CBMCs

Para evaluar la transcripción de los genes de citocinas *IL-4*, *IL-10*, *IFN- γ* y *CD25* en las CBMCs en respuesta a la estimulación se hizo mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR) con el método de SYBR Green. La expresión de los genes se cuantificó de forma relativa con el método de la curva estándar y se normalizó con la expresión del gen de referencia Beta-2 microglobulina (*B2M*).

3.5.1 Diseño de cebadores para cDNA

Los cebadores para los genes de interés se diseñaron con la herramienta “Primer-BLAST” de NCBI considerando el salto de exón (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Con el programa en línea “UCSC In-Silico PCR” se corroboró que los cebadores fueran específicos de producto (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

3.5.2 Extracción de RNA

Tras la estimulación de las CBMCs, se les extrajo el RNA total utilizando el reactivo TRIzol™ de acuerdo con el instructivo del proveedor. Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA con oligo-dT y la Transcriptasa reversa RevertAid.

3.6 Análisis estadísticos

Los datos de citometría de flujo fueron evaluados con la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de las diferencias de la activación entre las vías de nacimiento en CBMCs totales. Para la evaluación del efecto de las depleciones en cada vía de nacimiento se usó la prueba de Friedman. Por último, para comparar las diferencias en las respuestas de activación entre las vías de nacimiento de acuerdo con las depleciones se utilizaron pruebas de Mann-Whitney. Todas las comparaciones se realizaron con un nivel de significancia de 0.05 (*: $p < 0.03$, **: $p < 0.002$). Todos los análisis de citometría de flujo se hicieron con una $n=6$ en el caso de muestras de neonatos de parto vaginal y una $n=5$ en las muestras de cesárea.

4. RESULTADOS

4.1 Muestras biológicas

Se obtuvieron 11 muestras de sangre de cordón umbilical, 6 fueron provenientes de neonatos que nacieron por parto vaginal y 5 nacieron por cesárea. Todos fueron neonatos de término de una edad gestacional de entre 38 a 40 semanas. Los neonatos no presentaron signos de infección, fiebre o complicaciones al momento del nacimiento y sus madres se encontraban sanas.

4.2 Controles de depleción

Para evaluar la eficiencia de las depleciones, se hizo una tinción simultánea con anti CD71-APC, CD25-BV605 y CD4-PerCP-Cy5.5; también se tiñó con el colorante Fixable Near IR para poder excluir las células muertas del análisis. En la Figura 1 se muestra la estrategia de selección manejada para evaluar cada población celular. Primero se seleccionaron los eventos que pasan uno por uno en el citómetro y se excluyeron los dobletes, se hizo un segundo gate de singuletes dentro del primer gate para eliminar los dobletes que se hubieran pasado. Después se seleccionó la población de linfocitos seguido de la exclusión de células muertas. Por último, dentro del gate de células vivas se evaluó la proporción de células CD71⁺ y CD4⁺CD25⁺.

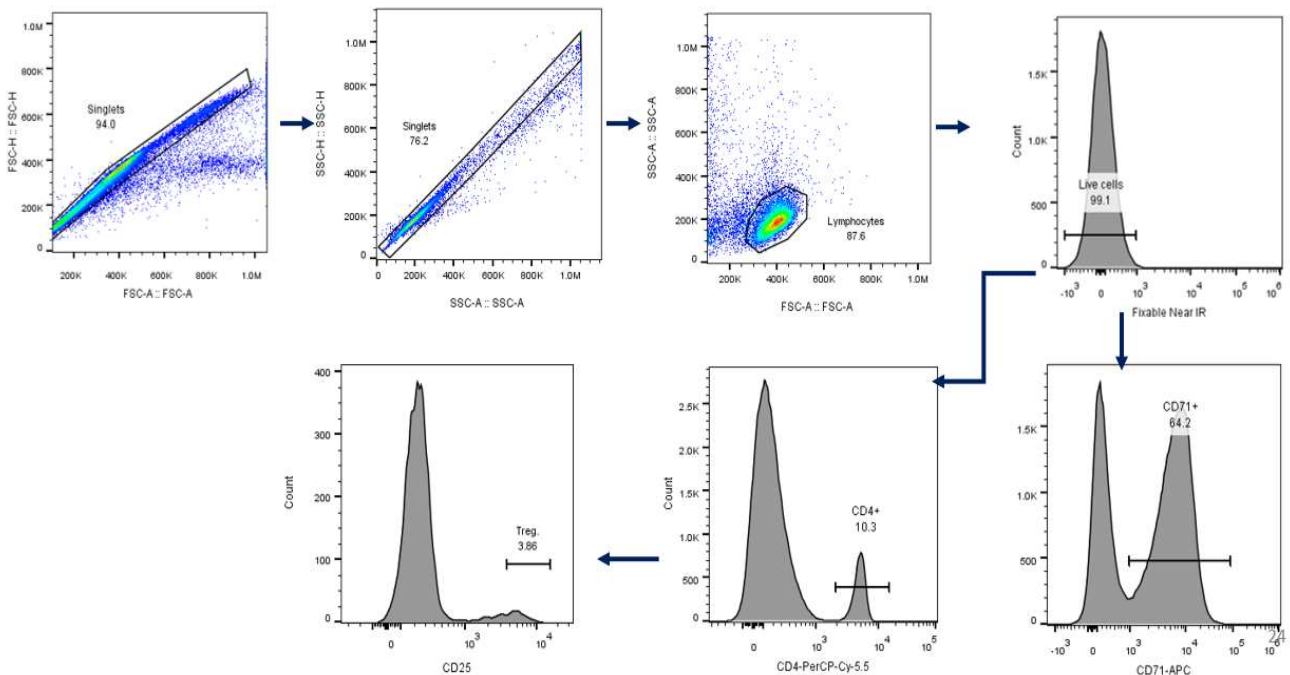


Figura 1. Estrategia de selección para la evaluación de las depleciones.

En la Figura 2 se muestran los resultados de las depleciones de las células eritroides CD71⁺. Se observó que estas células inmaduras se encuentran en proporciones similares entre las muestras de parto vaginal y las de cesárea, representando en promedio un 42.3% y 45.7 % de las células mononucleares, respectivamente. En ambos casos, se lograron eliminar eficientemente.

En la Figura 3 se presentan las proporciones de células Treg en las muestras de neonatos de parto y de cesárea. En promedio, las Treg representan el 5.6% de células T CD4⁺ de parto. De forma similar en las muestras de cesárea, las células Treg representan en promedio el 4.7% de los linfocitos T CD4⁺ totales. Su eliminación fue parcial, ya que solo se alcanzó a eliminar la mitad de la población Treg en las muestras de parto vaginal, mientras que en las de cesárea su eliminación fue menor. El aumentar el anticuerpo de depleción no mejoró este resultado.

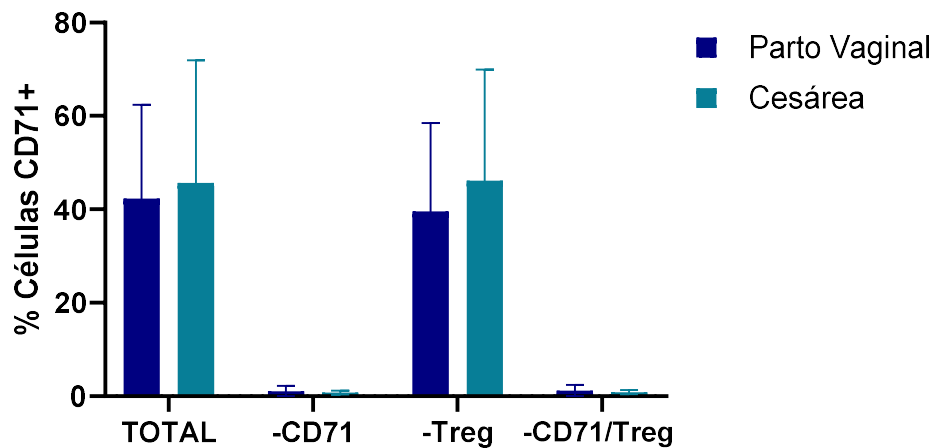


Figura 2. Porcentaje de células CD71⁺ antes y después de las depleciones.

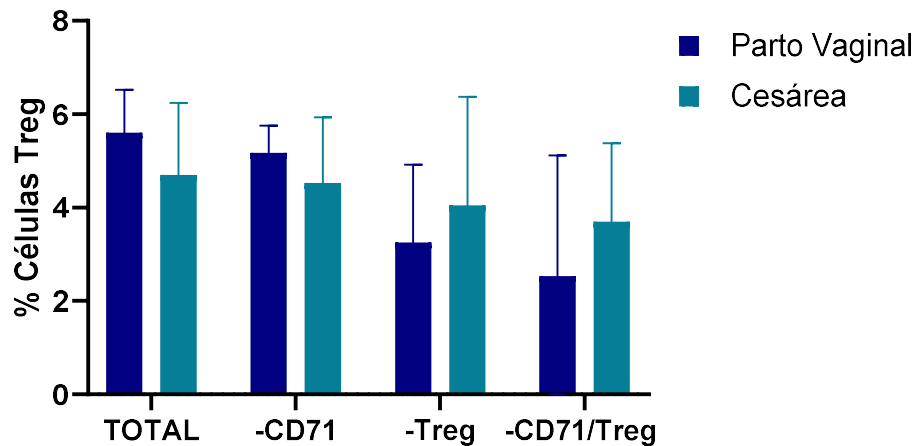


Figura 3. Porcentaje de células Treg en linfocitos T CD4⁺ totales, antes y después de las depleciones.

4.3 Evaluación de la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo

Para poder evaluar la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, tras la estimulación, se hizo una tinción simultánea con anti CD4-APC y anti CD8-VF450, además se tiñó con el colorante Fixable Near IR para poder distinguir las células vivas de las muertas. Esto fue seguido de un paso de permeabilización con metanol para permeabilizar las células y se tiñó con los fluorocromos respectivos para marcar las citocinas intracelulares.

En la Figura 4 se muestra la estrategia de selección general que se utilizó para evaluar la producción de citocinas. En los primeros gates se seleccionaron las células que pasan una por una en el citómetro y se excluyeron los dobletes. Después se seleccionó la población de linfocitos seguido de la exclusión de células muertas. Posteriormente se graficaron las células CD4⁺ vs. CD8⁺ para analizar de

forma independiente en cada población la expresión de las citocinas y del marcador de activación CD25.

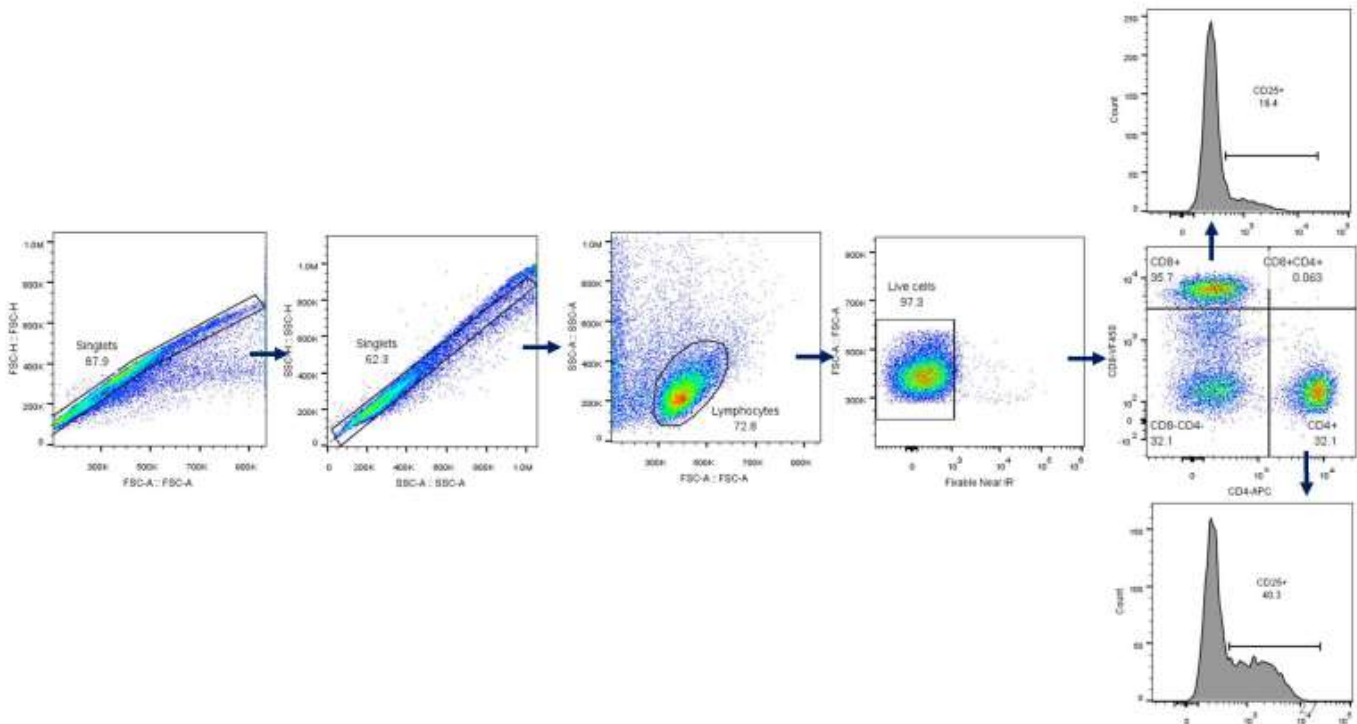


Figura 4. Estrategia de selección para la evaluación de producción de citocinas intracelulares en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

La expresión de las citocinas y del marcador de activación CD25 se muestra como la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) del control estimulado normalizada con la IMF de su respectivo control basal, cada dato representa el aumento relativo en respuesta al estímulo.

4.3.1 Activación de Linfocitos T de neonatos nacidos por parto vaginal o por cesárea

En la figura 5 se presenta la comparación de la activación de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y por cesárea en presencia de las células Treg y de las eritroides CD71⁺. Se observó una tendencia de una mayor activación en los

linfocitos T CD4⁺ de cesárea, de acuerdo con la expresión de CD25. Así como una tendencia de una mayor expresión de la IFN- γ y de la IL-4, mientras que no se observó un cambio en la expresión de la IL-13. Al comparar los niveles de expresión en respuesta al estímulo, se encontró que IFN- γ e IL-4 alcanzaron niveles significativos con respecto al control sin estimular en las células de neonatos nacidos por cesárea, mientras que en los neonatos nacidos por parto vaginal, sólo se alcanzó significancia estadística para la IL-4.

Al hacer la misma comparación en linfocitos T CD8⁺ se observó una tendencia de una mayor activación y expresión de IFN- γ , IL-4 y de IL-13 en las muestras de neonatos de cesárea. Al comparar la activación en respuesta al estímulo entre las formas de nacimiento, las tres citocinas alcanzaron una diferencia significativa con respecto al control sin estimular en células de cesárea, pero sólo la IL-4 alcanzó una diferencia significativa con respecto a su control en las células de neonatos nacidos por parto vaginal (Figura 6).

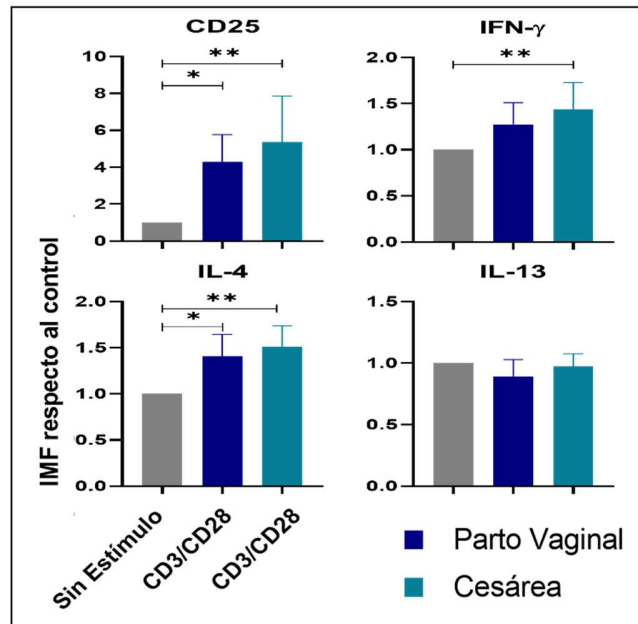


Figura 5. Comparación de la activación de Linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y por cesárea.

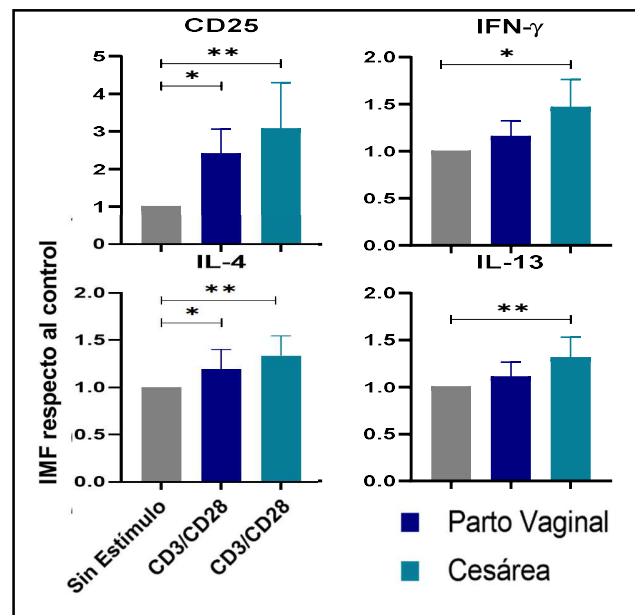


Figura 6. Comparación de la activación de Linfocitos T CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y por cesárea.

4.3.2 Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T de neonatos nacidos por parto vaginal

Posteriormente, se evaluó cómo influye la eliminación de las células eritroides CD71⁺ y/o las Treg sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos que nacieron por parto vaginal. En general, no se observaron diferencias significativas sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ tras las depleciones (Figura 7).

Al hacer las mismas evaluaciones en linfocitos T CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, se observa una tendencia de una mayor expresión de las citocinas y del marcador CD25 en ausencia de las células eritroides CD71⁺. Sin embargo, solo se alcanzó a observar una diferencia significativa en el aumento de la expresión de IFN- γ cuando se eliminaron las células eritroides CD71⁺ (Figura 8).

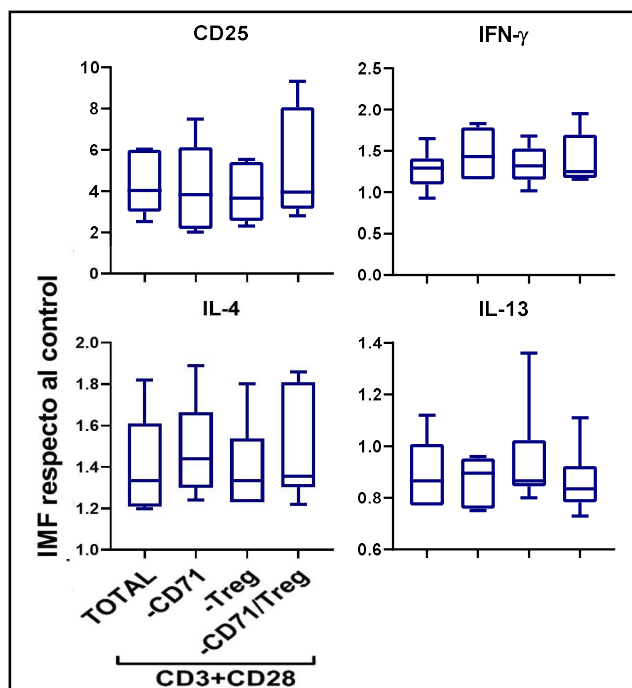


Figura 7. Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal.

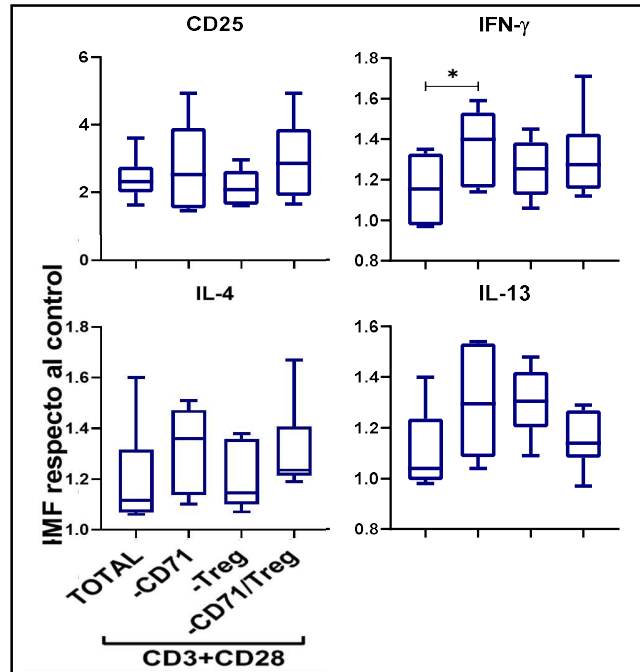


Figura 8. Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal.

4.3.3 Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T de neonatos nacidos por cesárea

En los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de cesárea, al comparar el efecto de la eliminación de las células eritroides y/o las Treg, se observó que la activación aumentó significativamente en ausencia de las células eritroides, tanto en la depleción simple como en la combinada con las Treg, de acuerdo con el aumento en la expresión de CD25.

También se pudo apreciar una tendencia de un aumento en la expresión de las citocinas en ausencia de las células eritroides CD71⁺. Sin embargo, el cambio solo fue significativo en la expresión de IFN-γ (Figura 9).

En los linfocitos T CD8⁺, de manera general, se observó una tendencia de una mayor activación en ausencia de las células eritroides CD71⁺. Esta mayor activación se pudo apreciar de forma significativa en el aumento de la expresión del marcador CD25 y de la expresión de la IL-4 (Figura 10).

Estos resultados sugieren que las células eritroides CD71⁺ ejercen una actividad supresora sobre los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea, ya que su eliminación favorece una mayor activación de los linfocitos T.

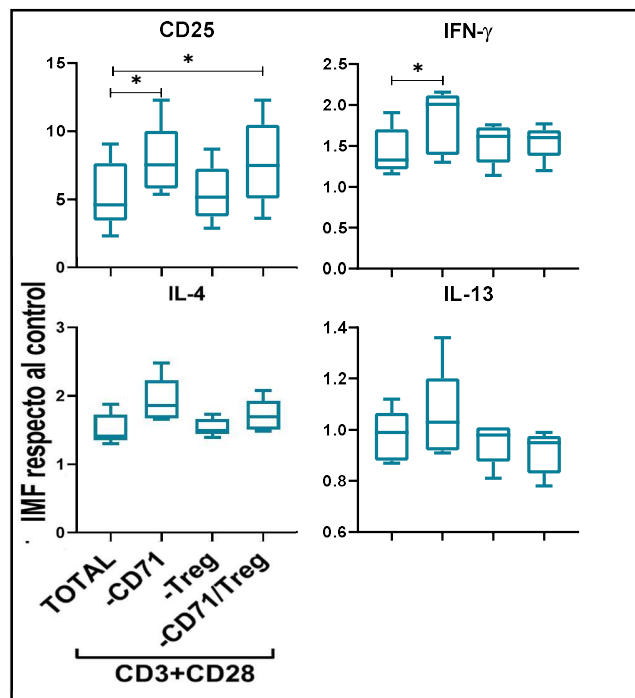


Figura 9. Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea.

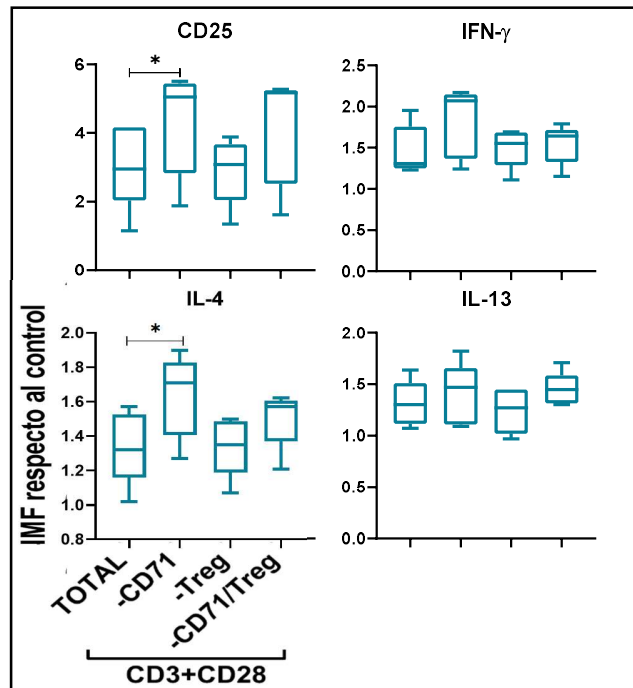


Figura 10. Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea.

4.3.4 Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T de acuerdo con la vía de nacimiento

Se realizó una comparación directa de las respuestas de activación entre las vías de nacimiento en cada control de depleción.

En los linfocitos T CD4⁺ se observaron diferencias significativas en la expresión de CD25 y de la IL-4 en ausencia de las células eritroides CD71⁺. Esto sugiere un mayor potencial de activación en las células T CD4⁺ de neonatos de cesárea, el cual se puede alcanzar solo en ausencia de las células eritroides CD71⁺ (Figura 11).

Por otro lado, en los linfocitos T CD8⁺ se observó una mayor expresión significativa de la IL-13 en las muestras derivadas de neonatos de cesárea cuando se eliminaron las células eritroides CD71⁺ y Treg (Figura 12).

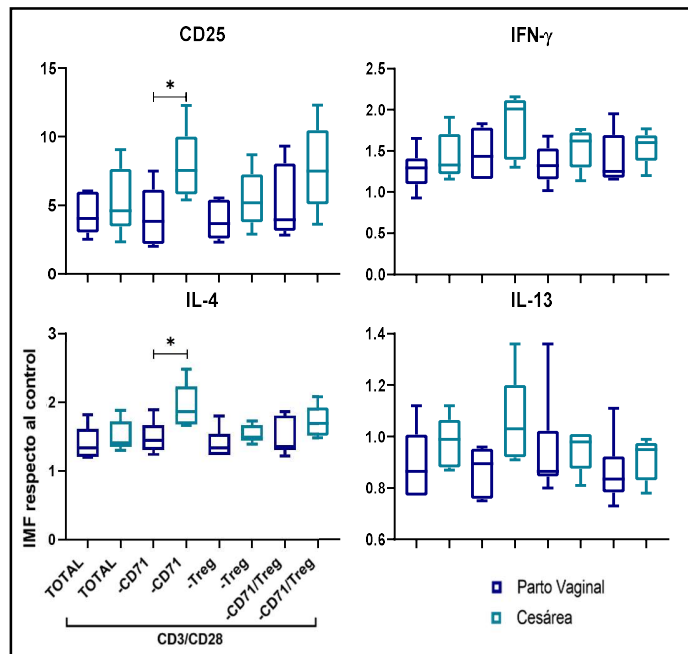


Figura 11. Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T CD4⁺ de acuerdo con la vía de nacimiento.

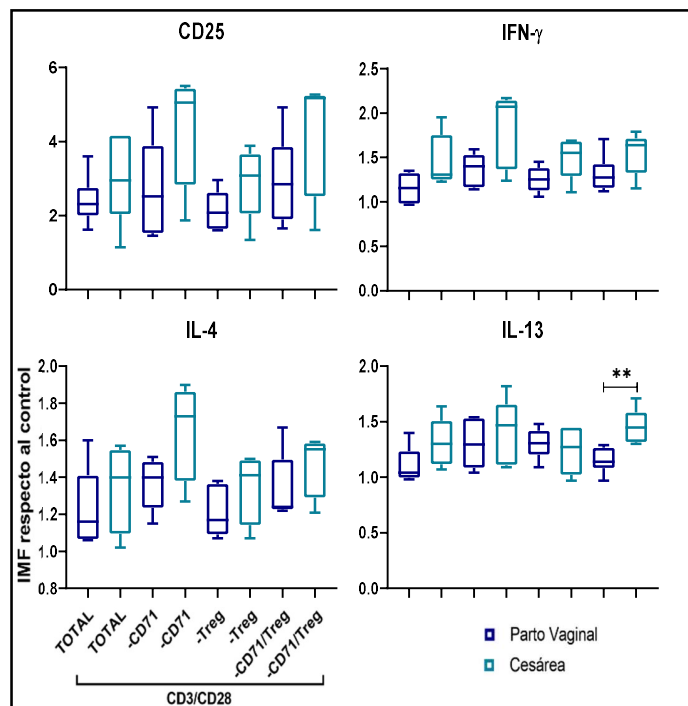


Figura 12. Efecto de las depleciones sobre la activación de linfocitos T CD8⁺ de acuerdo con la vía de nacimiento.

4.4 Efecto de las depleciones sobre la expresión de genes de citocinas en CBMCs de neonatos nacidos por parto vaginal

Para el último objetivo particular de este proyecto, se intentó evaluar la expresión de los genes *CD25*, *IFN- γ* , *IL-4* e *IL-10* en CBMCs neonatales de parto vaginal y de cesárea, en las distintas condiciones de depleciones. Sin embargo, obtener RNA de las muestras derivadas de neonatos de cesárea fue complicado para completar las réplicas completas con cada uno de los controles de depleción, porque obtenemos menos sangre de los neonatos nacidos por cesárea.

Se procedió a hacer las evaluaciones de la expresión de los genes únicamente en las muestras derivadas de neonatos nacidos por parto vaginal. Sin embargo, debido a la alta dispersión de los datos obtenidos, no se encontraron significancias estadísticas y no se observaron tendencias que correspondieran con los datos obtenidos en la producción de las proteínas (Figura 13).

Esto podría deberse a que las evaluaciones se realizaron sobre poblaciones celulares diferentes. Ya que la evaluación de la producción de las proteínas de citocinas se realizó discriminando las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Mientras que la evaluación de la expresión de genes por RT-qPCR se realizó en CBMCs totales, donde se encuentran otras poblaciones celulares que podrían estar influyendo en la expresión de los genes de interés.

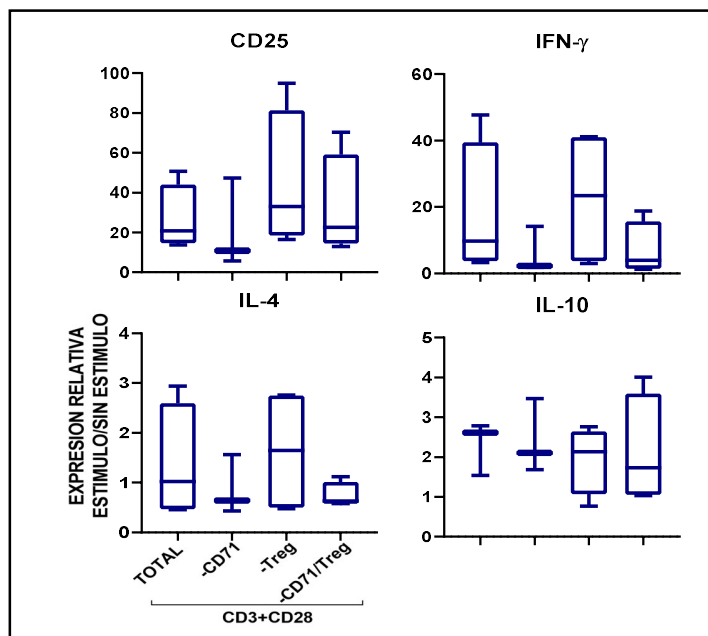


Figura 13. Efecto de las depleciones sobre la expresión de los genes *CD25*, *IFN-γ*, *IL-4* e *IL-10* en CBMCs de neonatos nacidos por parto vaginal

4.5 Discusión

En general, se observó una tendencia de una mayor activación en respuesta al estímulo en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de neonatos nacidos por cesárea comparados con los de parto vaginal, tanto a nivel del marcador de activación, CD25, como de la expresión de citocinas. Esto podría estar relacionado con una mayor ventana de tolerancia en las células de los neonatos nacidos por parto vaginal, que no tienen los nacidos por cesárea. Estas respuestas en etapas tan tempranas, donde aún no se ven influenciadas por la colonización de la microbiota, podrían estar relacionadas con las diferencias que existen en el trabajo de parto en las dos vías de nacimiento. Además, esta mayor tendencia a la activación pudiera estar relacionada con la predisposición a las alergias y estados de inflamación crónica que se han reportado en los niños nacidos por cesárea.

La depleción de células supresoras sólo se logró en su totalidad para CD71, por lo que no podemos concluir sobre las depleciones de las células Treg.

La eliminación de las células eritroides CD71⁺ permitió una mayor activación, en particular en la expresión de citocinas en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de cesárea. En los linfocitos T CD4⁺ neonatales de parto vaginal, no se observaron diferencias significativas en la activación con la eliminación de las células inmunosupresoras. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de parto vaginal mostraron una mayor expresión de IFN- γ en ausencia de las células eritroides CD71⁺.

Esto sugiere que las células eritroides inmaduras CD71⁺ tienen un papel importante en el mantenimiento del ambiente inmunosupresor sobre los linfocitos T neonatales, particularmente de cesárea. Es posible que este papel inmunosupresor sea más

importante en etapas más tempranas del periodo neonatal, ya que se ha reportado que su frecuencia disminuye drásticamente a partir de la primera semana de vida después del nacimiento [27]. Por otra parte, es posible que las Treg sean más importantes en etapas un poco más tardías, de acuerdo con lo ya reportado, donde existe evidencia de un incremento transitorio en la frecuencia de estas células durante la primera semana de vida [24].

El mantenimiento del ambiente inmunosupresor es importante en la regulación inmunológica, para limitar respuestas excesivas de los linfocitos T contra los antígenos comunes del medio ambiente después del nacimiento.

También se observó una mayor activación y expresión de la IL-4 y la IL-13 en linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente, de neonatos nacidos por cesárea comparado con los de parto vaginal. Estas diferencias se observaron solo cuando se eliminaron las células eritroides CD71+ y las Treg.

Lo anterior sugiere que, en ausencia del ambiente inmunosupresor, las células T de neonatos que nacen por cesárea tienen una predisposición hacia una mayor respuesta de tipo Th2. Esto podría estar relacionado con que las personas que nacieron por cesárea tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades como alergias y asma [21], [22]. Las cuales están asociadas a un desbalance en la respuesta inmune mediada por el fenotipo Th2, en donde las interleucinas 4 y 13 juegan un papel importante en la diferenciación y función de esta respuesta inmunitaria [33], [34].

4.6 Conclusiones

- Se estableció un protocolo eficiente de depleción de células eritroides inmaduras CD71⁺ en células mononucleares de sangre de cordón umbilical. Esto nos permitió analizar la influencia de dichas células sobre la activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos. Las células Treg solo se pudieron eliminar en un 50%.
- Las células T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos que nacieron por cesárea mostraron una tendencia de una mayor respuesta de activación, con respecto al control sin estimular, comparada con la respuesta de las células de neonatos nacidos por parto vaginal.
- Las células eritroides inmaduras CD71⁺ parecen ejercer un efecto inhibitorio sobre la activación de las células T, particularmente sobre las células provenientes de neonatos nacidos por cesárea. Al eliminar a las células eritroides se observó una mayor respuesta de activación respecto al control total (donde se encuentran presentes dichas células), tanto en las células T CD4⁺ como en las CD8⁺ de neonatos de cesárea.
- En ausencia de las células eritroides CD71⁺, las células T CD4⁺ estimuladas de neonatos de cesárea expresan significativamente más el marcador de activación CD25⁺ y la IL-4, comparado con las células de neonatos nacidos por parto vaginal.
- En ausencia de las células eritroides CD71⁺ y las Treg, las células T CD8⁺ estimuladas de neonatos nacidos por cesárea expresan significativamente

más la IL-13, comparado con las células de neonatos nacidos por parto vaginal.

Referencias

- [1] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, "Inmunología celular y molecular," 2015.
- [2] J. Parkin and B. Cohen, "An overview of the immune system," *The Lancet*, vol. 357, no. 9270, pp. 1777–1789, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
- [3] J. M. M. den Haan, R. Arens, and M. C. van Zelm, "The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells," *Immunology Letters*, vol. 162, no. 2, pp. 103–112, 2014, doi: [10.1016/j.imlet.2014.10.011](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.011).
- [4] D. L. Mueller and M. K. Jenkins, "Molecular mechanisms underlying functional T-cell unresponsiveness," *Current Opinion in Immunology*, vol. 7, no. 3, pp. 375–381, 1995, doi: [10.1016/0952-7915\(95\)80113-8](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80113-8).
- [5] J. M. Curtsinger, D. C. Lins, and M. F. Mescher, "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: Dissociating proliferation and development of effector function," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 9, pp. 1141–1151, 2003, doi: [10.1084/jem.20021910](https://doi.org/10.1084/jem.20021910).
- [6] F. Annunziato, C. Romagnani, and S. Romagnani, "The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 135, no. 3, pp. 626–635, 2015, doi: [10.1016/j.jaci.2014.11.001](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.001).
- [7] H. W. Mittrücker, A. Visekruna, and M. Huber, "Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 62, no. 6, pp. 449–458, 2014, doi: [10.1007/s00005-014-0293-y](https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y).
- [8] D. A. A. Vignali, L. W. Collison, and C. J. Workman, "How regulatory T cells work," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 7, pp. 523–532, 2008, doi: [10.1038/nri2343](https://doi.org/10.1038/nri2343).
- [9] B. Adkins, C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, "Neonatal adaptive immunity comes of age," *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 7, pp. 553–564, 2004, doi: [10.1038/nri1394](https://doi.org/10.1038/nri1394).
- [10] O. Levy, "Innate immunity of the newborn: Basic mechanisms and clinical correlates," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 5, pp. 379–390, 2007, doi: [10.1038/nri2075](https://doi.org/10.1038/nri2075).
- [11] M. Prabhudas *et al.*, "Challenges in infant immunity: Implications for responses to infection and vaccines," *Nature Immunology*, vol. 12, no. 3, pp. 189–194, 2011, doi: [10.1038/ni0311-189](https://doi.org/10.1038/ni0311-189).
- [12] E. Liu, H. K. W. Law, and Y. L. Lau, "Tolerance associated with cord blood transplantation may depend on the state of host dendritic cells," *British Journal of Haematology*, vol. 126, no. 4, pp. 517–526, 2004, doi: [10.1111/j.1365-2141.2004.05061.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05061.x).
- [13] E. Rainsford and D. J. Reen, "Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation," *British Journal of Haematology*, vol. 116, no. 3, pp. 702–709, 2002, doi: [10.1046/j.0007-1048.2001.03321.x](https://doi.org/10.1046/j.0007-1048.2001.03321.x).
- [14] S. Goriely *et al.*, "Deficient IL-12(p35) Gene Expression by Dendritic Cells Derived from Neonatal Monocytes," *The Journal of Immunology*, vol. 166, no. 3, pp. 2141–2146, 2001, doi: [10.4049/jimmunol.166.3.2141](https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.2141).
- [15] S. Basha, N. Surendran, and M. Pichichero, "Immune responses in neonates," *Expert Review of Clinical Immunology*, vol. 10, no. 9, pp. 1171–1184, 2014, doi: [10.1586/1744666X.2014.942288](https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.942288).
- [16] Organización Mundial de la Salud, "Mejorar la supervivencia y el bienestar de los recién nacidos," 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/newborns-reducing-mortality>
- [17] Mayo Clinic, "Cesárea." <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/c-section/about/pac-20393655>
- [18] C. Bernal-García and C. N. Escobedo Campos, "Cesárea: situación actual y factores asociados en México Cesarean section: current situation and associated factors in Mexico," *Revista Salud Quintana Roo*, vol. 11, no. 40, pp. 28–33, 2018.
- [19] I. ARTETA, "MÁS CESÁREAS QUE PARTOS NATURALES EN MÉXICO. POR LA PANDEMIA, EL SECTOR SALUD DEJA A LAS MUJERES SIN OPCIÓN A ELEGIR," 2020. [Online]. Available: <https://mujeres-covid-mexico.animalpolitico.com/aumento-cesareas-sin-opcion>
- [20] Organización Mundial de la Salud, "Declaración de la OMS sobre tasas de cesárea," 2015.

- [21] A. Słabuszewska-Jóźwiak, J. Krzysztof Szymański, M. Ciebiera, B. Sarecka-Hujar, and J. Grzegorz, "Pediatrics Consequences of Caesarean Section — A Systematic Review and Meta-Analysis," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, no. 8031, 2020, doi: 10.3390/ijerph17218031.
- [22] L. L. Peters *et al.*, "The effect of medical and operative birth interventions on child health outcomes in the first 28 days and up to 5 years of age: A linked data population-based cohort study," *Birth*, vol. 45, no. 4, pp. 347–357, 2018, doi: 10.1111/birt.12348.
- [23] R. M. Tribe, P. D. Taylor, N. M. Kelly, D. Rees, J. Sandall, and H. P. Kennedy, "Parturition and the perinatal period: can mode of delivery impact on the future health of the neonate?," *The Journal of Physiology*, vol. 596, no. 23, pp. 5709–5722, Dec. 2018, doi: 10.1113/JP275429.
- [24] A. Elbay *et al.*, "Intraocular pressure in infants and its association with hormonal changes with vaginal birth versus cesarean section," *Int Ophthalmol*, vol. 36, no. 6, pp. 855–860, Dec. 2016, doi: 10.1007/s10792-016-0215-6.
- [25] Y. Takahata *et al.*, "CD25+CD4+ T cells in human cord blood: An immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene," *Experimental Hematology*, vol. 32, no. 7, pp. 622–629, 2004, doi: 10.1016/j.exphem.2004.03.012.
- [26] S. Hayakawa, N. Ohno, S. Okada, and M. Kobayashi, "Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 190, no. 2, pp. 268–279, 2017, doi: 10.1111/cei.13008.
- [27] S. Elahi *et al.*, "Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection," vol. 504, no. 7478, pp. 158–162, 2014, doi: 10.1038/nature12675.Immunosuppressive.
- [28] C. Delyea *et al.*, "CD71 + Erythroid Suppressor Cells Promote Fetomaternal Tolerance through Arginase-2 and PDL-1," *The Journal of Immunology*, vol. 200, no. 12, pp. 4044–4058, 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1800113.
- [29] S. Elahi *et al.*, "CD71+ Erythroid Cells in Human Neonates Exhibit Immunosuppressive Properties and Compromise Immune Response Against Systemic Infection in Neonatal Mice," *Frontiers in Immunology*, vol. 11, no. November, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.597433.
- [30] P. C. Rodriguez, D. G. Quiceno, and A. C. Ochoa, "l-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression," *Blood*, vol. 109, no. 4, pp. 1568–1573, Feb. 2007, doi: 10.1182/blood-2006-06-031856.
- [31] S. Shahbaz *et al.*, "CD71 + VISTA + erythroid cells promote the development and function of regulatory T cells through TGF- β ," *PLoS Biology*, vol. 16, no. 12, pp. 1–26, 2018, doi: 10.1371/journal.pbio.2006649.
- [32] S. L. Liao *et al.*, "Caesarean Section is associated with reduced perinatal cytokine response, increased risk of bacterial colonization in the airway, and infantile wheezing," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-07894-2.
- [33] K. Bao and R. L. Reinhardt, "The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity," *Cytokine*, vol. 75, no. 1. Academic Press, pp. 25–37, Sep. 01, 2015. doi: 10.1016/j.cyto.2015.05.008.
- [34] I. S. Juntila, "Tuning the cytokine responses: An update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. JUN. Frontiers Media S.A., Jun. 07, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00888.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



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

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: Influencia de las células eritroides CD71⁺ y T reguladoras sobre la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos humanos nacidos por cesárea y parto vaginal, que presenta la alumna **Alejandra Cedillo Baños** (10053493) para obtener el título de Maestro en Ciencias.

Director de tesis: Dra. María Angélica Santana Calderón.
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Gabriela Rosas Salgado FM - UAEM	APROBADO	
Dr. Otoniel Rodríguez Jorge CIDC - UAEM	APROBADO	
Dr. Alfredo Lagunas Martínez INSP	APROBADO	
Dra. Delia Vanessa López Guerrero FN - 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:2023-10-05 11:54:05 | Firmante

NJwBesUCmGow3dsi1xEvXeUvZ63cFhbyHUGzCPVofqP/3n+b4nnlssrkGIZqhd4aCCYfZEWYlzeVoGtc0URjsiPcwj9fKbdzJWgVBCS+FNAmb7wVs5Tkt7mxmEQoGklowKdVuhjf2S43F+iSPIA0cuQikCvSoXzer/TVqmt7ugHPMINQ5yRW/3562DLMxAHdQS6+huFMPY8YnKjgNX1+31klQWZx02D+h87RFur6+IQrktS4G6HxryqH8723K0EFFmflTGj8967Y5+ngW5H03xNuWZl6oLvzk0LpU5OI+RAZg6l8Cqx0Mc9ATqTbWDM2bhAr9AYsrrDCHttRM/Q==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-10-05 12:15:21 | Firmante

VXX8WBD9g1Ik+aklKkUgD+yhaa8WcHe546mGMU0sy2txiPAH6FELLzX9nWeNCdaqXMx1x9nUnB6Oci2rENayKIUgwiayVhGB9ZPC8nlaohLNJUexsxt+ToMERa8nBO3WfP8uKK07MF+ahZkgboOMpOz8fpuLApfa+/wShLTX60mWG5bQebd/eDjGo3x9NMSbhJwwubAyNO7NRICWR/aAl8hojy0GR0NRtaSp0DI6lZjGtKpxTfhNskljGxYjCStHyS4TQk5hJPFuZQzTPGaE5R3SuXKdwGq9mDpp9ZtLEST+4aeA0BdkCgORjLnkT3vi+giOlgnkyQNaBO53R6eg==

OTONIEL RODRIGUEZ JORGE | Fecha:2023-10-05 12:17:06 | Firmante

Vm14dpXNjN1RaL8l0qQjSGyU3NonQxhOsFE3JM1e1ebAcbyYAdRtO+1SIh/PmUFu+tDKnXs5NHuRbCt/UjDEO4A48NPoTJ/BMYT3pa9TIMhN+TB5K6I8bdAmp9ueQaFmdrL1Hdzob7MUZSlGw/4MUgYr24IRikqhTvMtrvH91YgDreEe/J/X4Y7gedIF0855UAouc07oEcyiiM6d6iW+NjpJAVmzGcWMXLmWJ/4Nggmb3mizHWUNbe7VIU59FDB+Ky5ucC2nvogBlS90KpGvkZrjG4m8CO0AGX8+TxGM3E/vUQJwIDUQHDSYrh25rRtr3Bf3ZwgFivFV7C7aufSueGQ==

ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ | Fecha:2023-10-05 12:30:45 | Firmante

su9/0Qlv29BBmVnMvWpLhL5+KqiSQkTPdt2JvXxkMJt+2VobyJgVC10bLOWbajFGrwjRfi+SHT+x01tfAgMgSaeQpW2EwRmj0IGo19PWvdu5ODTsWbPJRr/r9rp5vuTcmuhMVj2jyGKGW+HWHr6v3aVWQkmS4eAizQfH2hOQzLPTpQF0+mgcn3RIVu1G3CDOpME7YAtgrVQLhrdJVEsOGTVZMGcWmGxASNgvy1j1O2KBCHgZl3awds/E1yma8c0mgoiZW55LVBcn8AW3K2h6nSu49VdWkHk4age5gyA9iAR7dSM2VVHIErj9P3cHxjllrTmOqGjeyFv55uccZftA==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2023-10-05 16:49:37 | Firmante

VHEKGV2ocJ/K4ZIMqQFEABhLvCIZ7ke3QzcZdaMkruAgqhLq/jOR603gyTkyxCPi6vBfbVlrvUAmFtv27h+on7ECVUnTyKTJKWpMLy8oLaulw9ah1MBeOknyZTKRkhy4iZfeW0jYmvgC59qkPwZTKSTJUWAlOTojrS9af/QDG12zZLFwG+fHSU36AKJLorbgRvHsD6X8Ggfw+Tl8wdPaZ+lse/ICbWfFaBw4/9u/DrbCTHb3AF1X4RSZaSG6X9raP+p6XjFWICC8epLsI6AviA8iftEZDPRBib1gv/gaAp42nQlrmNunX+jslMuSsnrJzoUNoj1u7My6sk9fsMbeQ==

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



Uip9O3lhg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/tuDNQL15KLe9TSP6b8rbVaQPffKs0ul>

