



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Evaluación de la actividad inumnosupresora de los
reticulocitos sanguíneos neonatales humanos”**

T E S I S

Que presenta

VLADIMIR HERMAN MIGUEL

**Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS**

**En la especialidad de
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directores de la Tesis:

DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ

DR. FELIPE ORTIZ CONTRERAS

Ciudad de México

JULIO, 2018

Agradecimientos

Non nobis Dómine, non nobis, sed nomini tuo da gloriam.

A mis padres, Ovidio Herman y Lara y María Miguel Rosalino y mi hermana Claudia Ivette Herman Miguel, por su amor y apoyo incondicional.

A mi amada Andy, mi compañera de vida, mi musa y mi amparo inefable. Eres mi todo.

A mi tutor, el doctor Marco Antonio Vega, porque su dirección, vocación y ejemplo han sido invaluable en mi formación personal y profesional.

Al doctor Felipe Ortiz Contreras, por su egregia orientación, comprensión y denuedo en escabrosos momentos que forjaron mi educación.

A mis asesores, los doctores Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi y Matilde Mineko Shibayama Salas, por sus correcciones, observaciones y sugerencias dirigidas a este escrito.

A la bióloga María del Carmen Ramírez Estudillo y al técnico Luis Alberto Hernández González, sin su apeo y colaboración este trabajo no se hubiese concluido.

A mis compañeros de laboratorio, América, Mario, Francisco, Jessica, Ximena, Diana y Axel, por sus consejos, resuellos, cariño, auxilie y grata camaradería.

A mi mejor amigo Rigoberto

A mi familia, amigos y seres queridos.

Al CINVESTAV y todo el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

Al doctor Javier Mancilla Ramírez, la doctora Martha Patricia Morales Morales y a todo el equipo que integran las jefaturas de enseñanza e investigación del Hospital de la Mujer.

Al doctor Shokrollah Elahi y la Universidad de Alberta por su asistencia experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de manutención con número 451418 y al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la asignación del “apoyo económico complementario para la realización de estudios de maestría en el área de la salud”, folio 2018-26.

Índice

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	V
I. RESUMEN	VI
II. SUMMARY	VII
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Antecedentes generales	1
1.1.1. Las características del sistema inmunológico neonatal los hace susceptibles a las infecciones	1
1.1.2. Las células precursoras eritroides regulan la respuesta inmunológica neonatal	2
1.1.3. Eritropoyesis	3
1.1.4. Las células precursoras eritroides suprimen la respuesta inmunológica innata y adaptativa	5
1.1.5. La actividad inmunosupresora de las células precursoras eritroides es producida por factores solubles y de contacto	6
1.1.6. Los reticulocitos son las células precursoras eritroides más abundantes en neonatos e infantes	8
1.2. Antecedentes específicos	10
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. PREGUNTA CIENTÍFICA	14
5. HIPÓTESIS	15
5.1. H ₀	15
5.2. H ₁	15
6. OBJETIVOS	16
6.1. Objetivo general.....	16
6.2. Objetivos específicos	16
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1. Diseño de estudio.....	17
7.2. Ubicación espacio – temporal.....	17

7.3.	Universo de trabajo	17
7.3.1.	Sujetos de estudio	17
7.4.	Estrategia experimental.....	19
7.5.	Criterios de selección.....	20
7.5.1.	Criterios de inclusión.....	20
7.5.2.	Criterios de exclusión.....	21
7.6.	Estrategias de muestreo.....	22
7.6.1.	Diseño y tipo de muestreo.....	22
7.7.	Colecta de muestras	22
7.8.	Técnicas y procedimientos.....	23
7.8.1.	Recuento de reticulocitos y células eritroides precursoras nucleadas	23
7.8.2.	Aislamiento de células mononucleares leucocitarias sanguíneas.....	26
7.8.3.	Aislamiento de reticulocitos	27
7.8.4.	Tinción de células mononucleares con diacetato de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFDA, SE).....	28
7.8.5.	Ensayos de proliferación de células mononucleares leucocitarias en presencia de reticulocitos sanguíneos neonatales o de adultos	29
7.8.6.	Ensayos de proliferación de células leucocitarias en sangre completa	31
7.9.	Análisis estadístico.....	32
8.	LOGÍSTICA	33
8.1.	Recursos humanos	33
8.2.	Recursos materiales	33
8.3.	Recursos financieros	33
9.	CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	34
10.	RESULTADOS	35
10.1.	Los reticulocitos son las células eritroides CD45 ⁻ /CD71 ⁺ /CD235a ⁺ más abundantes en sangre periférica y cordón umbilical.....	35
10.2.	La linfoproliferación en sangre completa no se correlaciona con el nivel de reticulocitos CD45 ⁻ /CD71 ⁺ /CD235a ⁺	37
10.3.	El enriquecido de reticulocitos de cordón umbilical disminuye la capacidad de proliferación de MNC autólogos estimulados con mitógeno, y es dependiente de su concentración	39

11.	DISCUSIÓN	45
12.	PERSPECTIVAS	49
13.	CONCLUSIONES.....	51
14.	REFERENCIAS	52
15.	ANEXOS.....	61
15.1.	Consentimiento informado.....	61
15.2.	Dictamen del Hospital de la Mujer	63

Índice de tablas

Tabla 1. Medias de edad de los diferentes grupos formados. 18

Tabla 2. Indicaciones del internamiento de los niños hospitalizados del ISSSTE. 19

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo para el recuento de reticulocitos y precursores eritroides nucleados..... 24

Figura 2. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el recuento de reticulocitos y de precursores eritroides nucleados..... 25

Figura 3. Diagrama de flujo de los procedimientos para el aislamiento y cocultivo de reticulocitos y MNC..... 27

Figura 4. Estrategia de análisis por citometría de flujo para evaluar la proliferación de MNC teñidas con CFSE..... 30

Figura 5. Diagrama de flujo de los ensayos de linfoproliferación en sangre completa. . 32

Figura 6. Las células eritroides CD45-/CD71+/CD235a+ sanguíneas son principalmente reticulocitos..... 37

Figura 7. La linfoproliferación en sangre completa, estimulada con mitógeno, no se correlaciona con la proporción de reticulocitos CD45-/CD71+/CD235a+..... 38

Figura 8. Características del enriquecido de reticulocitos de cordón umbilical. 39

Figura 9. Los reticulocitos sanguíneos neonatales inhiben la proliferación de MNC autólogos estimulados con mitógeno. 41

Figura 10. Efecto del cocultivo del enriquecido de reticulocitos de cordón umbilical sobre la proliferación de MNC de adultos. 42

Figura 11. Características del enriquecido de reticulocitos de sangre periférica de adultos..... 43

Figura 12. Efecto del cocultivo del enriquecido de reticulocitos de sangre periférica de adultos sobre la proliferación de MNC autólogos..... 44

I. Resumen

Las infecciones neonatales representan un grave problema de salud en México, debido, en parte, a una mayor susceptibilidad a las infecciones como consecuencia de una inmunosupresión activa mediada por células precursoras eritroides humanas. Los reticulocitos son las células precursoras eritroides más abundantes en sangre y, al igual que los precursores nucleados, su número se encuentra 400 veces más elevado en el periodo neonatal que en el adulto. Sin embargo, su capacidad inmunosupresora se desconoce. Por lo tanto, se plantea evaluar la actividad inmunosupresora de los reticulocitos sanguíneos neonatales humanos en la proliferación *in vitro* de los linfocitos sanguíneos. Se determinó la presencia de poblaciones eritroides, en muestras de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica de neonatos, lactantes, preescolares y adultos, utilizando los marcadores de linaje CD71 y CD235a y una tinción nuclear con DAPI. Para evaluar la capacidad inmunosupresora, se cultivaron reticulocitos aislados de sangre de cordón umbilical y periférica, de neonatos y adultos, respectivamente, con células mononucleares sanguíneas (MNC), neonatales y de adultos y se les midió su capacidad proliferativa con tinción de CFDA, ante un estímulo con mitógeno. A su vez, con el propósito de encontrar una correlación entre la proliferación de linfocitos y los valores de poblaciones eritroides *ex vivo*, se evaluó su capacidad de proliferación en las muestras de sangre periférica completa, bajo estas mismas condiciones. Se encontró que las células CD71⁺/CD235a⁺ evaluadas en todos los grupos evaluados fueron reticulocitos (DAPI⁻), en una proporción de 3 a 5 veces mayor con respecto a las células nucleadas (DAPI⁺) y sus niveles disminuyeron drásticamente en los primeros meses de vida. Su número no se correlacionó con la capacidad de proliferación *ex vivo* de los linfocitos estimulados con mitógeno; sin embargo, son capaces de disminuir la proliferación de MNC aislados autólogos neonatales de una forma dependiente de la concentración. Los reticulocitos sanguíneos de adultos no mostraron efecto inmunosupresor significativo, posiblemente, porque los reticulocitos neonatales son CD71⁺/CD235a⁺ en una proporción mayor que los adultos. En conclusión, los reticulocitos sanguíneos neonatales humanos poseen actividad inmunosupresora y esta se relaciona con la expresión de los marcadores CD71 y CD235a.

II. Summary

Neonatal infections represent a serious health problem in Mexico, due, in part, to an increased susceptibility to infections as a consequence of active immunosuppression mediated by human erythroid precursor cells. Reticulocytes are the most abundant erythroid precursor cells in blood and, like nucleated precursors, their number is 400 times higher in the neonatal period than in adults. However, its immunosuppressive capacity is unknown. Therefore, it is proposed to evaluate the immunosuppressive activity of human neonatal blood reticulocytes in the *in vitro* proliferation of blood lymphocytes. The presence of erythroid populations was determined in umbilical cord and peripheral blood samples from neonates, infants, preschoolers and adults, using CD71 and CD235a lineage markers and a nuclear stain with DAPI. To evaluate the immunosuppressive capacity, reticulocytes were isolated from umbilical cord and peripheral blood, from neonates and adults, respectively, were cultured with blood mononuclear cells (MNC) stimulated with mitogen, neonatal and adult cells and their proliferative capacity was measured with CFDA staining. In turn, in order to find a correlation between the proliferation of lymphocytes and the values of *ex vivo* erythroid populations, their proliferation capacity was evaluated in the whole peripheral blood samples, under these same conditions. It was found that the CD71 + / CD235a + cells evaluated in all the groups evaluated were reticulocytes (DAPI-), in a proportion of 3 to 5 times higher than nucleated cells (DAPI +) and their levels decreased drastically in the first months of life. Their number did not correlate with the *ex vivo* proliferation capacity of lymphocytes stimulated with mitogen; though, they are able to decrease the proliferation of neonatal MNC isolated in a concentration-dependent manner. Adult blood reticulocytes showed no significant immunosuppressive effect, possibly, because neonatal reticulocytes are CD71 + / CD235a + in a higher proportion than adults. In conclusion, human neonatal blood reticulocytes possess immunosuppressive activity and this is related to the expression of markers CD71 and CD235a.

1. Antecedentes

1.1. Antecedentes generales

1.1.1. Las características del sistema inmunológico neonatal los hace susceptibles a las infecciones

La mortalidad infantil, en los primeros 5 años de vida, es considerada de los principales indicadores de salud dentro de una población¹. En el 2015, se reportaron 5.9 millones de muertes en menores de 5 años a nivel mundial y dos terceras partes fueron debidas a enfermedades infecciosas, en su mayoría por sepsis y meningitis, tanto en infantes como en neonatos (donde ocurrieron el 45.1% de las muertes)^{2,3}. Aunque en países desarrollados, como Australia, la mortalidad por causas infecciosas en neonatos es sólo del 3.3%, el 70% de estas muertes ocurrieron en prematuros⁴. A pesar de que no alcanzarse globalmente el Cuarto Objetivo del Milenio, de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de reducir la mortalidad infantil en dos tercios entre 1990 y 2015^{5,6}, México fue uno de los 68 países en lograrlo⁷, al ampliar la cobertura de vacunación, implementar esquemas de hidratación oral en los casos de diarreas agudas, mejorar las condiciones higiénico-dietéticas, etc⁸. No obstante, las enfermedades infecciosas siguen estando dentro de las primeras causas de mortalidad (sepsis neonatal, neumonía, influenza y enfermedades diarreicas) y constituyen la primera causa de morbilidad infantil en nuestro país^{5,8,9}. Para el año 2015, las muertes en menores de 1 año en México superaron las producidas por homicidio (26,057 contra 20,762) y de estas primeras, el 49.85% fueron por causas prevenibles¹⁰.

La sepsis neonatal, que se define como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), resultado de una infección, probada o sospechada, durante el primer mes de vida extrauterina¹¹, se presenta con tasas de 2.8 a 8.6 por cada 1,000 recién nacidos vivos y exhibe una letalidad entre el 25 y 30 % en países en vías de desarrollo, como México¹². La incidencia de la enfermedad y su letalidad es mayor conforme aumenta el grado de prematurez¹¹ y alrededor de una cuarta parte de los prematuros nacidos antes de las 32 semanas de gestación desarrollarán sepsis neonatal grave durante el periodo neonatal¹³. La mayor incidencia y mortalidad, con respecto a lactantes y adultos, se atribuye, principalmente, a las diferencias en la respuesta inmunológica ante patógenos¹⁴.

Existe una marcada susceptibilidad a las infecciones entre los recién nacidos, prematuros y a término, y lactantes, en comparación con preescolares o adultos, principalmente a patógenos intracelulares¹⁴⁻¹⁶. Tradicionalmente, esta susceptibilidad se ha explicado como resultado de un sistema inmunológico inmaduro que tiene que desarrollarse a través de múltiples retos antigénicos a lo largo de la vida del individuo¹⁷⁻²⁰, o como la persistencia de la tolerancia fetomaterna posparto²¹. Entre las diferencias encontradas en recién nacidos y lactantes, con respecto a los adultos, se encuentran una producción disminuida de citocinas proinflamatorias, por parte de células mononucleares, así como una menor capacidad de montar simultáneamente una respuesta múltiple de citocinas en presencia de patrones moleculares asociados a patógenos¹⁸, un menor número de células progenitoras monocíticas y granulocíticas, que se traduce en un defecto cuantitativo de células efectoras ante la infección²² y un sistema inmunológico adaptativo incapaz de establecer una robusta respuesta ante infecciones, encontrándose que los linfocitos B y T son principalmente antiinflamatorios y tolerogénicos, debido a un fenotipo programado desde las células troncales hematopoyéticas en los neonatos y lactantes^{23,24}. Además, la respuesta de anticuerpos es esencialmente de corta duración, manifiestan un retraso del inicio en su aparición, sus afinidades por los antígenos son menores que las registradas en adultos y ostentan diferencias en la distribución de subclases de IgG²⁴; entre otras características^{15-20,22,25}.

1.1.2. Las células precursoras eritroides regulan la respuesta inmunológica neonatal

No obstante, esta menor capacidad de respuesta del sistema inmunológico de los recién nacidos y lactantes, podría también deberse a un activo estado de inmunosupresión, en lugar de una inmadurez inherente de las células efectoras y de las células presentadoras de antígeno^{19-21,25,26}. Evidencia a favor de esta teoría, muestra que linfocitos T CD4⁺ neonatales secretan cantidades equivalentes de IL-2 y presentan una capacidad semejante de proliferación *in vitro*, comparado con células adultas, en respuesta a estímulos con anti-CD2/anti-CD28²⁷. También se ha reportado que los leucocitos de sangre completa de cordón umbilical secretan una proporción mayor de IL-6/TNF- α con respecto a sus contrapartes adultos, ante diferentes ligandos de receptores tipo Toll²⁸. De manera análoga en ratones, Elahi *et al.* demostraron que, cuando se transfieren células adultas esplénicas de linaje

inmunológico (CD11b⁺, CD11c⁺ y B220⁺) a ratones neonatos, su producción de TNF- α ante la infección con *Listeria monocytogenes* fue menor y comparable al de las células endógenas inmunitarias neonatales²⁹. En el mismo tenor, la producción de TNF- α , por parte de las células neonatales esplénicas de linaje inmunológico, se recupera al ser transferidas a ratones adultos infectados con *L. monocytogenes*²⁹. Este mismo grupo encontró que la capacidad inmunosupresora del bazo, de ratones neonatales, recaía en las células de linaje eritroide (CD71⁺/TER119⁺) y no en las de linaje inmunológico²⁹. De igual forma, demostraron que las células precursoras eritroides CD71⁺, de sangre de cordón umbilical de neonatos humanos, poseen actividad inmunosupresora y concluyen que podrían contribuir a la susceptibilidad a las infecciones en este grupo de edad^{26,29}. Recientemente, se ha descrito la regulación, que ejercen estas células, sobre la activación y expansión *in vitro* de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) y monocitos de cordón umbilical, estimuladas con anti CD3/CD28 y *L. monocytogenes*, respectivamente, de muestras provenientes de recién nacidos prematuros³⁰ y su participación en la tolerancia fetomaraterna³¹.

1.1.3. Eritropoyesis

La hematopoyesis es el proceso por el cual una población de células troncales (células troncales hematopoyéticas o HSC) proporciona un aporte continuo de células sanguíneas diferenciadas, a través de la generación de progenitores con una reducción secuencial de su pluripotencialidad³². En los seres humanos, el proceso de formación de las HSC principia alrededor de la quinta semana de gestación (SDG), en la región aorta-gónadas-mesonefros, desde donde estas células migran al saco vitelino, la placenta y el hígado³³. De la sexta a la vigesimosegunda SDG, este último órgano se convierte en el principal sitio hematopoyético y, desde la decimoquinta SDG, la médula ósea empieza su actividad, que se convierte prácticamente en el principal y exclusivo sitio hematopoyético en los seres humanos desde la vigésima SDG¹⁹. En ratones, además de la médula ósea, el bazo permanece como un importante sitio hematopoyético, incluso en la adultez. Bajo condiciones de estrés, como la hipoxia, este órgano se usa por ambas especies para expandir la capacidad eritropoyética³⁴. Las HSC sufren una serie de divisiones asimétricas que van generando células progenitoras con una menor capacidad de diferenciarse hacia los otros linajes hematopoyéticos (mieloide y linfoide) hasta dar origen a las unidades formadoras de colonias eritroides en ráfaga (BFU-E), que son las primeras células en comprometerse exclusivamente al linaje eritroide y que

se identifican por formar grupos de cientos o miles de eritroblastos inmaduros y no divisibles *in vitro*³⁵. Estas células son las únicas progenitoras eritroides que expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR) en su superficie³⁶ y que circulan en sangre periférica en condiciones fisiológicas³⁷ a una frecuencia de 1 a 4 células por cada 10,000 células mononucleares³⁸. Posteriormente, algunas de estas células se diferencian en unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), las cuales forman colonias de menor número, pero son entre 5 a 8 veces más abundantes que sus predecesoras³⁹. Estas células responden a la eritropoyetina, la cual previene su apoptosis y favorece su proliferación⁴⁰.

Las CFU-E se asocian a macrófagos especializados de médula ósea para formar la estructura de diferenciación terminal conocida como “isla eritropoyética”; compuesta por un macrófago central rodeado por hasta 30 células eritroides en distintos estadios de diferenciación, desde CFU-E hasta reticulocitos inmaduros⁴¹. En este nicho biológico se favorecen los principales eventos de la eritropoyesis, como la expansión y diferenciación de las CFU-E y proeritroblastos, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés; la síntesis masiva de hemoglobina por parte de los eritroblastos, la síntesis y el ensamblaje de los componentes de la membrana y el citoesqueleto del eritrocito maduro, la progresiva disminución del tamaño y complejidad celular en las últimas 3 a 5 mitosis asimétricas y la condensación y extrusión del núcleo eritroide^{37,41,42}. Asimismo, este proceso de diferenciación terminal se circunscribe a la médula ósea debido a que las fenestraciones capilares restringen el paso de los voluminosos eritroblastos a la circulación periférica⁴³.

El proeritroblasto, la primera célula morfológicamente distinguible del linaje eritroide, se diferencia y genera sucesivamente a los eritroblastos basófilos o basofílicos, a los policromatófilos o policromáticos y a los ortocromáticos. Estos últimos expelen su núcleo para dar lugar a los reticulocitos inmaduros³⁹. La diferenciación entre los eritroblastos se ha hecho a partir de sus características morfológicas y su apariencia ante la tinción de Giemsa de muestras obtenidas de aspirados de médula ósea. Sin embargo, cada uno de estos estadios pueden ser definidos por la expresión diferencial de marcadores de superficie y patrones de tamaño y complejidad intracelular por citometría de flujo^{37,42,44,45}. Estos últimos estadios de diferenciación han sido definidos en ratones⁴⁵ y en seres humanos⁴⁶ por la expresión del receptor de transferrina (o CD71), molécula que alcanza su máxima expresión en los

proeritroblastos, posee una expresión constante entre los eritroblastos y se torna indetectable en los reticulocitos maduros y eritrocitos^{46,47} y la glucoproteína A (GPA o CD235a en humanos⁴⁸ y TER119 en ratones⁴⁵), principal sialoglucoproteína y componente antigénico de la proteína M del grupo sanguíneo MNS de los eritrocitos humanos⁴⁹. Esta última molécula sigue una expresión opuesta al CD71, se delimita en menos del 4% de las CFU-E/proeritroblastos y llega a expresarse en el 100% de las células eritroides a partir de los reticulocitos inmaduros^{46,50}. La combinación de la expresión de GPA, banda 3 e integrina $\alpha 4$ permite aislar todos los estadios de diferenciación terminal de la eritropoyesis en muestras de médula ósea, incluyendo eritroblastos basófilos tempranos y tardíos, policromatófilos y ortocromáticos^{47,48}. La selección negativa de células de médula ósea para CD45, molécula prototipo de receptor tipo fosfatasa de tirosina y marcador de todas las células hematopoyéticas nucleadas y leucocitos⁵¹, y DRAQ5® como marcador nuclear, que coexpresan CD71 y CD235a, permite distinguir reticulocitos⁴⁶ y la intensidad media de fluorescencia alta o baja de CD71 sobre células CD45⁺/GPA⁻/LL-3R⁻/CD34⁺/CD36⁻ diferencia entre BFU-E y CFU-E, respectivamente^{47,48}.

1.1.4. Las células precursoras eritroides suprimen la respuesta inmunológica innata y adaptativa

La capacidad inmunosupresora de células precursoras eritroides nucleadas ha sido ampliamente documentada²⁶. Estas células son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos B y T, así como la producción de inmunoglobulinas en ratones y seres humanos^{52,53}. Las células precursoras eritroides (identificadas como CD3⁻/CD71⁺/CD235a⁺, después de su aislamiento por gradiente de densidad con Ficoll-Paqueam Plus®) de sangre de cordón umbilical humana, son 50 veces más abundantes con respecto a la concentración en sangre periférica de adultos, siendo más notorio en prematuros⁵⁴. Las células eritroides nucleadas de cordón umbilical, CD36⁺/CD71⁺/CD235a⁺, inhiben *in vitro* la síntesis de citocinas proinflamatorias de monocitos adultos de sangre periférica, activados con LPS y monocitos autólogos, de manera dependiente de la concentración⁵⁵. Este mecanismo está mediado por la inducción de la expresión de IL-10 en los monocitos, a través de un factor soluble no identificado⁵⁵. Este factor podría ser análogo al producido por células eritroides nucleadas esplénicas murinas: el cual, al ser agregado al medio de cultivo de linfocitos B murinos y humanos, estimulados con LPS y mitógeno de fitolaca (*Pokeweed mitogen*, PWM)

respectivamente, produce supresión de la proliferación y de la producción de IgM e IgG^{52,56}. De igual forma, las células eritroides nucleadas murinas derivadas, de médula ósea, disminuyen la capacidad de proliferación de líneas celulares tumorales malignas (L1210 y P815), en una proporción dependiente de la concentración⁵⁷.

A pesar de que los precursores y eritroides nucleados en humanos permanecen por un breve periodo de tiempo en sangre periférica (alcanzando valores de 7 %, con respecto a los leucocitos totales en recién nacidos a término y reduciendo su número a parámetros de adultos, entre 0 y 1 %, dentro de la primera semana de vida extrauterina)⁵⁸, el desarrollo de sepsis neonatal de inicio temprano (SNIT) se correlaciona con la concentración de estas células, ya que el riesgo de sepsis se duplica con cada orden de magnitud de aumento en la concentración de eritroides nucleados⁵⁹. A su vez, el aumento en el número de estas células, en el contexto de la SNIT, se correlaciona con mayores concentraciones de IL-6 en sangre de cordón umbilical, pero es independiente de hipoxia o estrés fetal (eritropoyetina, acidemia o cortisol)⁶⁰. La persistencia de células eritroides nucleadas en sangre periférica más allá del cuarto día es un predictor de mortalidad neonatal y de peor pronóstico en prematuros, con una sensibilidad del 82 % y una especificidad del 96 %⁴³.

1.1.5. La actividad inmunosupresora de las células precursoras eritroides es producida por factores solubles y de contacto

Pese a que la actividad inmunosupresora de las células precursoras eritroides ha sido atribuida a factores solubles y expresión de citocinas²⁶, la capacidad inmunosupresora de las células esplénicas eritroides CD71⁺ neonatales murinas, está mediada por su actividad de arginasa, ya que usando L-arginina o inhibidores específicos de la enzima, se revierte la inmunosupresión de células esplénicas adultas murinas²⁹. Por el contrario, el uso de inhibidores de otras moléculas inmunomoduladoras, como TGF- β , IDO, IL-10 o de ROS, no muestran un efecto supresor significativo²⁹. Conjuntamente, la inhibición de la arginasa no regula la producción de TNF- α de las células esplénicas adultas, lo que demuestra que la restauración de la producción de citocinas fue debida a la pérdida de la supresión ejercida por las células neonatales²⁹. Recientemente, se demostró que la capacidad de inhibir la fagocitosis de las células mononucleares por parte de las células eritroides CD71⁺, de sangre

de cordón umbilical humana, es reversible con L-arginina, y entonces adquieren una capacidad fagocítica similar a la de las células de sangre de adultos⁶¹.

La arginasa, la última enzima del ciclo de la urea, es responsable de la hidrólisis de la L-arginina en urea y ornitina⁶². Existen 2 isoformas, las arginasas I y II, cuya diferencia radica en su origen genético, distribución tisular, localización subcelular y funciones atribuidas, siendo la I asociada principalmente al ciclo de la urea y la II a la regulación de la síntesis de prolina y poliaminas⁶². La actividad de arginasa ha mostrado ser inmunosupresora ya que, al disminuir la disponibilidad de L-arginina en el microambiente, se regula negativamente la expresión de la cadena CD3 ζ en linfocitos T activados⁶³. Además, es necesaria para la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α) por macrófagos activados con LPS⁶³, ya que la L-arginina facilita la activación de la vía MAPK, previniendo la defosforilación e inactivación de la cinasa MAP3 (TPL-2), cuya ausencia impide la activación de la vía ERK1/2 por el LPS⁶⁴. También los linfocitos NK se regulan por la actividad de arginasa, debido a que, en ausencia de L-arginina, disminuyen su proliferación y la secreción de IFN- γ , inducida por IL-12/IL-18, y esta regulación se da a nivel postranscripcional⁶⁵. En fechas recientes, McGovern *et al.* demostraron que las células dendríticas fetales, pero no las de adultos, inhiben la producción de citocinas proinflamatorias de linfocitos T fetales, estimuladas con forbol miristato o ionomicina, y que esta inhibición es reversible con L-arginina o inhibidores de arginasa⁶⁶. Conjuntamente, las células dendríticas fetales exponen altas concentraciones de arginasa II y su modulación no depende de TLR⁶⁶.

En sangre de cordón umbilical humana, se ha demostrado una mayor expresión de arginasa I, por parte de células polimorfonucleares y mononucleares, con respecto a células leucocitarias adultas⁶⁷. Más aún, las células mononucleares neonatales disminuyen la proliferación de linfocitos T neonatales, pero no de los adultos, activadas con fitohemaglutinina, y es reversible con L-arginina⁶⁷. Aunado a esto, la actividad de arginasa está significativamente incrementada en sangre periférica de mujeres embarazadas y en las placentas de partos a término, y es producida, principalmente, por macrófagos y polimorfonucleares placentarios⁶⁸. También, hay un aumento en la concentración de células eritroides CD71⁺/CD235a⁺ en sangre periférica de mujeres y ratonas gestantes con respecto a las no gestantes. Las placentas de embarazos semialogénicos murinos (BALB/c con C57BL/6J) tienen una concentración mayor de células eritroides (CD71⁺/Ter119⁺) con

respecto al embarazo singénico. Conjuntamente, estas células placentarias expresan arginasa II, con mayor intensidad que las células eritroides esplénicas murinas³¹.

Este aumento en la actividad de arginasa por células sanguíneas, conjuntamente con la de otras células neonatales⁶⁷ y la precaria capacidad de síntesis de L-arginina en este grupo de edad⁶⁹, promueve un estado de hipoargininemia que es más notorio en recién nacidos prematuros⁶⁹, aunque también es patente en recién nacidos a término con respecto a los adultos⁶⁷ y este estado de relativa hipoargininemia se corrige con el desarrollo del recién nacido⁷⁰. Esto podría traer como consecuencia un desequilibrio entre arginasa/L-arginina, lo que resultaría en uno de los principales mecanismos que contribuyen a la respuesta inmunológica disminuida neonatal y una mayor susceptibilidad a las infecciones^{19,20,26,29,54,61,67,69,71}. La suplementación con L-arginina, en recién nacidos prematuros, ha mostrado ser eficaz en reducir la incidencia y mortalidad por enterocolitis necrotizante, enfermedad con un importante componente inflamatorio⁷¹.

A pesar de que Elahi *et al.* demostraron que la actividad inmunosupresora de las células esplénicas murinas precursoras eritroides CD71⁺ neonatales y las células neonatales humanas de cordón umbilical CD71⁺⁶¹ es debida a la actividad de arginasa II¹⁹, Cui *et al.* encontraron que las células eritroides nucleadas de cordón umbilical humanas (CD36⁺/CD71⁺/CD235a⁺) no expresan arginasa II²¹. Aunque estas células son capaces de producir inmunosupresión, ésta se encuentra mediada por la expresión de IL-10, por parte de los monocitos activados con LPS, y no es reversible con inhibidores de arginasa o con sobrecarga de L-arginina²¹. Otro mecanismo descrito en células eritroides murinas es la coexpresión de los ligandos 1 y 2 de dominios de muerte (PDL-1 y 2)³¹, los cuales se comportan como el principal elemento inmunomodulador de los linfocitos T reguladores en la tolerancia fetomaterna^{72,73}. Sin embargo, la expresión de estas moléculas no han sido evidenciada en células eritroides humanas³¹.

1.1.6. Los reticulocitos son las células precursoras eritroides más abundantes en neonatos e infantes

No obstante, la fracción mononuclear de sangre de cordón umbilical humana no solo está constituida con células eritroides nucleadas, sino que, además, es rica en una importante población de reticulocitos que, asimismo, coexpresan CD71⁺ y CD235a⁺⁴⁶. Wynn *et al.*

encontraron que, al someter a la fracción mononuclear de sangre de cordón umbilical a choque hipotónico, el número de células eritroides CD71⁺/CD235a⁺ se reducía en 85%, sugiriendo que se trataba de reticulocitos⁷⁴. Este hecho fue corroborado porque la fracción de células CD71⁺D235a⁺, obtenida por FACS, y teñida con Wright o nuevo azul de metileno y observada al microscopio de campo claro, estaba constituida predominantemente por reticulocitos⁷⁴. A pesar de que la actividad de arginasa de los reticulocitos no se ha evaluado directamente, los eritrocitos juveniles (reticulocitos) contienen mayor cantidad de arginasa con respecto a los eritrocitos maduros. A su vez, la actividad de arginasa en células rojas periféricas neonatales es 2 a 3 veces mayor que la de células rojas de niños sanos de 6 años de edad⁷⁵. De igual forma, la actividad de arginasa de células rojas heparinizadas periféricas (eritrocitos y reticulocitos), libre de la capa leucocitaria, muestra ser significativamente mayor entre neonatos, con respecto a lactantes (de 1 a 12 meses) y niños (de 1 a 16 años), donde entre estos últimos grupos no se encuentra diferencia significativa⁷⁶. Los reticulocitos y los precursores eritroides nucleados alcanzan concentraciones basales similares a los adultos en las primeras semanas de vida extrauterina en humanos⁷⁷, pero los primeros tienen una concentración en sangre periférica 400 veces mayor⁷⁷. Conjuntamente, las células rojas obtenidas de paquetes globulares (ricas en reticulocitos) poseen la capacidad de suprimir la producción de TNF- α de monocitos activados por LPS por un mecanismo no determinado, pero independiente de contacto y de IL-10⁷⁸. También esas células son capaces de inhibir la proliferación y síntesis de citocinas por parte de linfocitos T activados con anti-CD3/CD28⁷⁹ por un mecanismo dependiente de arginasa⁸⁰. Estos hallazgos podrían deberse a la actividad de arginasa de los reticulocitos CD71⁺/CD235a⁺, y no sólo a la de los precursores nucleados. Esta actividad podría participar en la generación del estado de hipoargininemia del recién nacido (y posiblemente de los lactantes), cuya consecuencia sería una inmunosupresión sistémica y, por lo tanto, un aumento de la susceptibilidad al desarrollo de infecciones; junto con otros posibles mecanismos inmunológicos descritos en estas poblaciones^{19,22,26}.

1.2. Antecedentes específicos

Los reticulocitos son las células precursoras eritroides inmediatas a los eritrocitos. Éstas se caracterizan por ser enucleadas y poseer RNA extranuclear (conocido como reticulina) que pierden progresivamente durante las 24 horas posteriores a su ingreso a la circulación sistémica, provenientes de la médula ósea⁸¹. Además, tienen un diámetro mayor (10-15 μm) contra 6-8 μm), poseen menor proporción de hemoglobina con respecto a los eritrocitos, haciéndolos menos densos ($\Delta\rho \approx 0.009 \text{ g/cm}^3$), son multilobulados y progresivamente sufren una remodelación del citoesqueleto y la membrana plasmática que los hace adoptar la forma bicóncava del eritrocito maduro⁸²⁻⁸⁴. Los organelos que retienen durante el proceso de diferenciación (mitocondrias, ribosomas y lisosomas) y el exceso de membrana, son expelidos vía mitoptosis, degeneración, autofagia y por producción y liberación de exosomas, respectivamente^{85,86}.

Estas células representan una población heterogénea que, de manera análoga a los eritroblastos, han sido clasificadas con base a sus características morfológicas con la tinción de azul de cresilo brillante o de nuevo azul de metileno⁸² o por la intensidad media de fluorescencia ante la tinción de naranja de tiazol⁸⁷, de donde se extrapola el índice de maduración de reticulocitos, parámetro clínico utilizado principalmente en la evaluación de la implantación del trasplante de médula ósea⁸⁸. También se ha utilizado el CD71 para la clasificación de los diferentes estadios de maduración de los reticulocitos de cordón umbilical humano⁸⁹. Usando este marcador, es posible evidenciar la disminución en la citoadhesión celular (por la disminución de CD49d), alteraciones en el metabolismo de la glucosa y aumento en la síntesis de ácido bórico, en la baja de la expresión de moléculas relacionadas con la formación de las islas eritropoyéticas (CD242 y CD236R) y en la disminución de la rigidez y aumento en la capacidad de deformidad de estas células⁸⁹. Estos últimos cambios se relacionan con la expresión diferencial de proteínas asociadas al citoesqueleto (CD44, CD147, CD238, CD240DCE) y microtúbulos (tubulina β y talina 1/2)^{89,90}.

Dada su vida media tan corta (aproximadamente de 2 a 3 días en médula ósea y un día en sangre periférica^{81,82}), tradicionalmente no se les ha atribuido otro papel fisiológico que convertirse en eritrocitos, para cumplir su función de hematosis y participar en el equilibrio

ácido base⁸¹. Su número se utiliza en la clínica para estimar el grado de eritropoyesis efectiva^{81,91}.

A la fecha, no se ha evaluado el efecto inmunosupresor de los reticulocitos sanguíneos humanos. Sin embargo, se ha demostrado que el RNA del reticulocito es capaz de traducirse, aunque el consenso actual es que esas proteínas participan exclusivamente en la síntesis de hemoglobina y en las proteínas necesarias para completar su proceso de maduración⁹², sin embargo, también sintetizan factores inmunorreguladores, como la arginasa^{29,62,75,76}. Además, poseen un metabolismo más complejo y composición de membrana distinto a los eritrocitos maduros⁸⁴, lo que explica, en parte, la predilección de algunas especies de *Plasmodium* spp. por este precursor eritroide⁹³, lo que, en su conjunto, haría suponer que poseen mecanismos de expresión de factores inmunorreguladores, como se ha demostrado para los precursores eritroides nucleados⁵⁵ y los eritrocitos⁸⁰.

Los valores normales de reticulocitos en adultos oscila entre el 0.5 y 1.5%, con respecto a los eritrocitos^{81,82,91}, aunque en recién nacidos es entre 3 y 8%, y su número disminuye a lo largo del primer mes de vida extrauterina⁴⁰. Sus valores se correlacionan inversamente con la anemia fisiológica del recién nacidos, siendo aún más pronunciada la relación y el recuento de reticulocitos en recién nacidos prematuros, donde los precursores nucleados y los reticulocitos se encuentran en concentraciones de 2 a 3 veces mayores con respecto a los nacidos a término^{40, 49, 50}.

El recuento de reticulocitos al nacimiento es el valor más alto registrado durante la vida de los individuos sanos. Una abrupta caída en su recuento típicamente ocurre durante la primera semana de vida extrauterina, con un ligero aumento esperado entre 2 y 3 semanas después, para posteriormente caer a lo largo de los siguientes 3 meses^{40, 49}. De igual manera, el riesgo y la gravedad de sepsis neonatal se correlaciona directamente con el grado de prematurez de los neonatos^{11,12,26,94}.

La relevancia fisiológica de las células eritroides CD71⁺ en seres humanos radica en que poseen actividad inmunosupresora y que solamente se encuentran aumentadas en el periodo perinatal, lo que favorecería la colonización temprana por la microbiota, reduciendo el proceso inflamatorio asociado al estímulo antigénico, pero con el invariable aumento en la susceptibilidad a infecciones^{17-19,26,29,53,61,62,78,79}. Por lo que, al ser los reticulocitos las células

precursoras eritroides más abundantes en el periodo perinatal^{35, 40, 44, 49} y posiblemente poseer capacidad inmunosupresora, podrían contribuir en la generación del estado de inmunosupresión activo que hace a los recién nacidos susceptibles a las infecciones. Este mecanismo podría ser dependiente de contacto²⁶, mediado por factores solubles^{26,52,55,79} o dependiente de arginasa^{29,61}, como se han descrito en otras células precursoras eritroides y eritrocitos. De igual manera, este mecanismo podría afectar tanto la inmunidad innata como adquirida, como demuestra en las células CD71⁺ de sangre de cordón umbilical humana^{53,61}.

Es posible que, como los esplenocitos eritroides murinos neonatales, los reticulocitos tengan una capacidad inmunosupresora selectiva en el periodo neonatal y ésta se pierda con el desarrollo de los individuos^{29,61}. Esto podría ser evaluado al comparar la capacidad de proliferación de linfocitos T, estimulados con mitógeno, como el PWM^{95,96}, en cocultivo con reticulocitos neonatales de recién nacidos a término o prematuros; ya que la capacidad de activación de los linfocitos T se encuentra regulada negativamente en el periodo neonatal^{19,23,25,66} y su facultad de proliferación y síntesis de citocinas se ve disminuida en presencia de células eritroides CD71⁺ neonatales humanas⁵³. Esta actividad inmunosupresora de los reticulocitos neonatales, de igual manera, podría no estar restringida a leucocitos autólogos, sino que, como Elahi *et al.* demostraron que esta actividad, podría extenderse sobre linfocitos T humanos adultos. Aunque, por razones evidentes, no es posible tener humanos singénicos de diferentes edades, los reticulocitos son células anucleadas⁸¹ y, por lo tanto, expresan pobremente antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase I⁹⁷, por lo que, podrían realizarse cocultivos alogénicos entre células eritroides neonatales y monocitos humanos adultos, como lo reportado por Cui *et al.*⁵⁵. De esta manera se podría determinar la posible capacidad inmunosupresora de los reticulocitos y su relevancia fisiológica en el periodo neonatal.

2. Justificación

Los padecimientos infecciosos en los recién nacidos representan un importante problema de salud, social y económico en nuestro país. Las enfermedades infecciosas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en las etapas tempranas de la vida, principalmente en el primer mes de vida, por la inherente susceptibilidad a estos padecimientos en este grupo de edad. Esto hace de principal interés el conocer los mecanismos que producen dicha susceptibilidad y desarrollar medidas que la eviten o prevengan. Existe evidencia de que esta susceptibilidad esté mediada, en parte, por un estado de inmunosupresión activo transitorio presente en el periodo neonatal, que podría tener como finalidad la de permitir el proceso de colonización de las mucosas, por parte de la microbiota, sin que se establezca un proceso inflamatorio en su contra. Esto traería, como consecuencia indeseable, un aumento en la predisposición a infecciones en el periodo neonatal. Dentro de los responsables en producir esa inmunosupresión transitoria se encuentran las células precursoras eritroides humanas. Se ha descrito la actividad inmunosupresora de los precursores eritroides nucleados neonatales y el efecto inmunosupresor del concentrado eritrocitario postransfusión; no obstante, esta actividad no ha sido evaluada en los reticulocitos, los cuales son 400 veces más abundantes que los precursores eritroides nucleados y se encuentran fisiológicamente aumentados en el periodo neonatal. Por lo que demostrar su posible capacidad inmunosupresora en los recién nacidos, arrojaría información importante acerca de las causas de la susceptibilidad aumentada de los recién nacidos a las infecciones y permitiría el diseño de estrategias que podrían convertir a estas células en un nuevo blanco diagnóstico y terapéutico, con el objetivo de predecir el riesgo a infecciones neonatales y permitir mejorar las respuestas inmunológicas contra las infecciones en este crucial periodo del desarrollo.

3. Planteamiento del problema

Se ha demostrado que las células precursoras eritroides humanas de sangre de cordón umbilical son inmunosupresoras y se ha corroborado, *in vitro*, la capacidad de los precursores nucleados de inhibir la síntesis de TNF- α de monocitos autólogos activados con LPS, así como la capacidad fagocítica de células mononucleares, dependiente de arginasa II y la inmunidad adaptativa, tanto de linfocitos B como T, estimuladas con *Bordetella pertussis*. Los reticulocitos son las células precursoras eritroides más abundantes en sangre de cordón umbilical y periférica y, al igual que los nucleados, sus concentraciones se encuentran fisiológicamente elevadas en el periodo neonatal, aunque en una proporción 400 veces mayor. Sin embargo, su capacidad inmunosupresora se desconoce. Por lo que, si se demuestra esta actividad, podrían tener mayor relevancia fisiológica en la susceptibilidad a infecciones en los recién nacidos humanos que las células precursoras eritroides nucleadas.

4. Pregunta científica

¿Pueden los reticulocitos sanguíneos neonatales humanos, inhibir *in vitro* la proliferación de células mononucleares leucocitarias autólogas y de adultos, activadas con mitógeno y esta actividad correlaciona con su presencia en sangre periférica?

5. Hipótesis

5.1. H 0

Los reticulocitos sanguíneos, de recién nacidos humanos, no inhiben *in vitro* la proliferación de células leucocitarias mononucleares, autólogas y de adulto, activadas con mitógeno, al ser cocultivadas, por lo que no tienen actividad inmunosupresora.

5.2. H 1

Los reticulocitos sanguíneos, de recién nacidos humanos, inhiben *in vitro* la proliferación de células leucocitarias mononucleares, autólogas y de adulto, activadas con mitógeno, al ser cocultivadas, por lo que podrían poseer actividad inmunosupresora.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar la posible actividad inmunosupresora de reticulocitos sanguíneos neonatales humanos en cocultivos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica.

6.2. Objetivos específicos

- 6.2.1. Determinar los niveles relativos de reticulocitos y precursores eritroides nucleados sanguíneos, que expresen los marcadores de superficie CD235a y CD71, de muestras de sangre de cordón umbilical y muestras de sangre periférica de neonatos, lactantes, preescolares y adultos.
- 6.2.2. Analizar la relación entre el número de reticulocitos sanguíneos, que expresen los marcadores de superficie CD235a y CD71, y la capacidad de proliferación *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica (PBMNC), activadas con mitógeno, de muestras de sangre completa de cordón umbilical y muestras de sangre periférica de neonatos, lactantes, preescolares y adultos.
- 6.2.3. Evaluar el efecto del cocultivo de reticulocitos sanguíneos de recién nacidos y de adultos, sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos sanguíneos de adultos y de cordón umbilical, activados con mitógeno.

7. Material y métodos

7.1. Diseño de estudio

Estudio piloto experimental, prospectivo, prolectivo, heterodémico y multicéntrico.

7.2. Ubicación espacio – temporal

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio 5 de Inmunobiología de Mucosas, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM), del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV – IPN), en el periodo comprendido de agosto de 2017 a julio de 2018. Se emplearon muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos a término, nacidos en el Hospital de la Mujer de la Secretaría de Salud Federal (HM-SSA), ubicado en Prolongación Díaz Mirón 374, Colonia Santo Tomás, C. P. 11340, Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México; que cumplieron con los criterios de inclusión 7.5.1.1, y muestras de sangre periférica de neonatos y lactantes internados en el Hospital Regional tipo B de Alta Especialidad “Bicentenario de la Independencia” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), ubicado en calle Ciruelos 4, colonia Lázaro Cárdenas, C. P. 54916, Tultitlán de Mariano Escobedo, Estado de México; que cumplieron con los criterios de inclusión 7.5.1.1 y 7.5.1.2, respectivamente; recolectadas entre enero y abril de 2018. Las muestras de sangre periférica de adultos se obtuvieron de personas sanas voluntarias, estudiantes y trabajadores del CINVESTAV-IPN, en abril de 2018.

7.3. Universo de trabajo

7.3.1. Sujetos de estudio

Bajo consentimiento informado de los padres o tutores legales, se incluyeron muestras de sangre de cordón umbilical de 12 neonatos, nacidos a término en el servicio de tococirugía del HM-SSA. Estos fueron 6 niños y 6 niñas, con un peso medio de 3,008.33 gramos (rango intercuartílico de 2,745-3,230 gramos) y, con excepción de 4 individuos nacidos por cesárea (33.33 %), fueron eutócicos (vía vaginal). Las indicaciones de las cesáreas fueron: falta de progresión del trabajo de parto (2), oligohidramnios y por iterativa. Seis niños nacieron de madres primigestas (50 %), dos de madres secundigestas (16.67 %) y cuatro de madres en su tercera gestación (33.33 %). Ninguna de ellas presentó antecedentes clínicos de relevancia

(criterios de exclusión 7.5.2.4). El protocolo fue registrado ante el Comité de Investigación de ese hospital (HM-INV/2018:02.09) (anexo 15.2).

Tabla 1. Medias de edad de los diferentes grupos formados.

	Recién nacidos (n=12)	Neonatal temprano ³ (n=20)	Neonatal tardío ³ (n=12)	Lactante menor ³ (n=15)	Lactante mayor ³ (n=6)	Preescolar ³ (n=8)	Adultos (n=12)	Valor <i>p</i>
Edad (en días, media (RIC) [SDG¹])	0 [38.45 (38.05-38.675)]	2.85 (1-4)	12.67 (9.75-12.25)	55.73 (36.5-60)	230 (210-240)	1,338.33 (1095-1642.5)	11,406.25 (9,763.75-12,227.5)	<0.0001 ²

¹Media, en semanas de gestación (SDG) (rango intercuartílico [RIC]).

²Prueba de Kruskal Wallis.

³Pacientes hospitalizados en el ISSSTE.

Se obtuvieron 61 muestras de desecho de sangre periférica de niños hospitalizados del ISSSTE que se dividieron en 3 grupos: neonatal temprano (de 1 a 7 días, n=20), neonatal tardío (de 8 a 28 días, n=12) y lactante menor (1 a 6 meses, n=15). Pese a no estar contemplado en el protocolo, se incluyeron dos grupos adicionales: lactante mayor (6 a 12 meses, n=6) y preescolar (1 a 5 años, n=8), debido a que cumplieron con los criterios de inclusión 7.5.1.2, con excepción del criterio 7.5.1.2.1. El 67.85 % fueron niños y el 32.15 % niñas. Las medias de edad de los grupos se muestran en la tabla 1. Las indicaciones del internamiento se muestran en la tabla 2.

Por último, se obtuvieron 12 muestras de adultos voluntarios sanos, estudiantes y trabajadores del CINVESTAV-IPN. Ocho fueron hombres (66.67%) y cuatro mujeres (33.33%). Las medias de edad entre los grupos mostraron una diferencia significativa ($p < 0.0001$) (tabla 1).

Tabla 2. Indicaciones del internamiento de los niños hospitalizados del ISSSTE.

Padecimiento	Frecuencia (%) (n=61)
Prematurez y complicaciones relacionadas	28 (45.9 %)
Síndrome de dificultad respiratoria en no prematuros	16 (26.23 %)
Infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad	6 (9.84 %)
Fracturas	3 (4.92 %)
Mielomeningocele	2 (3.28 %)
Tetralogía de Fallot	1 (1.64 %)
Crisis convulsivas no clasificadas	1 (1.64 %)
Choque séptico	1 (1.64 %)
Urticaria	1 (1.64 %)
Resección de quiste óseo peroneo	1 (1.64 %)
Deshidratación grave	1 (1.64 %)

7.4. Estrategia experimental

En todas las muestras se determinó la proporción de células de linaje eritroide que expresaron los marcadores CD235a y CD71 y, por medio de una tinción nuclear con DAPI, se diferenció entre reticulocitos, que fueron DAPI negativos, y eritroides nucleados, que fueron positivos para este fluorocromo, y cuantificados por citometría de flujo. La proporción se obtuvo del total de células no granulocíticas, dadas sus características de tamaño contra granularidad (FSC y SSC respectivamente [figura 2]).

Se cultivaron muestras de sangre de cordón umbilical (n=12) y periférica de neonatos (n=24), lactantes (n=12), preescolares (n=8) y adultos (n=12), estimuladas con mitógeno y teñidas con CFSE, por 72 horas. Cumplido el tiempo de cultivo, se cosecharon y se tiñeron con DAPI

como marcador nuclear. La proporción de células proliferantes (CFSE^{bajo}) del total de células mononucleares (DAPI^{alto}) fue determinado por citometría de flujo y las medias obtenidas de los diferentes grupos fueron transformadas a la media de la proliferación de las muestras de adultos (100%). Esta proporción se correlacionó con los números obtenidos de células eritroides descritas en el párrafo anterior.

Se determinó la capacidad de proliferación de células mononucleares leucocitarias sanguíneas, neonatales (n=12) y de adultos (n=12), cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de reticulocitos sanguíneos neonatales o de adultos, teñidas con CFSE, bajo un estímulo policlonal con mitógeno, por 72 horas. Cumplido el tiempo de cultivo, se cosecharon y se tiñeron con DAPI como marcador nuclear. La proporción de células proliferantes (CFSE^{bajo}) del total de células mononucleares (DAPI^{alto}) fue determinado por citometría de flujo y las medias obtenidas de los diferentes grupos fueron transformadas a la media de la proliferación de las muestras de adultos (100%). Como control de celularidad, las células mononucleares se cocultivaron en presencia de eritrocitos autólogos, en las mismas proporciones que los reticulocitos, en similares condiciones de cultivo.

7.5. Criterios de selección

7.5.1. Criterios de inclusión

7.5.1.1. En los recién nacidos:

7.5.1.1.1. Pacientes nacidos a término, eutróficos, en el servicio de tococirugía, sin antecedentes de hipoxia, asfixia, hemorragia o sufrimiento perinatal.

7.5.1.1.2. Neonatos, ingresados y hospitalizados en el servicio de perinatología, con diagnóstico diferente a enfermedades hipoxémicas no corregidas, hemolíticas, hemorrágicas, mielo o linfoproliferativas, hemoglobinopatías, mielosupresivas, con falla medular o leucémicas.

7.5.1.1.3. Ambos sexos.

7.5.1.2. En los lactantes menores:

7.5.1.2.1. Lactantes menores (de 1 a 6 meses de edad), ingresados y hospitalizados en el servicio de perinatología o pediatría, con diagnóstico diferente a

enfermedades hipoxémicas no corregidas, hemolíticas, hemorrágicas, mielo o linfoproliferativas, hemoglobino patías, mielosupresivas, con falla medular o leucémicas.

7.5.1.2.2. Ambos sexos.

7.5.1.3. En los adultos:

7.5.1.3.1. Adultos, por lo demás sanos y sin comorbilidades asociadas patentes o aparentes; estudiantes, usuarios, visitantes o trabajadores del CINVESTAV-IPN (población subordinada).

7.5.1.3.2. De 20 años en adelante.

7.5.1.3.3. Ambos sexos.

7.5.2. Criterios de exclusión

7.5.2.1. En los recién nacidos:

7.5.2.2. Pacientes prematuros, pequeños constitucionales o de bajo peso para la edad gestacional y gestación postérmino.

7.5.2.3. Antecedentes directos de hipoxia, asfixia, hemorragia o sufrimiento perinatal, presencia de dismorfias, anemia fetal, neumopatías o cardiopatías.

7.5.2.4. Antecedentes maternos obstétricos de anemia, preeclampsia/eclampsia, ruptura prematura de membranas mayor a 12 horas, hemorragia uterina de la segunda mitad del embarazo, presentaciones anormales (podálica, pélvica), contracciones uterinas no fisiológicas y sospecha o evidencia de infección materna durante el embarazo.

7.5.2.4.1. Historia clínica incompleta.

7.5.2.5. En los lactantes menores:

7.5.2.5.1. Lactantes mayores (> de 6 meses) o neonatos (< 1 mes).

7.5.2.5.2. Lactantes menores (de 1 a 6 meses de edad) hospitalizados en los servicios de perinatología con diagnóstico de enfermedades hipoxémicas, hemolíticas, hemorrágicas, mielo o linfoproliferativas, hemoglobino patías, mielosupresivas, con falla medular o leucémicas.

7.5.2.5.3. Historia clínica incompleta.

7.5.2.6. En los adultos:

7.5.2.6.1. Adultos ajenos al CINVESTAV-IPN.

7.5.2.6.2. Enfermos o que presenten cualquier comorbilidad patente o aparente.

7.5.2.6.3. Menores de 20 años.

7.6. Estrategias de muestreo

7.6.1. Diseño y tipo de muestreo

Determinístico.

7.7. Colecta de muestras

Se consiguieron, por neonato, entre 15 y 50 mL de sangre de cordón umbilical, por exanguinación de la placenta, previo al alumbramiento, en condiciones asépticas (quirófano) y se colectaron en tubos cónicos de 50 mL, con heparina sódica (10-30 UI/mL de muestra) como anticoagulante. Las muestras se mantuvieron a 4 °C y fueron procesadas dentro de las siguientes 24 horas de su arribo al laboratorio.

Se adquirieron, por niño hospitalizado, entre 300 y 1,000 µL de sangre periférica, de muestras que se desechan posterior a los análisis clínicos (citometría hemática), obtenidas por punción venosa periférica o a través de un catéter largo o venoso central, recolectadas durante la estancia intrahospitalaria, en tubos para almacenamiento de sangre capilar de 1 mL con K₂EDTA como anticoagulante (BD Microtainer®, Estados Unidos), con menos de 72 horas de obtención. Las muestras se mantuvieron a 4 °C y fueron procesadas dentro de las siguientes 24 horas de su arribo al laboratorio.

Se tomaron, por adulto, entre 15 y 30 mL de sangre periférica, por punción de las venas de la fosa cubital del antebrazo (basílica, cefálica o mediana), en condiciones asépticas, y se recolectaron en tubos de ensaye de 10 mL con heparina sódica (10-30 UI/mL de muestra) como anticoagulante. Las muestras se mantuvieron a 4 °C y fueron procesadas dentro de las siguientes 24 horas de su colección. En el periodo comprendido entre el sitio de recolección hospitalario y el sitio de procesamiento, las muestras se conservaron en hielo (4-8 °C), dentro de contenedores térmicos portátiles de poliestireno expandido.

7.8. Técnicas y procedimientos

7.8.1. Recuento de reticulocitos y células eritroides precursoras nucleadas

El recuento de reticulocitos y células eritroides nucleadas se realizó en todas las muestras obtenidas (Figura 1). El presente protocolo se elaboró con base en lo ya publicado^{29,44}. Entre 300 y 1,000 μL de sangre por muestra fueron centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4 °C en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) con heparina sódica (10-30 UI/mL) para retirar el plasma y las plaquetas. El hematocrito se resuspendió en un volumen final de 2.5 mL con HBSS y colocadas sobre 3 mL de Percoll® (GE Healthcare®, Suecia) al 70%. Las muestras se centrifugaron a 400 x g por 30 minutos, en rotor basculante sin freno, a temperatura ambiente (TA; 20-25° C). La o las interfases formadas sobre el Percoll® fueron retiradas por aspiración, lavadas y resuspendidas en 1 mL de RPMI-1640 estéril y mantenidas a 4 °C hasta su tinción. Consecutivamente, se obtuvo el número y la viabilidad de las células, por exclusión de azul de tripano, con el contador de células automatizado Countess® InVitrogen® (Thermo Fisher®, Estados Unidos).

Se tomaron 2.5×10^6 células por muestra y fueron resuspendidas en 50 μL de PBS 1X/albúmina sérica humana (HSA) al 0.1%, se agregaron 0.6 μL de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD235a humano GA-R2 (HIR-2 RUO, 0.2 mg/mL), acoplados a ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen®, Estados Unidos); 3.5 μL de anticuerpos monoclonales murinos anti-CD71 humano M-A712 (RUO), acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen®, Estados Unidos) y 6 μL de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD45 HI30 (RUO), acoplados a aloficocianina (APC) (BD Pharmingen®, Estados Unidos) y se incubaron por 20 minutos en hielo (4-8 °C). Posteriormente se adicionó 1 mL de PBS 1X/HSA 0.1% para lavar los anticuerpos no adheridos y se centrifugó a 400 x g por 10 minutos a 4 °C. Cuidadosamente, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1 mL de formaldehído (Merck®, Estados Unidos) al 3.7% v/v en PBS 1X y se fijaron por mínimo 30 minutos a 4 °C.

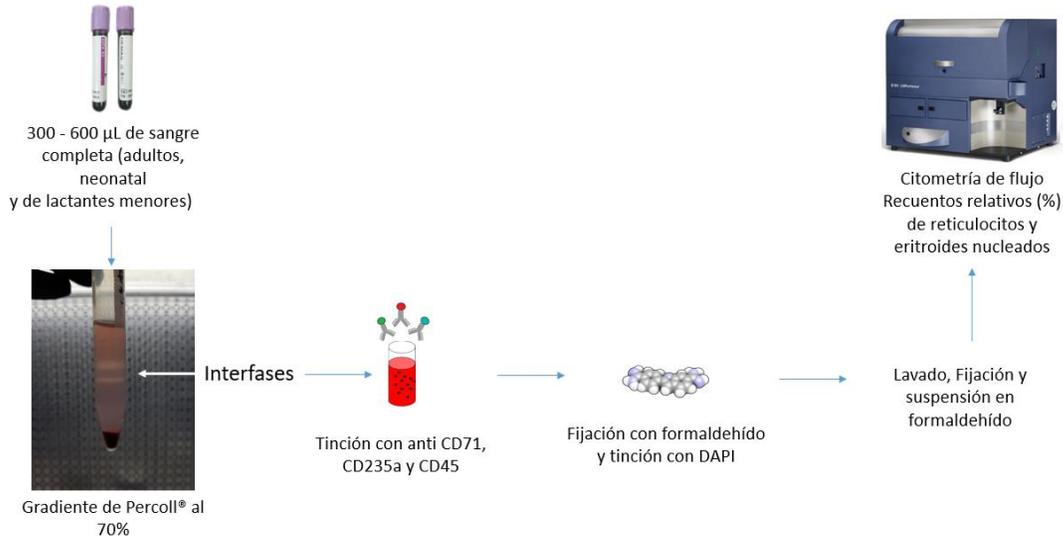


Figura 1. Diagrama de flujo para el recuento de reticulocitos y precursores eritroides nucleados.

Posteriormente, las células se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en 100 µL de PBS 1X /HSA 0.1% con DAPI (Merck®, Estados Unidos) a 3 µM y se incubaron por 15 minutos a 4° C. Las células fueron lavadas con 1 mL de PBS 1X/HSA 0.1% y posteriormente resuspendidas en 350 µL de formaldehído (Merck®, Estados Unidos) al 3.7% v/v en PBS 1X. Las muestras fueron transferidas a tubos para FACS de polipropileno y se procedió a su análisis por citometría de flujo. Como controles, se obtuvieron tubos con cada una de las condiciones individuales (autofluorescencia, solo anti-CD71, solo anti-CD235a, solo anti-CD45 y solo tinción con DAPI).

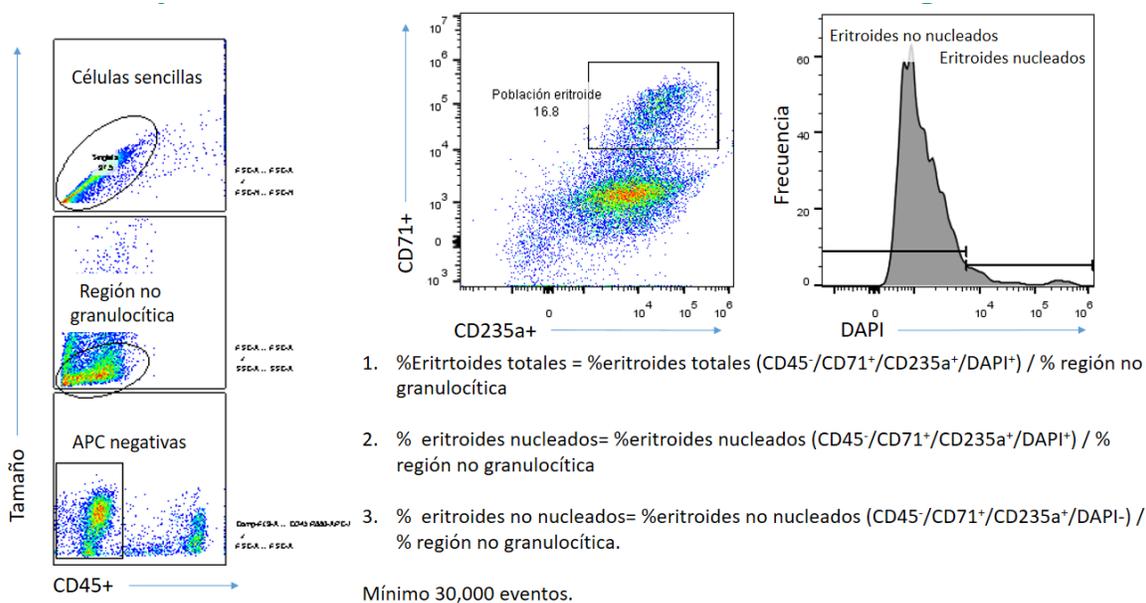


Figura 2. Estrategia de análisis por citometría de flujo para el recuento de reticulocitos y de precursores eritroides nucleados.

Las muestras fueron capturadas en el citómetro de flujo (BD LSRFortessa®, BD Biosciences®, Estados Unidos o CytoFLEX®, Beckman-Coulter®, Estados Unidos), dentro de las siguientes 72 horas de su tinción. Se utilizaron para el análisis el *software* FlowJo® V10 o Kaluza®. Posterior a los ajustes de voltaje, compensación y de selección de células sencillas, en un *dot plot* de granularidad (*side scatter*, SSC) contra tamaño (*forward scatter*, FSC), se seleccionó la región cuyas células son característicamente no granulocíticas⁹⁸. De esta región, se hizo una selección de las células CD45⁻ (APC) y a estas se les realizó un segundo *dot plot* de CD71 (FITC) contra CD235a (PE), de donde se seleccionaron las células doble positivas (CD235a⁺/CD71⁺). Por histograma, se identificaron las células DAPI positivas (eritroides nucleados) de las negativas (reticulocitos). La proporción de estas células (totales, nucleadas y reticulocitos) con respecto a las células no granulocíticas fue obtenida en todas las muestras incluidas. Se capturaron un mínimo de 30,000 eventos por muestra. La figura 2 muestra la estrategia citométrica descrita.

7.8.2. Aislamiento de células mononucleares leucocitarias sanguíneas

Para aislar células mononucleares, el total de las muestras de sangre de cordón umbilical y periférica de adultos se dividieron en volúmenes de 10 mL y se colocaron en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugaron por 400 x g por 15 minutos a 4 °C y se retiró, por aspiración, el plasma con las plaquetas del sobrenadante. Se separó la capa flogística de cada muestra y se resuspendió al 40 % del hematocrito con HBSS estéril con heparina sódica (10-30 UI/mL de muestra). El resto del hematocrito se utilizó para la obtención del enriquecido de reticulocitos (7.8.3). Se tomaron 8 mL de la suspensión celular que fueron colocados sobre 6 mL de Ficoll-Hypaque® (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) (densidad 1.077 g/mm³, proporción 4:3)⁹⁹. Se centrifugó a 400 x g por 30 minutos a TA, con rotor basculante sin freno. Se recuperó, por aspiración, la capa de células mononucleares localizadas sobre la capa de Ficoll®, se resuspendieron en HBSS a 3 veces el volumen recuperado y se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 4 °C, para eliminar el Ficoll® remanente. Para descartar células eritroides y eritrocitos contaminantes, se trataron las células con 1 mL de amortiguador de cloruro de amonio estéril a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, para recuperar la osmolaridad, se adicionaron 9 mL de HBSS frío y se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 4 °C. Consecutivamente, se obtuvo el número y la viabilidad de las células, por exclusión de azul de tripano, con el contador de células automatizado Countess® InVitrogen® (Thermo Fisher®, Estados Unidos). Las células se resuspendieron en 2 mL de RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y se mantuvieron a 4 °C hasta un máximo de 24 horas para su cultivo.

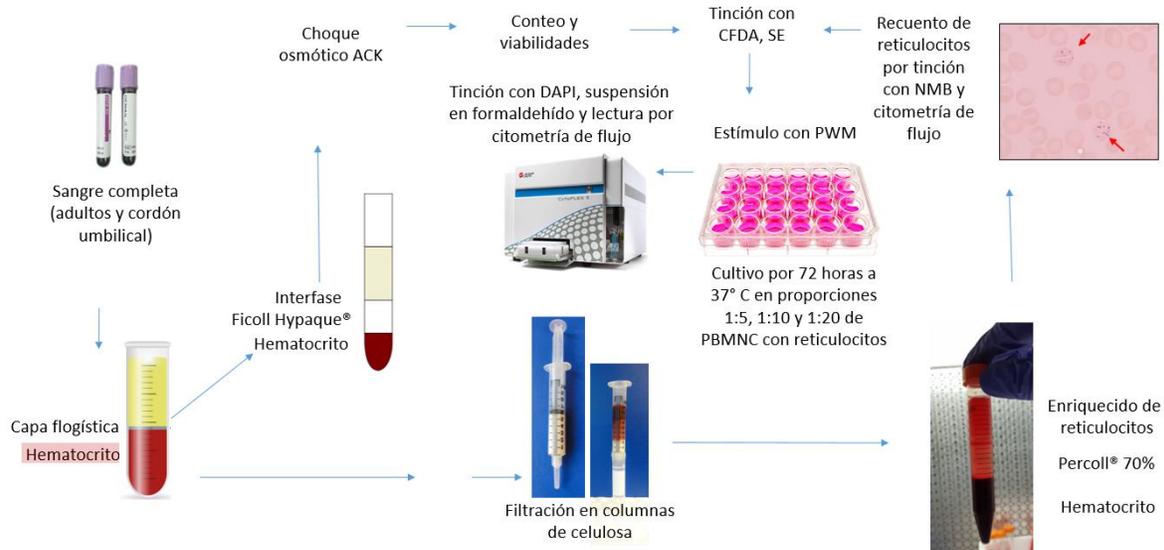


Figura 3. Diagrama de flujo de los procedimientos para el aislamiento y cocultivo de reticulocitos y células mononucleares.

7.8.3. Aislamiento de reticulocitos

Para obtener los reticulocitos, del hematocrito obtenido en el apartado anterior (sección 7.8.2, figura 3) se suspendieron las células al 40 % del volumen final con HBSS estéril con heparina sódica (10-30 UI/mL de muestra). Para eliminar los leucocitos y plaquetas residuales, el hematocrito se filtró a través de columnas de celulosa¹⁰⁰. Para esto, las columnas fueron hidratadas con 6 mL de HBSS y cargadas con 5 mL de la muestra diluida. Para recuperar el mayor número de células, las columnas fueron lavadas con 6 mL de HBSS. Las células filtradas se resuspendieron en HBSS a 3 veces el volumen recuperado y se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 4 °C, para eliminar la celulosa remanente. Las células se suspendieron al 40 % del hematocrito con HBSS estéril y 5 mL fueron cuidadosamente colocados sobre 6 mL de Percoll® al 70%, en tubos cónicos de 15 mL. Posteriormente, se centrifugaron a 400 x g por 30 minutos a TA, con rotor basculante sin freno. La o las interfases formadas sobre el Percoll® fueron retiradas por aspiración, lavadas y resuspendidas en 1 mL de RPMI-1640 estéril y mantenidas a 4 °C hasta su tinción. Conjuntamente, se aspiró alrededor de 5 µL del hematocrito ubicado en la base del tubo, para obtener el enriquecido de eritrocitos, utilizado como control de celularidad. Consecutivamente, se obtuvo el número y la viabilidad de las células, por exclusión de azul

de tripano, con el contador de células automatizado Countess® InVitrogen® (Thermo Fisher®, Estados Unidos).

Adicionalmente, se verificó la morfología y el diferencial por microscopía óptica. Tomando alrededor de 150,000 células, se suspendieron en 50 µL de PBS 1X/HSA 0.1%, posteriormente se les adicionó 30 µL de nuevo azul de metileno (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) y se incubaron a TA por 15 minutos. A continuación, se concentraron por citocentrifugación (Thermo Shandon Cytospin 3®, Marshall Scientific®, Estados Unidos) a 700 x g por 5 minutos, montadas sobre laminillas, y dejadas secar a temperatura ambiente antes de visualizarlas. La proporción de reticulocitos se obtuvo dividiendo el número total de reticulocitos (que muestren reticulina en su citoplasma) entre el total de células obtenidas (eritrocitos). Los enriquecidos de reticulocitos sanguíneos fueron conservados en medio RPMI-1640 suplementando con 10% de FBS y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta un máximo de 72 horas para su cultivo.

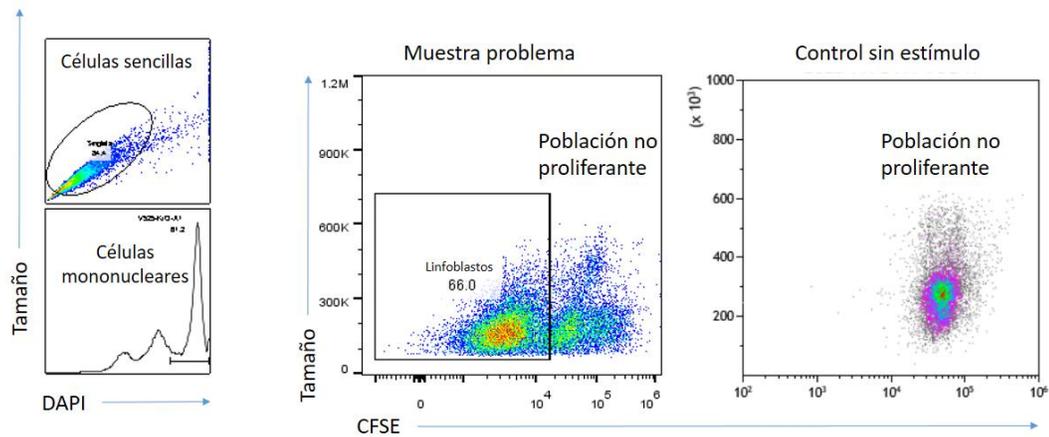
7.8.4. Tinción de células mononucleares con diacetato de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFDA, SE)

La capacidad de proliferación de las PBMC y UCMC se determinó por el método de CFSE, modificado a partir de Quah y Parish¹⁰¹. Bajo condiciones de esterilidad, de las células leucocitarias, obtenidas como fue descrito en la sección 7.8.2, se suspendieron en RPMI-1640 con HSA al 1% v/v, a un máximo 1 x 10⁷ células en 950 µL. Conjuntamente, en oscuridad, se adicionaron 50 µl de CFDA, SE a 100 µM en RPMI-1640 con HSA al 1% v/v (concentración final 5 µM). Se mezclaron suavemente, se protegieron de la luz con papel aluminio y se incubaron entre 3 y 5 minutos a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo, se adicionaron 9 mL de RPMI-1640 con 1% de HSA v/v y se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 4 °C, para eliminar el exceso de colorante de la suspensión. Posteriormente, las células se resuspendieron en 2 mL de RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y se mantuvieron a 4 °C hasta un máximo de 24 horas para su cultivo.

7.8.5. Ensayos de proliferación de células mononucleares leucocitarias en presencia de reticulocitos sanguíneos neonatales o de adultos

Una vez obtenidas las células mononucleares teñidas con CFSE, se sembraron 5×10^5 células por pozo en 100 μ L de RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%. (figura 3), en placas de 24 pozos de fondo plano estériles. Un control de células sin teñir se mantuvo para ajustar la fluorescencia. Como estimulante de la proliferación policlonal de linfocitos B y T^{95,96,98,102}, se adicionaron 100 μ l de una solución de PWM (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), a una concentración de 100 μ g/mL en RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS (concentración final 10 μ g/mL). Por cada muestra, se agregó un pozo control de células teñidas sin estímulo policlonal, donde solo se agregaron 100 μ L de RPMI-1640 suplementado. También se mantuvieron monocultivos estimulados para determinar la proliferación basal. En los cocultivos, para cada condición de PWM, se añadieron 2.5×10^6 , 5×10^6 y 10×10^6 células del enriquecido de reticulocitos (sección 7.8.3), para obtener las proporciones 1:5 (adulto), 1:10 (neonatal) y 1:20 (fetal y prematuro), respectivamente. Como controles de celularidad, estas condiciones se repitieron, pero con el enriquecido de eritrocitos. Subsiguientemente, las placas fueron incubados a 37 °C, en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %, por 72 a 80 horas, dado el tiempo de diferenciación de los reticulocitos *in vitro*^{85,90}. Se cocultivaron MNC autólogas de adultos y de cordón umbilical y se incluyó un cultivo heterólogo con PBMC adultas en presencia de eritroides de cordón umbilical. Cumplido el tiempo de cultivo, las células se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en 1 mL de formaldehído (Merck®, Estados Unidos) al 3.7% v/v en PBS 1X y se fijaron por mínimo 30 minutos a 4 °C.

Posteriormente, las células se reconcentraron y se resuspendieron en 100 μ L de PBS 1X /HSA 0.1% con DAPI (Merck®, Estados Unidos) a 3 μ M y se incubaron por 15 minutos a 4 °C. Las células fueron lavadas con 1 mL de PBS 1X/HSA 0.1% y posteriormente resuspendidas en 350 μ L de formaldehído (Merck®, Estados Unidos) al 3.7% v/v en PBS 1X. Las muestras fueron transferidas a tubos de polipropileno para FACS y se procedió a su análisis por citometría de flujo.



1. La media del % de proliferación del grupo de adultos se transformó al 100% y se compararon las medias de todos los grupos contra este primero.

Se obtuvieron un mínimo de 50,000 eventos.

Figura 4. Estrategia de análisis por citometría de flujo para evaluar la proliferación de MNC teñidas con CFSE.

Las muestras fueron capturadas en el citómetro de flujo (BD LSRFortessa®, BD Biosciences®, Estados Unidos o CytoFLEX®, Beckman-Coulter®, Estados Unidos), dentro de las siguientes 72 horas de su tinción. Se utilizaron para el análisis el *software* FlowJo® V10 o Kaluza®. Posterior a los ajustes de voltaje y de selección de células sencillas, se realizó un histograma con DAPI como marcador para identificar la población mononuclear; la cual, es la que expresa una mayor intensidad media de fluorescencia¹⁰³. De esta población, se hizo un *gate* de *forward scatter* altura (FSC-H) contra CFSE (FITC-A). En las muestras no estimuladas, se identificó la población no proliferante y en las muestras problema se identificaron aquellas células cuya intensidad media de fluorescencia era menor a esa primera. Se creó una ventana y se obtuvo la proporción de células proliferantes (CFSE^{bajo}) del total de células mononucleares (DAPI^{alto}). La media de la proliferación de las MNC monocultivadas se transformó al 100% y el resto de las condiciones experimentales se normalizó a este valor. Se capturaron un mínimo de 50,000 eventos por muestra. Un esquema general de esta estrategia se resume en la figura 4.

7.8.6. Ensayos de proliferación de células leucocitarias en sangre completa

De todas las muestras de cordón umbilical y determinadas muestras de sangre periférica (sección 7.4), se tomaron 100 μ L de sangre completa y se suspendieron en 900 μ L de medio RPMI-1640 estéril (proporción 1:10). Las muestras fueron teñidas con CFDA, SE, como se describe en la sección 7.8.4. En tubos para FACS de 12 x 75 mm, se resuspendieron las células en 900 μ L y se adicionaron 100 μ L de una solución de PWM a 100 μ g/mL, en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10 % (concentración final 10 μ g/mL). A los controles sin estímulo, solo se adicionaron 100 μ L de RPMI-1640. Las muestras fueron incubadas a 37 °C, en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %, por 72 a 80 horas, dado el tiempo de diferenciación de los reticulocitos *in vitro*^{85,90}. Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras fueron lavadas con HBSS por centrifugación a 400 x g por 15 minutos a 4 °C; se descartó el sobrenadante y se les adicionó 1 mL de solución de lisis para eritrocitos de cloruro de amonio a 37 °C y se incubaron por 5 minutos. Transcurrido el tiempo, para recuperar la osmolaridad, se adicionaron 9 mL de HBSS frío y se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 mL de formaldehído al 3.7% v/v en PBS 1X y se fijaron por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se reconcentraron y se resuspendieron en 100 μ L de PBS 1X /HSA 0.1% con DAPI (Merck®, Estados Unidos) a 3 μ M y se incubaron por 15 minutos a 4 °C. Las células fueron lavadas con 1 mL de PBS 1X/HSA 0.1% y posteriormente resuspendidas en 350 μ L de formaldehído al 3.7% v/v en PBS 1X. Las muestras fueron transferidas a tubos de polipropileno para FACS y se procedió a su análisis por citometría de flujo. Para el análisis de proliferación, se utilizó la misma estrategia que en la sección 7.8.5. (figura 4). La figura 5 muestra la estrategia global de esta técnica.

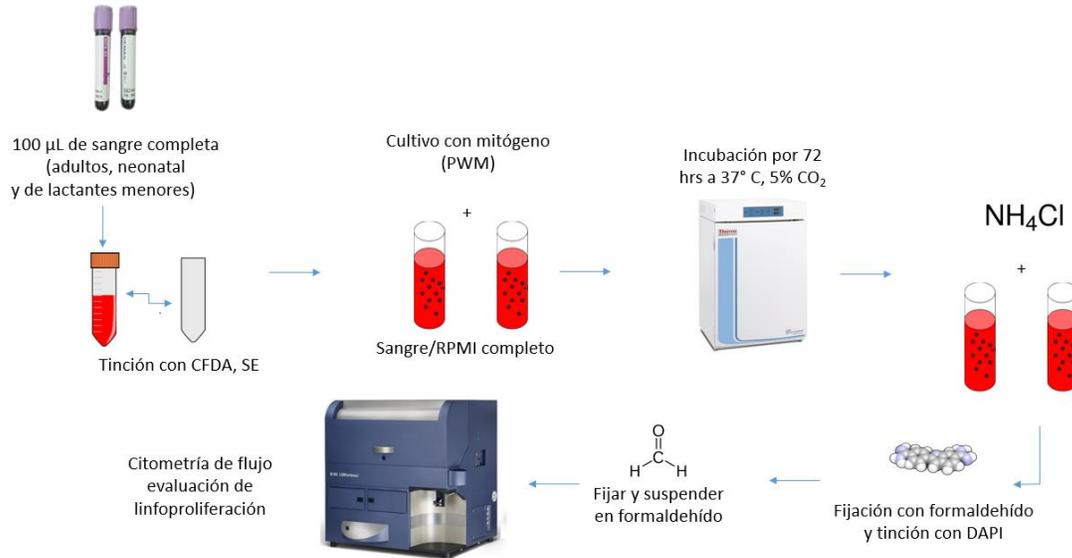


Figura 5. Diagrama de flujo de los ensayos de linfoproliferación en sangre completa.

7.9. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando el *software* GraphPad Prism®, versión 6, para Windows®. Para las comparaciones de las variables de las poblaciones eritroides totales y la linfoproliferación en sangre completa, entre los diferentes grupos, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis, dada la falta de normalidad en la distribución de resultados. Las comparaciones entre reticulocitos y precursores eritroides nucleados, así como entre los monocultivos y las distintas condiciones de cocultivos con los enriquecidos de eritroides, se hicieron entre ambos grupos utilizando pruebas de Mann Whitney no pareadas, asumiendo la falta de normalidad de las poblaciones, debido a la variabilidad biológica. La correlación entre la capacidad de linfoproliferación en sangre completa y sus niveles de reticulocitos se efectuó con una prueba de Spearman, utilizando el *software* SPSS® versión 15. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores *p* menores a 0.05. Se utilizó estadística descriptiva para los datos generales de la población en estudio. Para las variables cuantitativas, se empleó la media como la medida de tendencia central y desviación estándar como medida de dispersión y rangos.

8. Logística

8.1. Recursos humanos

- 8.1.1. Estudiante de posgrado: Méd. Vladimir Herman Miguel.
- 8.1.2. Tutor académico: Dr. Marco Antonio Vega López. DIPM. CINVESTAV-IPN.
- 8.1.3. Tutor institucional: Dr. Felipe Ortiz Contreras. HGR 1. IMSS.
- 8.1.4. Auxiliar de Investigación: Biol. María del Carmen Ramírez Estudillo.
- 8.1.5. Técnico: Luis Alberto Hernández González.
- 8.1.6. Asesores expertos: Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi y Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas. DIPM. CINVESTAV-IPN.
- 8.1.7. Estudiantes de maestría y doctorado del laboratorio 5 de Inmunobiología de Mucosas. DIPM. CINVESTAV-IPN.

8.2. Recursos materiales

- 8.2.1. Infraestructura de investigación del laboratorio 5 de inmunobiología de mucosas. DIPM. CINVESTAV-IPN (gabinetes de bioseguridad, centrifugas, incubadoras, microscopios, refrigeradores, instrumentos de medición, contención, etc.).
- 8.2.2. Infraestructura de investigación en general del CINVESTAV – IPN (citómetros de flujo, refrigeradores, esterilizadores, depósitos de nitrógeno líquido, etc.).
- 8.2.3. Reactivos químicos (agua destilada y des ionizada, medios de cultivo, colorantes, soluciones amortiguadoras, polímeros para gradientes de densidad, etc.).
- 8.2.4. Reactivos biológicos (anticuerpos anti-CD71, anti-CD45 y anti-CD235a, etc.).
- 8.2.5. Material para la recolección de las muestras (jeringas, agujas, tubos con EDTA, termos, etc.).
- 8.2.6. Infraestructura de oficina (mesas, sillas, computadoras, impresoras, libretas, etc.).
- 8.2.7. Recursos bibliográficos (digitales e impresos).

8.3. Recursos financieros

- 8.3.1. Presupuesto fijo para investigación del CINVESTAV-IPN.
- 8.3.2. Recursos obtenidos por proyecto del CONACYT.
- 8.3.3. Recursos propios de los investigadores.

9. Consideraciones éticas y de bioseguridad

El presente estudio se ajustó a los lineamientos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud (LGSMIS) de México, promulgada en 1986 y modificada en 2014, de investigación con riesgo mínimo (con base al artículo 17, párrafo II) en grupos subordinados (capítulos III y V, respectivamente), así como al código de Helsinki de 1975, modificado en 1989, respecto a la confidencialidad de los participantes en el estudio. El presente estudio pretende mejorar el conocimiento de la inmunidad perinatal con perspectiva en la generación de nuevas estrategias diagnósticas a partir de muestras de desecho que no representaron riesgos adicionales para los individuos participantes. Debido a la investigación supone un riesgo mínimo a los individuos, se obtuvo el consentimiento informado en la población vulnerable y subordinada (capítulo I, artículo 23 de la LGSMIS) (anexo 11.2), para el caso de las muestras de población menor de edad, estas no suponen riesgo por motivo de la investigación, por lo que no se requirió consentimiento informado. A cada individuo se le asignará un código de identificación que fue la única referencia para localizar al sujeto. La base de datos que concentró los datos personales del paciente, así como su información de contacto, existió en una única copia resguardada por el investigador principal. De la misma forma, ningún producto de la investigación expuso la identidad de los individuos partícipes.

En cuanto a bioseguridad, se sugirieron las normas universales de bioseguridad en la utilización de muestras humanas, potencialmente infecto-contagiosas (riesgo de bioseguridad nivel 2), y se almacenaron, recolectaron, transportaron, trataron y se les dio disposición final a los residuos peligrosos biológico-infecciosos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana – 087 – ECOL – SSA1 – 2002.

10. Resultados

10.1. Los reticulocitos son las células eritroides CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ más abundantes en sangre periférica y cordón umbilical

Por citometría de flujo, se determinaron las proporciones de células eritroides CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ de muestras de sangre de cordón umbilical y periférica de neonatos, lactantes, preescolares y adultos, de acuerdo con la metodología de la sección 7.8.1 (figura 1), con respecto al total de células morfológicamente no granulocíticas (figura 2), dado la proporción tan limitada que representan las células eritroides en sangre periférica^{58,77}. Se encontró una marcada tendencia hacia la disminución de la proporción de las células eritroides CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ totales conforme aumenta la edad de los individuos, pasando de una proporción máxima en las muestras de cordón umbilical (13.99 % [DE±13.02169]), a ser prácticamente indetectables a partir del grupo de lactantes mayores (0.15 % [DE±0.1415]); con la media más baja en el grupo de adultos (0.02 % [DE±0.0174]) ($p < 0.0001$). Este efecto fue más notorio entre las células nucleadas (DAPI⁺), con respecto a los reticulocitos (figura 6b).

Al hacer una diferencia fenotípica entre ambos grupos, con base en la presencia de núcleo, por medio de una tinción nuclear con DAPI, fluorocromo que tiñe exclusivamente ADN¹⁰³. Se encontró que estas células son principalmente reticulocitos (DAPI⁻), en todos los grupos analizados, con una mayor significancia en el grupo neonatal temprano, siendo su proporción 5 veces mayor con respecto a las células eritroides nucleadas (DAPI⁺) ($p < 0.0001$) (figura 6b). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en lactantes y preescolares, posiblemente debido al escaso número de eventos dobles positivos (figura 6a).

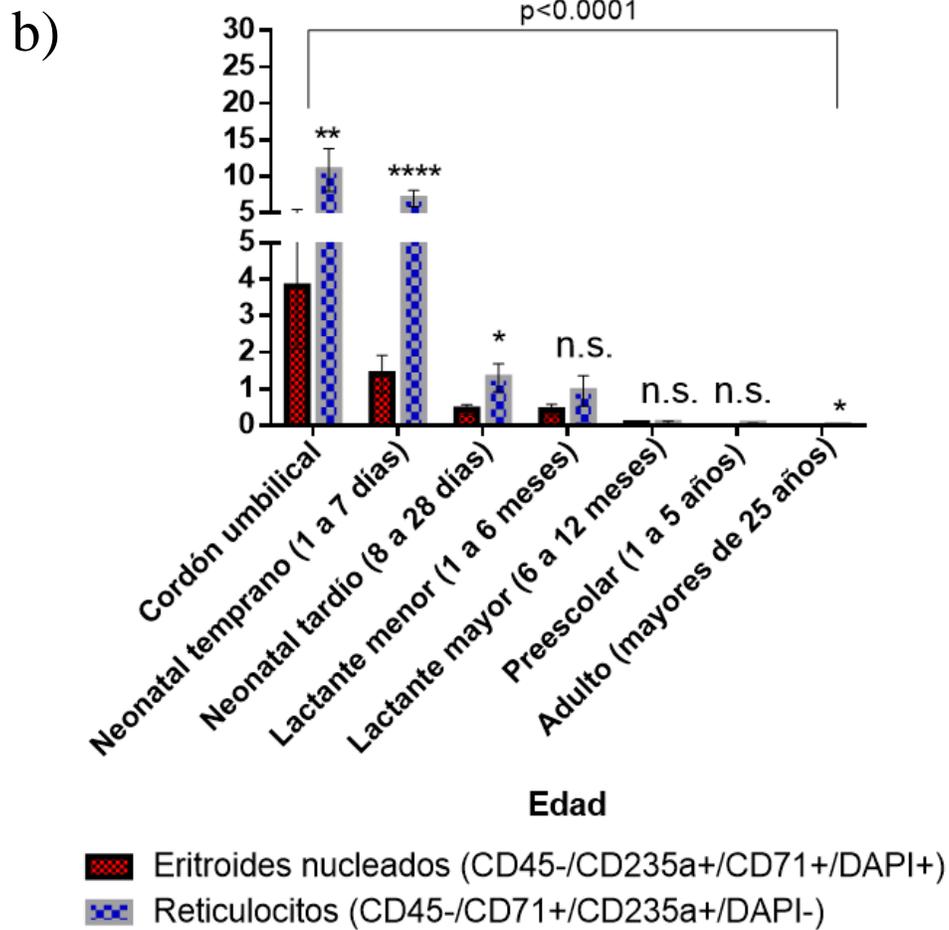
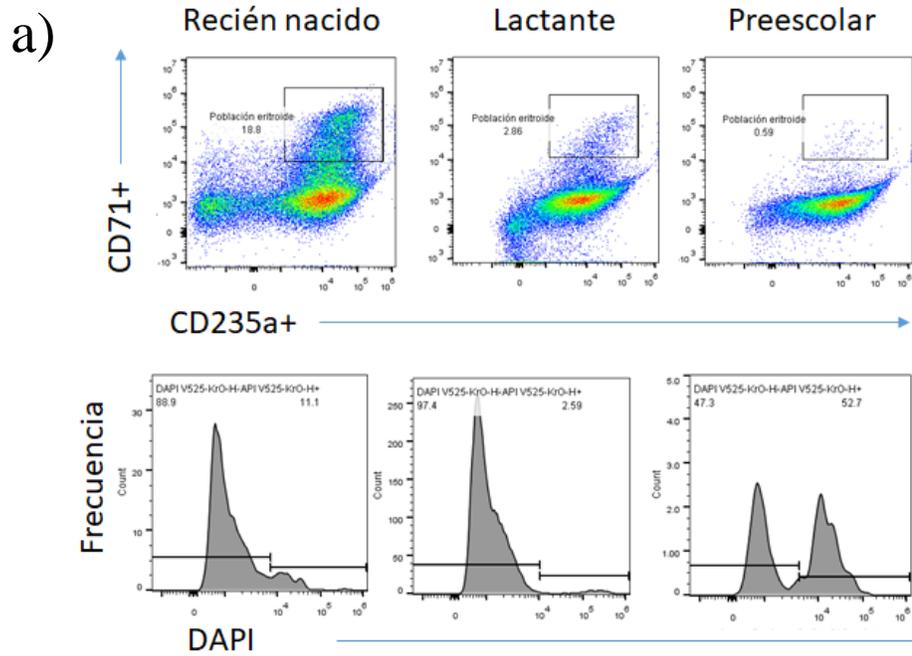


Figura 6. Las células eritroides CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ sanguíneas son principalmente reticulocitos.

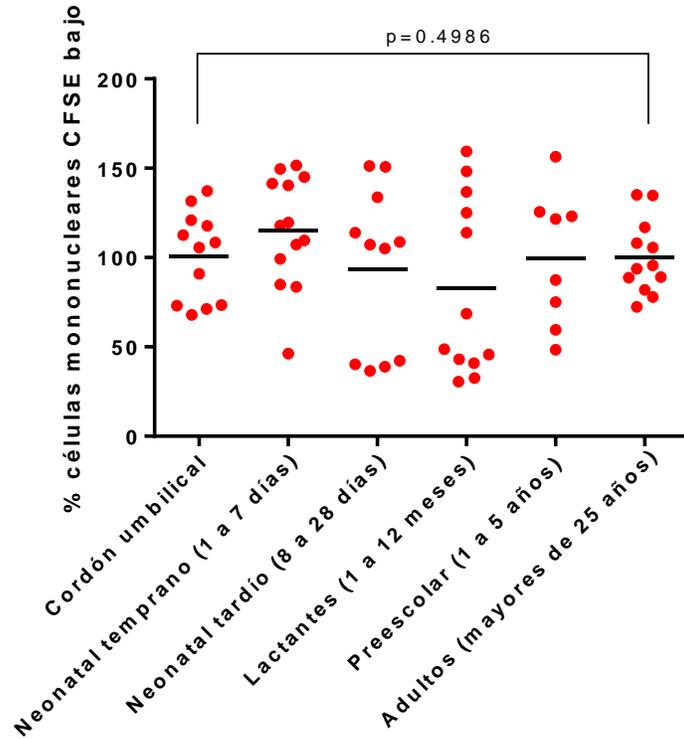
En a), *dot plots* representativos que muestran la disminución progresiva de la población eritroide CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ (en recuadro) con la edad de los grupos mostrados. Los histogramas muestran que la mayoría de esas células no poseen núcleo (DAPI⁻) (columnas en rojo). En b), proporciones de células eritroides CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺, nucleadas (DAPI⁺) (en azul) y no nucleadas (DAPI⁻) (en rojo), con respecto a las células no granulocíticas totales, de muestras de sangre de cordón umbilical y periférica de diferentes edades. $p < 0.0001$, prueba de Kruskal-Wallis entre los distintos grupos. Prueba de U de Mann Whitney entre células eritroides nucleadas y reticulocitos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, n. s. sin significancia estadística.

10.2. La linfoproliferación en sangre completa no se correlaciona con el nivel de reticulocitos CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺

Se evaluó la capacidad de linfoproliferación *ex vivo* en sangre completa, estimulados con PWM, en muestras de cordón umbilical y periférica de los diferentes grupos formados, conforme a la estrategia mostrada en la figura 5 (sección 7.8.6). La media de las proporciones de células proliferantes (CFSE^{bajo}), con respecto al total de células mononucleares (DAPI^{alto}) (figura 4), del grupo de adultos se normalizó al 100 %. No se encontró diferencias en la capacidad de linfoproliferación entre los distintos grupos formados ($p=0.4986$) (figura 7a).

Al relacionar la capacidad de linfoproliferación de cada muestra con la proporción de reticulocitos CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ que contienen, se obtuvo un coeficiente de correlación de Spearman de -0.062, por lo que no existió correlación entre la linfoproliferación y la presencia de estas células, al ser estimuladas con PWM ($p=0.6170$) (figura 7b).

a)



b)

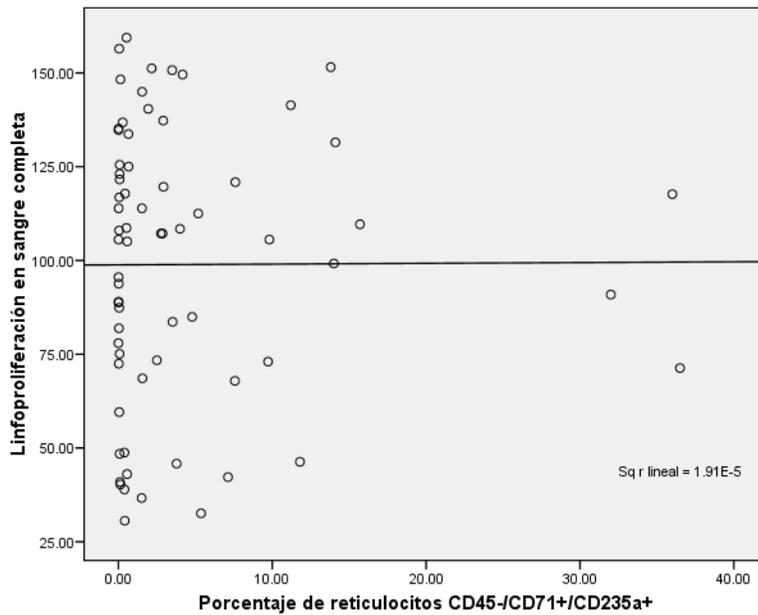


Figura 7. La linfoproliferación en sangre completa, estimulada con mitógeno, no se correlaciona con la proporción de reticulocitos CD45-/CD71+/CD235a+.

En a), se observa la proporción de células proliferantes (CFSE^{bajo}) entre las células mononucleares (DAPI^{alto}) de cada grupo de edad. No se encuentra diferencia significativa (prueba de Kruskal-Wallis). En b), se relaciona la capacidad de linfoproliferación con la proporción de reticulocitos CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ sanguíneos de cada muestra. R de Spearman -0.062 ($p=0.6170$).

10.3. El enriquecido de reticulocitos de cordón umbilical disminuye la capacidad de proliferación de MNC autólogos estimulados con mitógeno, y es dependiente de su concentración

Para evaluar si los reticulocitos sanguíneos neonatales ejercen alguna actividad inmunosupresora, se cocultivó un enriquecido de estas células, provenientes de sangre de cordón umbilical, con MNC autólogos, y se evaluó su capacidad de proliferación ante un estímulo policlonal con mitógeno, como se describió en la sección 7.8.5 (figura 4). El enriquecido se obtuvo como fue descrito en la sección 7.8.3 (figura 3). Las muestras fueron filtradas a través de columnas de celulosa para eliminar leucocitos, plaquetas y eritroides nucleados¹⁰⁴, consiguiéndose un 99.82 % (DE±0.1519) de separación de estas células. Menos del 1% fueron eritroides nucleados (99.02 % eritroides no nucleados [DE±1.0401]). Morfológicamente se identificó una proporción del 24.29 % (DE± 13.4309) de reticulocitos; sin embargo, sólo el 15.96 % eran CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ (3.88 % [DE±2.7753] del total) (figura 8).

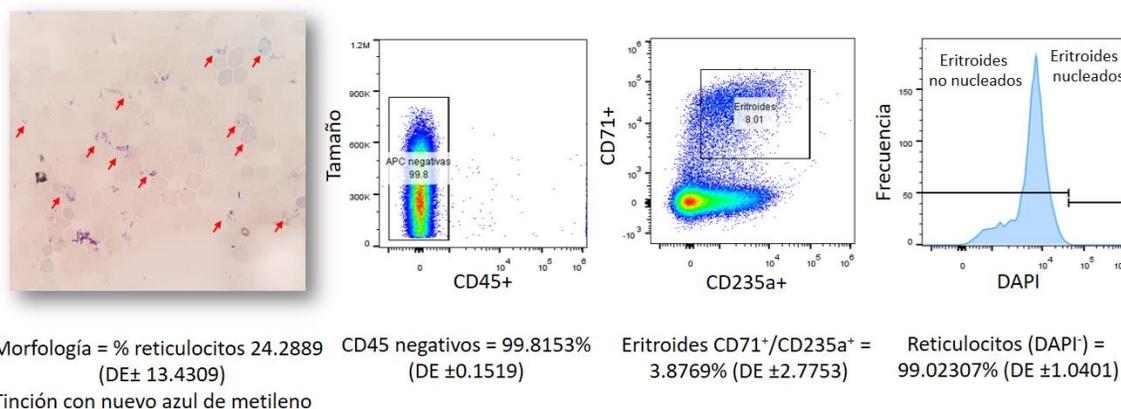
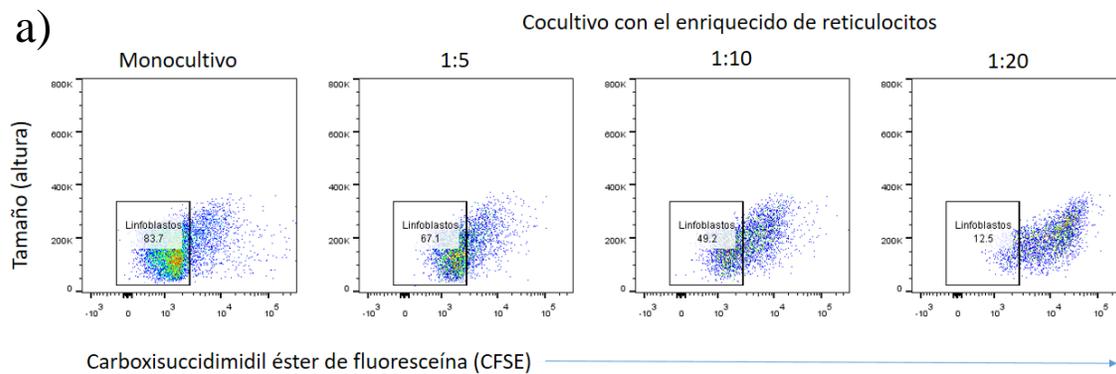


Figura 8. Características del enriquecido de reticulocitos de cordón umbilical.

De derecha a izquierda, se muestra una imagen representativa con tinción de nuevo azul de metileno. Un *dot plot* de CD45⁺(APC) del total de células. *Dot plot* de CD71 (FITC) contra CD235a (PE). Histograma de la tinción con DAPI. Se muestran las proporciones obtenidas en cada condición. DE: Desviación estándar.

El porcentaje de proliferación disminuyó, con respecto al monocultivo (transformado al 100%), al 70.85 % (DE±24.3424) en la condición 1:5; al 61.42 % ([DE± 21.1199], $p<0.05$) en la condición 1:10 y al 51.61 % ([DE±14.4699], $p<0.01$) en la condición 1:20 (figura 9a). Aunque los controles de celularidad con eritrocitos mostraron esta disminución en las proporciones 1:5 y 1:10 ($p<0.05$), la condición 1:20 no mostró significancia estadística ($p=0.4010$). No se encontraron diferencias entre ambos grupos (prueba de U de Mann Withney) (figura 9b).



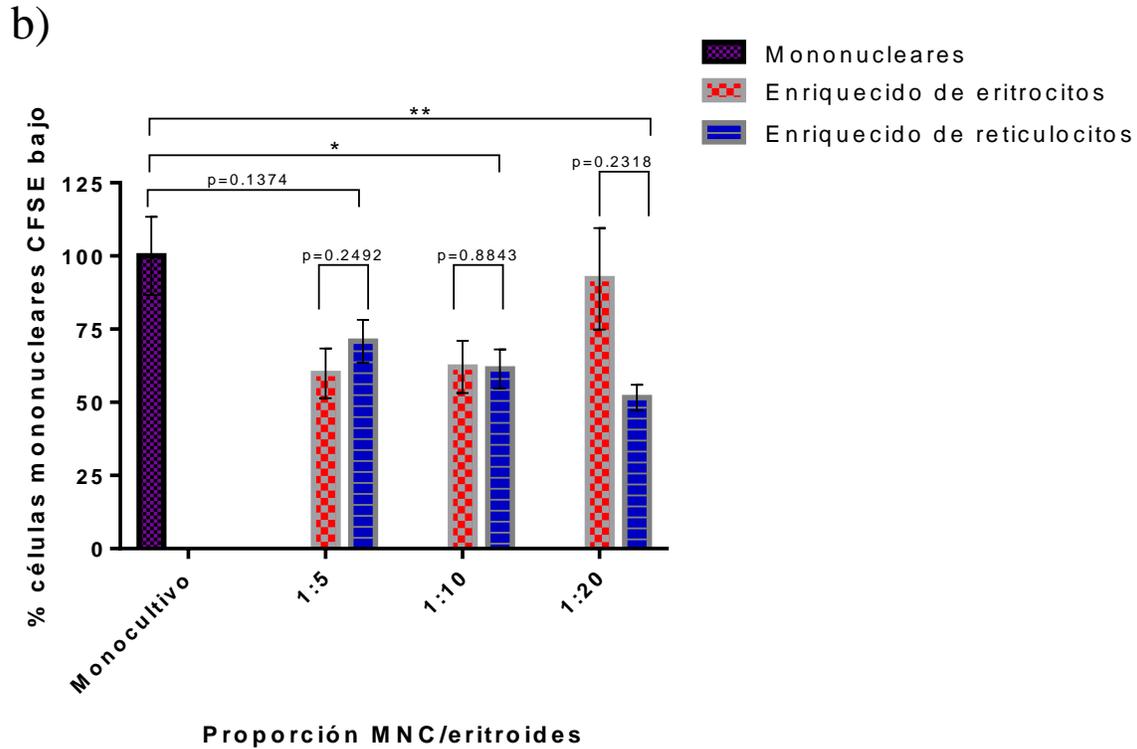


Figura 9. Los reticulocitos sanguíneos neonatales inhiben la proliferación de MNC autólogos estimulados con mitógeno.

En a), *dot plots* de la linfoproliferación de MNC, estimulados con mitógeno, en presencia de diferentes concentraciones de reticulocitos. En b), porcentaje de células proliferantes (CFSE^{bajo}) con respecto al total de MNC (DAPI^{alto}), en cada condición experimental. Prueba de U de Mann Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $p > 0.05$, sin significancia estadística.

Para el ensayo de cocultivo heterólogo, se cultivaron MNC de adultos ($n=2$) contra dos enriquecidos de reticulocitos de cordón umbilical, respectivamente. El porcentaje de proliferación disminuyó, con respecto al monocultivo (transformado al 100%), al 65.49 % (DE \pm 12.4765) en la condición 1:5; al 61.47 % (DE \pm 11.7065) en la condición 1:10 y al 58.51 % (DE \pm 11.9031) en la condición 1:20. Las condiciones control mostraron una modesta disminución en la proliferación, con una media global del 81.41 % (DE \pm 32.7276). Sin embargo, ninguna condición alcanzó significancia estadística ($p=0.4689$) (figura 10).

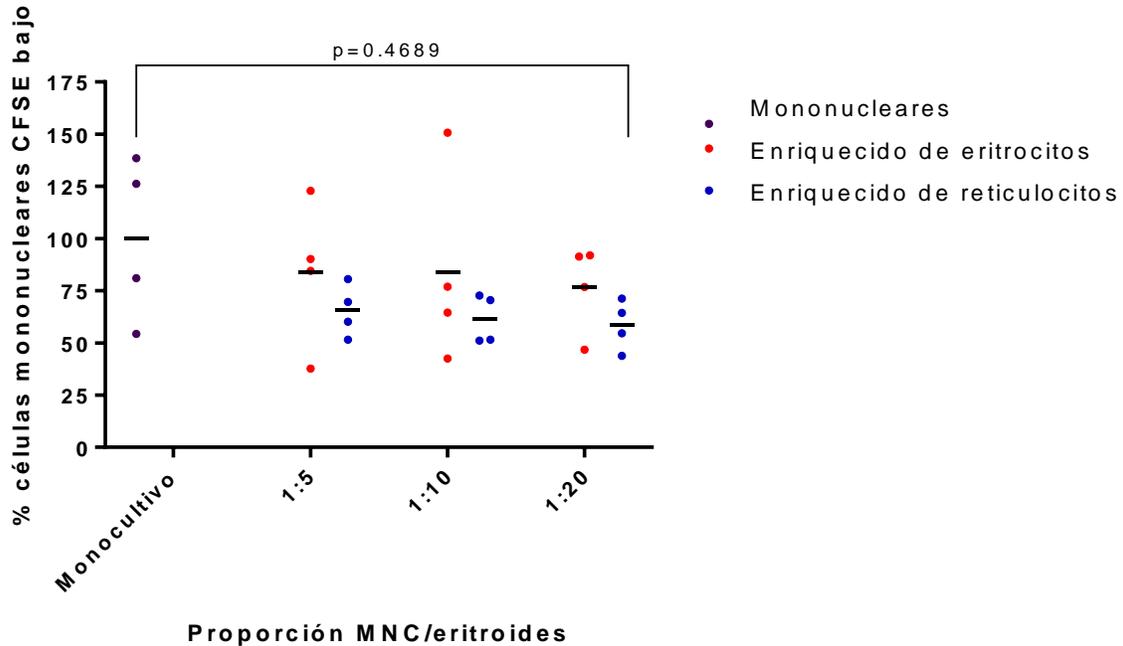
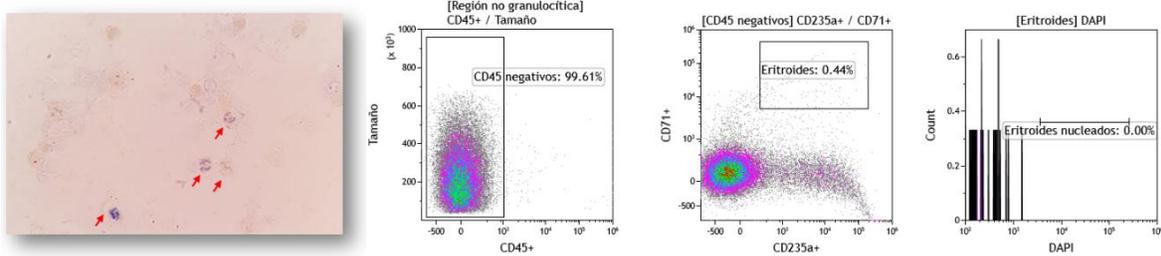


Figura 10. Efecto del cocultivo del enriquecido de reticulocitos de cordón umbilical sobre la proliferación de MNC de adultos.

Porcentaje de células proliferantes (CFSE^{bajo}) con respecto al total de MNC (DAPI^{alto}), en cada condición experimental. Prueba de U de Mann Whitney. $p > 0.05$, sin significancia estadística.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de cocultivo entre el enriquecido reticulocitos de sangre periférica de adultos (figura 3) y MNC autólogos, como se describió en la sección 7.8.5. Las características del enriquecido fueron similares al obtenido de sangre de cordón umbilical; con un 98.48 % (DE \pm 2.7852) libre de leucocitos, poseyó un 24.26 % (DE \pm 13.4522) de reticulocitos morfológicamente distintivos y fue 99.6 % (DE \pm 0.8043) libre de eritroides nucleados. Sin embargo, a diferencia del enriquecido de cordón umbilical, sólo el 1.64 % fueron CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁺ (0.4 % [DE \pm 0.8043] del total) ($p < 0.0001$) (figura 11).



Morfología = % reticulocitos 24.2555 (DE± 13.4522) CD45 negativos = 98.4765% (DE ±2.7852) Eritroides CD71⁺/CD235a⁺ = 0.3975% (DE ±0.8043) Reticulocitos (DAPI) = 99.6025% (DE ±0.8043)

Tinción con nuevo azul de metileno

Figura 11. Características del enriquecido de reticulocitos de sangre periférica de adultos.

De derecha a izquierda, se muestra una imagen representativa con tinción de nuevo azul de metilo. Un *dot plot* de CD45⁺(APC) del total de células. *Dot plot* de CD71 (FITC) contra CD235a (PE). Histograma de la tinción con DAPI. Se muestran las proporciones obtenidas en cada condición. DE: Desviación estándar.

Debido a que la condición 1:5 no mostró diferencias en la media de proliferación con respecto al monocultivo (ensayos preliminares no incluidos), se cambió por una condición suprafisiológica 1:40 (sección 7.8.5, figura 3). El porcentaje de proliferación disminuyó, con respecto al monocultivo (transformado al 100%), al 78.5%(DE±17.6666) en la condición 1:10; al 72.1% (DE± 13.3466) en la condición 1:20 y al 42.9% ([DE±27.9955], $p<0.01$) (figura 12). No se encontraron diferencias significativas de cada condición experimental con su respectivo control de celularidad (figura 12).

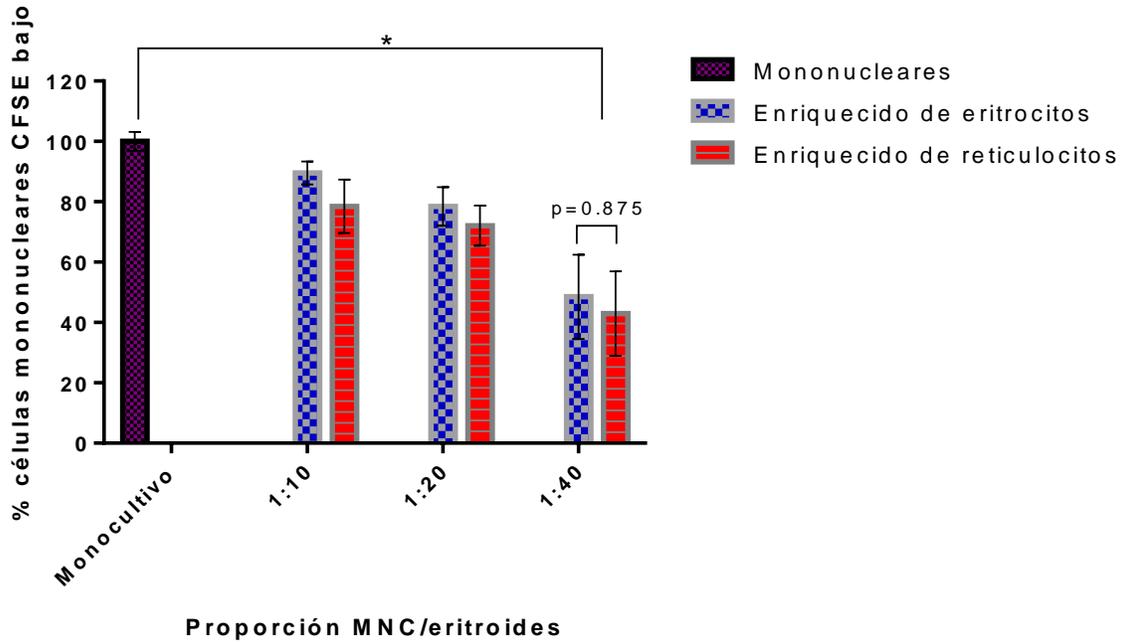


Figura 12. Efecto del cocultivo del enriquecido de reticulocitos de sangre periférica de adultos sobre la proliferación de MNC autólogos.

Porcentaje de células proliferantes (CFSE^{bajo}) con respecto al total de MNC (DAPI^{alto}), en cada condición experimental. Prueba de Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$. $p > 0.05$, sin significancia estadística.

11. Discusión

La fracción mononuclear de la sangre de cordón umbilical se encuentra fisiológicamente enriquecida con una población de células de linaje eritroide que coexpresan los marcadores CD71 y CD235a y, que al ser separadas del total de células mononucleares, aumentan la respuesta inmunológica innata y adquirida de los leucocitos *in vitro*^{29,53,61}. La proporción de estas células, en el bazo murino, se relaciona negativamente con la capacidad de establecer una respuesta inflamatoria ante una infección sistémica, que es mínima en neonatos y lactantes, donde alcanzan sus niveles más altos, mientras que individuos juveniles, las células eritroides están prácticamente ausente²⁹. Dado a que en este modelo el bazo representa un sitio hematopoyético primario, se atribuyó el papel inmunosupresor a los eritroblastos^{26,45}. Sin embargo, en seres humanos, la presencia de estas células en sangre periférica, fuera de la primera semana de vida extrauterina, se considera un hallazgo patológico^{43,58,60}.

El reticulocito, el precursor inmediato al eritrocito, también coexpresa ambos marcadores⁴⁶ y se encuentra fisiológicamente enriquecido en cordón umbilical, en el periodo neonatal y en parte de lactancia en seres humanos⁷⁷. Por lo que decidimos evaluar el fenotipo de las células eritroides CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁻ en muestras humanas de individuos de distintos grupos de edad. De manera análoga a lo encontrado en bazo de ratones, estas células disminuyen sus concentraciones consistentemente dentro del primer mes de vida extrauterina y llegan a ser prácticamente inexistentes en sangre periférica a partir del grupo de lactantes de entre 6 a 12 meses (figura 6b). En todos los grupos analizados los reticulocitos fueron entre 3 a 5 veces más abundantes que las células eritroides nucleadas. Por lo que, si estas células últimas tienen un papel en el establecimiento de la microbiota al nacimiento, como se ha sugerido en ratones²⁹, los reticulocitos tendrían mayor relevancia fisiológica.

Los cultivos de sangre completa ofrecen la ventaja de recrear mejor las condiciones de su nicho biológico (*ex vivo*) que los cultivos de células aisladas; requieren menos manipulación, por lo que se reduce el riesgo de preactivación, contaminación y de enriquecimiento o eliminación de subpoblaciones⁹⁶. Para mejorar la sensibilidad de nuestro estudio, incluimos una tinción nuclear con DAPI y evaluamos la proliferación con CFSE (sección 7.8.6, figura 5). Al estimular los linfocitos con un mitógeno (PWM), no encontramos diferencias significativas en la capacidad de proliferación entre los diferentes grupos formados (figura

7a). Esto quizá se deba a que el estímulo dado por el mitógeno es policlonal e inespecífico y, al sobrepasar posibles sitios de regulación en la señalización celular, en entre la activación y la respuesta final que pudieran ejercer estas células^{29,55}, el efecto global de la respuesta inmunológica (proliferación) no se vea influenciada por la presencia de los reticulocitos CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁻. Esto hace sentido a la hipótesis que los leucocitos fetales o neonatales no son distintos o “inmaduros” con respecto a sus contrapartes adultas; ya que, ante las infecciones congénitas y la sepsis neonatal, estas células son capaces de montar robustas respuestas inflamatorias contra patógenos^{19,28}. Debido a esta homogeneidad en la proliferación entre los diferentes grupos, no se encontró una correlación entre las proporciones de reticulocitos CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁻ y la respuesta inmunológica evaluada (figura 7b). Adicionalmente, es posible que el efecto sobre la proliferación en general sea mínimo y el ensayo haya sido poco posible para detectarlo, al evaluar valores relativos (proporciones) sobre absolutos.

Como perspectivas, sería necesario explorar el efecto de estas células ante un reto antigénico distinto (patogénico o ligandos de TLR), si el efecto regulador ocurre al ejercer un perfil disminuido o diferencial en la expresión de citocinas o quimiocinas, lo cual produciría un efecto sobre el reclutamiento y fenotipo de los leucocitos en el sitio anatómico de interés; si el efecto ejercido por estas células es disminuir la capacidad de activación de células inflamatorias y adaptativas, como se propone en la sepsis^{29,74}, si promueven la maduración y diferenciación de otras poblaciones reguladoras o si su efecto es sobre una respuesta inmunológica distinta (fagocitosis, citotoxicidad, producción de inmunoglobulinas, etcétera) como se ha analizado en ratones^{29,53,61} y con eritroides nucleados de cordón umbilical⁵⁵. Además, sería relevante buscar la relación entre los niveles de los reticulocitos CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁻, con el desarrollo y curso clínico de la sepsis neonatal y perinatal en individuos infectados, como se ha explorado para los precursores eritroides nucleados⁵⁹.

Debido al importante número de variables existentes en sangre completa que modifican la respuesta inmunológica (factores solubles en el plasma, distintas concentraciones de micro y macronutrientes, poblaciones reguladoras y efectoras, etcétera), las condiciones inherentes de los cultivos sanguíneos completos (riesgo de hemólisis, formación de coágulos, etcétera⁹⁶) y que no es posible conocer los niveles de las poblaciones celulares analizadas (efecto de volumen)⁹⁸, era necesario conocer el efecto inmunológico de los reticulocitos sanguíneos

neonatales humanos en condiciones controladas. Para ello, se estandarizó una técnica de enriquecimiento de los mismos (sección 7.8.3), con rendimientos similares a los reportados en la literatura^{100,104} (figuras 8 y 11). Se encontró que, al aumentar la proporción del enriquecido de reticulocitos con respecto al número de MNC autólogos, la capacidad de linfoproliferación de estos últimos disminuyó de manera significativa (figura 9b). Este efecto muestra una tendencia similar sobre la proliferación de MNC de adultos; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones analizadas (figura 10). Como perspectiva, un estudio dirigido a aumentar el número de individuos analizados podría confirmar esta tendencia.

Al evaluar este efecto, pero empleando un enriquecido de reticulocitos de sangre periférica de adultos (figura 11), sobre la proliferación de MNC autólogos, no se encontraron diferencias significativas con respecto al monocultivo (figura 12). Con estas células, se incluyó una proporción mayor de reticulocitos (1:40), donde se demostró una disminución significativa de la proliferación; sin embargo, se obtuvo el mismo resultado con el control de celularidad (eritrocitos), por lo que el efecto observado es más probable que se explique por un agotamiento de los nutrientes del medio y no por un efecto supresor de los reticulocitos. A pesar de que en ambos enriquecidos se obtuvo una concentración similar de reticulocitos identificados por sus características morfológicas (tinción con nuevo azul de metileno), sólo en el enriquecido obtenido de cordón umbilical existió una población significativa de células CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁻ (figura 8). Publicaciones recientes han demostrado que la presencia de CD71 en los reticulocitos los hace una población fenotípicamente distinta de aquellos reticulocitos que no lo expresan⁹⁰; y que los primeros están más relacionados con las características biofísicas, metabólicas y de expresión diferencial de proteínas de los eritroblastos⁸⁹, por lo que es posible atribuir el efecto inmunosupresor del enriquecido a los reticulocitos CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁻. Como perspectivas, es necesario mejorar el rendimiento de la purificación de estos reticulocitos, comparar su efecto inmunológico contra las células eritroides nucleadas⁵⁵, evaluar si el efecto ejercido por estas células es por factores solubles o dependiente de contacto e identificar cuál o cuáles son sus posibles mecanismos moleculares inmunosupresores.

Ante la identificación del efecto inmunosupresor de los reticulocitos sanguíneos neonatales humanos, se abre la posibilidad de evaluar si estas células juegan un papel en los particulares

fenómenos inmunológicos encontrados en individuos de esta edad: en la persistencia de la tolerancia fetomaterna de los prematuros, ante la vacunación, en la experiencia materna, en el establecimiento de la microbiota y en la susceptibilidad ante enfermedades infecciosas, en el desarrollo de alergias, atopia y asma, etcétera.

12.Perspectivas

El hallazgo de la actividad inmunosupresora de los reticulocitos sanguíneos neonatales humanos se suma a la evidencia acumulada de más de 40 años de los efectos inmunorreguladores de las células de linaje eritroide, desde los eritroblastos hasta los eritrocitos, en determinadas condiciones^{26,52,55,78-80}. Se ha propuesto, con base en experimentos desarrollados en ratones^{29,31,53,61}, un papel inmunomodulador para el establecimiento de la microbiota o en el tolerancia fetomaterna, por lo que podría explorarse cuál es el efecto de los reticulocitos neonatales humanos en estos procesos fisiológicos. Además, podrían tener alguna relevancia en otros procesos en donde una estricta regulación de la inflamación es necesaria, como en el asma, las alergias, la atopia, o estén relacionados en la disminuida capacidad de los neonatos de generar memoria inmunológica ante la vacunación^{19,24}.

También se ha descrito que hay diferencias en las concentraciones de estas células, en sangre de cordón umbilical, entre neonatos nacidos con o sin trabajo de parto, encontrándose aumentados en estos últimos⁵⁴. La fenotipificación de estas células y su probable participación en el mecanismo de inducción del trabajo de parto se desconoce. La expresión del CD71 en los reticulocitos se relaciona directamente con su grado de maduración⁸⁹ y en los neonatos tempranos (de 1 a 7 días) más del 30% son reticulocitos inmaduros⁷⁷. En este estudio, encontramos que el enriquecido de reticulocitos de adultos no mostró el efecto producido por su contraparte de cordón umbilical, y este efecto puede ser explicado por el bajo número de reticulocitos inmaduros (identificados como CD45⁻/CD71⁺/CD235a⁻, figura 11). Sin embargo, es necesario obtener ambas poblaciones por separado y evaluar sus efectos sobre células inmunológicas.

Diferentes estudios han demostrado que las células eritroides CD71⁺/CD235a⁺³⁰, así como eritroblastos provenientes de cordón umbilical⁵⁵, médula ósea o hígado fetal^{26,52,105} no sintetizan citocinas ni quimiocinas inmunoregulatoras; no obstante, son capaces de estimular la síntesis de citocinas antiinflamatorias, como IL-10 o TGF- β ^{30,55}, a través de mecanismos desconocidos. Se conoce que los reticulocitos pierden más del 20% de sus membranas a través de exosomas⁸⁵, y que estos pueden contener mecanismos reguladores de la transcripción, como los miRNAs¹⁰⁰. El conocer cómo estas células regulan la expresión de

citocinas y quimiocinas de las células inflamatorias ampliaría nuestro entendimiento de la relación entre ambos linajes celulares y sus formas de comunicación.

Aquellas enfermedades donde se encuentran elevados los niveles de reticulocitos, como las talasemias y otras hemoglobinopatías¹⁰⁶, son susceptibles a las infecciones, principalmente a las intracelulares, como en los neonatos²². A la fecha, no existen estudios que relacionen las concentraciones de estas células, particularmente las inmaduras, con este aspecto del curso clínico de las enfermedades citadas. La sepsis neonatal y otras enfermedades inflamatorias de la infancia se relacionan inversamente con los niveles de eritroides nucleados^{59,60} y un fenómeno similar podría relacionarse con los reticulocitos, por lo que podrían fungir en la clínica como marcadores diagnósticos o pronósticos en estas enfermedades.

Por último, Miller *et al.*³⁰ encontraron un efecto paradójico al cocultivar eritroides de cordón umbilical con MNC maternas, debido a que estas últimas aumentaban la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y disminuían la expresión de TGF- β , al ser estimuladas con LPS. Es posible que el efecto inmunoregulador de estas células se extienda más allá del espectro supresor, y su papel homeostático se modifique dependiendo el nicho biológico, los estímulos del medio, el estado de salud y edad del individuo, entre otros factores. Aunque en este estudio no se demostraron cambios estadísticamente significativos en el cocultivo heterólogo, es importante evaluar otras respuestas inmunológicas, como síntesis de citocinas, quimiocinas, activación, citotoxicidad, producción de inmunoglobulinas, etcétera.

13. Conclusiones

Las células eritroides CD45⁻CD71⁺/CD235a⁺ son esencialmente reticulocitos (DAPI-). Su número disminuye progresivamente durante el periodo neonatal a ser prácticamente inexistentes a partir de la lactancia, lo que significa que estas células podrían tener mayor relevancia fisiológica, en la regulación inmunológica, que las células eritroides nucleadas.

La capacidad global de linfoproliferación en sangre completa no se correlaciona con las concentraciones de los reticulocitos CD45⁻CD71⁺/CD235a⁺. Lo que significa que es posible que en el tejido completo existan mecanismos reguladores que homogenicen la respuesta de proliferación indistintamente de la edad del individuo.

Los reticulocitos provenientes de sangre de cordón umbilical disminuyeron la proliferación de MNC autólogas, de una forma dependiente de concentración. No se encontró un efecto estadísticamente significativo sobre la proliferación de PBMC de adultos, donde el enriquecido de reticulocitos fue escaso en células CD45⁻CD71⁺/CD235a⁺. Por lo tanto, el enriquecido de reticulocitos de cordón umbilical mostró un efecto inmunosupresor sobre la proliferación de linfocitos autólogos, y esta actividad se relacionó con el fenotipo CD45⁻CD71⁺/CD235a⁺.

14.Referencias

1. Hayes, D. K. *et al.* Insights in Public Health Saving Babies : Reducing Infant Mortality in Hawai ‘ i. **72**, 246–251 (2013).
2. Liu, L. *et al.* Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet* **388**, 3027–3035 (2016).
3. Raymond, S. L. *et al.* Immunological Defects in Neonatal Sepsis and Potential Therapeutic Approaches. *Front. Pediatr.* **5**, 1–8 (2017).
4. Laws, P., Abeywardana, S., Walker, J. & Sullivan, E. Australia’s Mothers and Babies 2005. *Perinat. Stat. Ser. Number 20*, (2007).
5. Liu, L. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet* **385**, 430–440 (2015).
6. Byass, P. Child mortality is (estimated to be) falling. *Lancet* **388**, 2965–2967 (2016).
7. Notimex. México reduce tasa de mortalidad infantil: Unicef. *Universal* (2015).
8. Sepúlveda, J. *et al.* Improvement of child survival in Mexico: the diagonal approach. *Lancet* **368**, 2017–2027 (2006).
9. Fernández, S. B., Trujillo, G. G. & Uribe, R. V. Principales causas de mortalidad infantil en México: tendencias recientes. *Bol Med Hosp Infant Mex* **69**, 144–148 (2012).
10. Campa, M. Retos de la mortalidad infantil en México y el mundo. *México Social* (2017).
11. Simonsen, K. A., Anderson-Berry, A. L., Delair, S. F. & Dele Davies, H. Early-onset neonatal sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 21–47 (2014).
12. Vergnano, S., Sharland, M., Kazembe, P., Mwansambo, C. & Heath, P. T. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **90**, 220–224 (2005).

13. Stoll, B. J. *et al.* Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA* **314**, 1039 (2015).
14. Kan, B., Razzaghian, H. R. & Lavoie, P. M. An Immunological Perspective on Neonatal Sepsis. *Trends Mol. Med.* **22**, 290–302 (2016).
15. Melville, J. M. & Moss, T. J. M. The immune consequences of preterm birth. *Front. Neurosci.* **7**, 1–9 (2013).
16. Marodi, L. Neonatal Innate Immunity to Infectious Agents. *Infect. Immun.* **74**, 1999–2006 (2006).
17. Simon, A. K., Hollander, G. A. & McMichael, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci* **282**, pii: 20143085 (2015).
18. PrabhuDas, M. *et al.* Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat. Immunol.* **12**, 189–194 (2011).
19. Zhang, X., Zhivaki, D. & Lo-Man, R. Unique aspects of the perinatal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 495–507 (2017).
20. Goenka, A. & Kollmann, T. R. Development of immunity in early life. *J. Infect.* **71**, S112–S120 (2015).
21. PrabhuDas, M. *et al.* Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nat. Immunol.* **16**, 237–243 (2002).
22. Levy, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* **7**, 379–390 (2007).
23. Zaghoulani, Habib, Hoeman CM, A. B. Neonatal immunity: Faulty T-helper and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol* **30**, 585–591 (2009).
24. Siegrist, C.-A. & Aspinall, R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 185–194 (2009).
25. Gervassi, A. L. & Horton, H. Is infant immunity actively suppressed or immature? *Viol. Res. Treat.* **5**, 1–9 (2014).
26. Elahi, S. New insight into an old concept: role of immature erythroid cells in immune

- pathogenesis of neonatal infection. *Front. Immunol.* **5**, 376 (2014).
27. Hassan, J., O'Neill, S., O'Neill, L. a, Pattison, U. & Reen, D. J. Signalling via CD28 of human naive neonatal T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 192–198 (1995).
 28. Angelone, D. F. *et al.* Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF- α production in vitro and in vivo. *Pediatr. Res.* **60**, 205–209 (2006).
 29. Elahi, S. *et al.* Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature* **504**, 158–62 (2013).
 30. Miller, D. *et al.* CD71+ erythroid cells from neonates born to women with preterm labor regulate cytokine and cellular responses. *J. Leukoc. Biol.* **103**, 761–775 (2018).
 31. Delyea, C. *et al.* CD71 + Erythroid Suppressor Cells Promote Fetomaternal Tolerance through Arginase-2 and PDL-1. *J. Immunol.* **200**, 4044–4058 (2018).
 32. Kondo, M. *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 759–806 (2003).
 33. Ivanovs, A. *et al.* Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J. Exp. Med.* **208**, 2417–2427 (2011).
 34. Socolovsky, M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 215–224 (2007).
 35. Gregory, C. J. & Eaves, A. C. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood* **49**, 855–64 (1977).
 36. Robinson, J., Sieff, C., Delia, D., Edwards, P. A. W. & Greaves, M. Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation. *Nature* **289**, 68–71 (1981).
 37. Koury, M. J. Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia. *Blood Rev.* **28**, 49–66 (2014).
 38. Migliaccio, A. R., Campisi, S. & Migliaccio, G. Standardization of progenitor cell

- assay for cord blood banking. *Ann. Ist. Super. Sanita* **37**, 595–600 (2001).
39. Dzierzak, E. & Philipsen, S. Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, 1–16 (2013).
 40. Koury, M. J. & Bondurant, M. C. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* **248**, 378–81 (1990).
 41. Manwani, D. & Bieker, J. J. Chapter 2 The Erythroblastic Island. in **2153**, 23–53 (2008).
 42. An, X. & Mohandas, N. Erythroblastic islands, terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation. *Int. J. Hematol.* **93**, 139–143 (2011).
 43. Baschat, A. A. *et al.* Nucleated red blood cell counts in the first week of life: a critical appraisal of relationships with perinatal outcome in preterm growth-restricted neonates. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **197**, 1–8 (2007).
 44. Fornas, O., Domingo, J. C., Marin, P. & Petriz, J. Flow Cytometric-Based Isolation of Nucleated Erythroid Cells during Maturation: An Approach to Cell Surface Antigen Studies. *Clin. Cytom.* **50**, 305–312 (2002).
 45. Chen, K. *et al.* Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17413–8 (2009).
 46. Wangen, J. R., Eidenschink Brodersen, L., Stolk, T. T., Wells, D. A. & Loken, M. R. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: Important considerations for specimen preparation. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 184–196 (2014).
 47. An, X. & Chen, L. Flow Cytometry (FCM) Analysis and Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) of Erythroid Cells. in 153–174 (2018). doi:10.1007/978-1-4939-7428-3_9
 48. Hu, J. *et al.* Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* **121**, 3246–3253 (2013).
 49. Aoki, T. A comprehensive review of our current understanding of red blood cell

- (RBC) glycoproteins. *Membranes (Basel)*. **7**, 1–19 (2017).
50. Sennikov, S. V *et al.* Production of hemo- and immunoregulatory cytokines by erythroblast antigen+ and glycophorin A+ cells from human bone marrow. *BMC Cell Biol.* **5**, 39 (2004).
 51. Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 107–137 (2003).
 52. Seledtsova, G. V. *et al.* Erythroid cells in immunoregulation: Characterization of a novel suppressor factor. *Immunol. Lett.* **93**, 171–178 (2004).
 53. Namdar, A. *et al.* CD71+ erythroid suppressor cells impair adaptive immunity against *Bordetella pertussis*. *Sci. Rep.* **7**, 7728 (2017).
 54. Gomez-Lopez, N. *et al.* Umbilical cord CD71+ erythroid cells are reduced in neonates born to women in spontaneous preterm labor. *Am. J. Reprod. Immunol.* **76**, 280–284 (2016).
 55. Cui, L. *et al.* Immunoregulatory function of neonatal nucleated red blood cells in humans. *Immunobiology* **221**, 853–861 (2016).
 56. Mitsov, A. V., Tsyrova, I. G., Kiselev, S. V & Kozlov, V. V. Species-nonspecific action of soluble immunosuppressive factor produced by murine immature erythroid cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **628**, 399–409 (1991).
 57. Seledtsov, V. I. *et al.* Erythroid cells in suppressing leukemia cell growth. *Leuk. Lymphoma* **46**, 1353–6 (2005).
 58. Christensen, R. D., Henry, E., Andres, R. L. & Bennett, S. T. Reference ranges for blood concentrations of nucleated red blood cells in neonates. *Neonatology* **99**, 289–294 (2011).
 59. Ranganathan, D., Khoshnood, B., Boonlayangoor, S. & Meadow, W. Nucleated Red Blood Cells (NRBCs): An Unheralded Marker of Early-Onset Neonatal Sepsis. *Pediatr. Res.* **45**, 273A–273A (1999).
 60. Dulay, A. T. *et al.* Nucleated red blood cells are a direct response to mediators of inflammation in newborns with early-onset neonatal sepsis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*

198, 426.e1-426.e9 (2008).

61. Dunsmore, G. *et al.* Erythroid Suppressor Cells Compromise Neonatal Immune Response against *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* ji1700742 (2017). doi:10.4049/jimmunol.1700742
62. Cederbaum, S. D. *et al.* Arginases I and II: Do their functions overlap? *Mol. Genet. Metab.* **81**, 38–44 (2004).
63. Rodriguez, P. C. *et al.* L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J. Immunol.* **171**, 1232–1239 (2003).
64. Mieulet, V. *et al.* TPL-2 – Mediated Activation of MAPK Downstream of TLR4 Signaling Is Coupled to Arginine Availability. **3**, 1–9 (2011).
65. Oberlies, J. *et al.* Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* **182**, 5259–5267 (2009).
66. McGovern, N. *et al.* Human fetal dendritic cells promote prenatal T-cell immune suppression through arginase-2. *Nature* **546**, 662–666 (2017).
67. Yu, H. R. *et al.* L-Arginine modulates neonatal lymphocyte proliferation through an interleukin-2 independent pathway. *Immunology* **143**, 184–192 (2014).
68. Kropf, P. *et al.* Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur. J. Immunol.* **37**, 935–945 (2007).
69. Wu, G., Jaeger, L. A., Bazer, F. W. & Rhoads, J. M. Arginine deficiency in preterm infants: Biochemical mechanisms and nutritional implications. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 442–451 (2004).
70. Illsinger, S. *et al.* Plasma and urine amino acid pattern in preterm infants on enteral nutrition: impact of gestational age. *Amino Acids* **38**, 959–72 (2010).
71. Badurdeen, S., Mulongo, M. & Berkley, J. A. Arginine depletion increases susceptibility to serious infections in preterm newborns. *Pediatr. Res.* **77**, 290–7 (2015).
72. Habicht, A. *et al.* A Link between PDL1 and T Regulatory Cells in Fetomaternal Tolerance. *J. Immunol.* **179**, 5211–5219 (2007).

73. D'Addio, F. *et al.* The Link between the PDL1 Costimulatory Pathway and Th17 in Fetomaternal Tolerance. *J. Immunol.* **187**, 4530–4541 (2011).
74. Wynn, J. L. *et al.* Neonatal CD71+ Erythroid Cells Do Not Modify Murine Sepsis Mortality. *J. Immunol.* **195**, 1064–1070 (2015).
75. Azizi, E., Dror, Y. & Wallis, K. Arginase activity in erythrocytes of healthy and ill children. *Clin. Chim. Acta.* **28**, 391–6 (1970).
76. Kubota, K., Yoshino, M., Koga, Y., Aramaki, S. & Yamashita, F. Arginase activity in peripheral erythrocytes in developing individuals. *Kurume Med. J.* **30**, 103–5 (1983).
77. Christensen, R. D., Henry, E., Bennett, S. T. & Yaish, H. M. Reference intervals for reticulocyte parameters of infants during their first 90 days after birth. *J. Perinatol.* 1–6 (2015). doi:10.1038/jp.2015.140
78. Muszynski, J. *et al.* Immunosuppressive effects of red blood cells on monocytes are related to both storage time and storage solution. *Transfusion* **52**, 794–802 (2012).
79. Long, K. *et al.* In vitro transfusion of red blood cells results in decreased cytokine production by human T cells. *J Trauma Acute Care Surg* **77**, 198–201 (2014).
80. Bernard, A. *et al.* Red blood cell arginase suppresses Jurkat (T cell) proliferation by depleting arginine. *Surgery* **143**, 286–291 (2008).
81. Bessman, J. D. Reticulocytes. *Clin. Methods Hist. Phys. Lab. Exam.* (1990).
82. Riley, R. S., Ben-Ezra, J. M., Goel, R. & Tidwell, A. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J. Clin. Lab. Anal.* **15**, 267–294 (2001).
83. Kumar, A. A. *et al.* Enrichment of reticulocytes from whole blood using aqueous multiphase systems of polymers. *Am. J. Hematol.* **90**, 31–36 (2015).
84. Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J. A. & An, X. Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* **115**, 2021–2027 (2010).
85. Géminard, C., De Gassart, A. & Vidal, M. Reticulocyte maturation: Mitoptosis and exosome release. *Biocell* **26**, 205–215 (2002).
86. Griffiths, R. E. *et al.* Maturing reticulocytes internalize plasma membrane in

- glycophorin A-containing vesicles that fuse with autophagosomes before exocytosis. *Blood* **119**, 6296–6306 (2012).
87. Davis, B. H. & Bigelow, N. C. Flow cytometric reticulocyte quantification using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **113**, 684–9 (1989).
 88. Davis, B. H., Ornvold, K. & Bigelow, N. C. Flow cytometric reticulocyte maturity index: A useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. *Cytometry* **22**, 35–39 (1995).
 89. Malleret, B. *et al.* Significant Biochemical, Biophysical and Metabolic Diversity in Circulating Human Cord Blood Reticulocytes. *PLoS One* **8**, (2013).
 90. Chu, T. T. T. *et al.* Quantitative mass spectrometry of human reticulocytes reveal proteome-wide modifications during maturation. *Br. J. Haematol.* **180**, 118–133 (2018).
 91. Cavill, I. The rejected reticulocyte. *Br. J. Haematol.* **84**, 563–5 (1993).
 92. Lee, E. *et al.* The RNA in reticulocytes is not just debris: It is necessary for the final stages of erythrocyte formation. *Blood Cells, Mol. Dis.* **53**, 1–10 (2014).
 93. Srivastava, A. *et al.* Host Reticulocytes Provide Metabolic Reservoirs That Can Be Exploited by Malaria Parasites. *PLoS Pathog.* **11**, 1–22 (2015).
 94. Kumar, S. K. M. & Bhat, B. V. Distinct mechanisms of the newborn innate immunity. *Immunol. Lett.* **173**, 42–54 (2016).
 95. Dixon, J. F., Law, J. L. & Favero, J. J. Activation of human T lymphocytes by crosslinking of anti-CD3 monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.* **46**, 214–20 (1989).
 96. Gaines, H. & Biberfeld, G. Measurement of Lymphoproliferation at the Single-Cell Level by Flow Cytometry. in *T Cell Protocols* **134**, 243–255 (Humana Press, 2000).
 97. Everett, E. T., Kao, K. J. & Scornik, J. C. Class I HLA molecules on human erythrocytes. Quantitation and transfusion effects. *Transplantation* **44**, 123–9 (1987).
 98. Muul, L. M. *et al.* Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* **2011**, 1–26 (2011).

99. Fuss, I. J., Kanof, M. E., Smith, P. D. & Zola, H. Isolation of whole mononuclear Cells from peripheral blood and cord blood. *Curr. Protoc. Immunol.* 1–8 (2009). doi:10.1002/0471142735.im0701s85
100. Banton, S. Human peripheral reticulocyte isolation and exosome release in vitro. (Georgia Institute of Technology, 2017).
101. Quah, B. J. C. & Parish, C. R. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J. Vis. Exp.* **1**, 4–6 (2010).
102. Reeke, G. N. *et al.* Structure and function of concanavalin A. *Adv. Exp. Med. Biol.* **55**, 13–33 (1975).
103. Darzynkiewicz, Z., Juan, G. & Bedner, E. Determining Cell Cycle Stages by Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cell Biol.* (2001). doi:10.1002/0471143030.cb0804s01
104. Russell, B. *et al.* A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax* Methods Twenty milliliters of cord blood were collected on lithium heparin from. **118**, 74–82 (2015).
105. Wira, C. R., Fahey, J. V., Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z. & Patel, M. V. Regulation of Mucosal Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Sex Hormones in Immune Protection Against Sexually Transmitted Pathogens. *Am. J. Reprod. Immunol.* **72**, 236–258 (2014).
106. Ricerca, B. M., Di Girolamo, A. & Rund, D. Infections in Thalassemia and Hemoglobinopathies. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* (2009). doi:10.4084/MJHID.2009.028

15. Anexos

15.1. Consentimiento informado



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ADULTOS)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:	Evaluación de la actividad inmunosupresora de los reticulocitos sanguíneos neonatales humanos.
Patrocinador externo (si aplica):	No aplica.
Lugar y fecha:	Ciudad de México, México. A 21 de marzo de 2018.
Número de registro:	En trámite.
Justificación y objetivo del estudio:	Mejorar el conocimiento de la inmunidad perinatal con perspectiva en la generación de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas con base a la evaluación de la actividad inmunosupresora de los reticulocitos sanguíneos neonatales humanos sobre la capacidad de proliferación de células mononucleares de sangre periférica, <i>in vitro</i> .
Procedimientos:	Extracción de sangre periférica por punción venosa.
Posibles riesgos y molestias:	Dolor, equimosis (moretones), flebitis (inflamación), hemorragia, los cuales son poco frecuentes, limitados y no dejan secuelas al mediano y largo plazo.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Este estudio nos permite mejorar nuestro conocimiento de la inmunidad perinatal en lo referente en las poblaciones celulares de linaje eritroide que confieren susceptibilidad a las infecciones por un estado de inmunosupresión activo. Esta investigación continúa la línea planteada en <i>Nature</i> . 2013; 504 (7478): 158–162 y los subsecuentes trabajos <i>J Immunol</i> . 2017;199(6): 2081-2095 y <i>Sci Rep</i> . 2017; 7: 7728, que podría ayudar a mejorar la calidad de vida los recién nacidos.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	En el transcurso del estudio o al finalizar el mismo, usted podrá solicitar que le sea entregada copia toda la información que se haya recabado acerca de usted, con motivo de su participación en el presente estudio
Participación o retiro:	Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Para revocar su participación en el estudio bastará con informar verbalmente al investigador.
Privacidad y confidencialidad:	La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
En caso de colección de material biológico (si aplica):	

No autoriza que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica): No aplica

Beneficios al término del estudio:

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable: Felipe Ortiz Contreras, mat: 6785956 HGR 1 IMSS. tel: 56393822 ext 20560

Colaboradores: Vladimir Herman Miguel, s/m CINVESTAV-IPN tel: 5514274189 Marco Antonio Vega López, s/m, CINVESTAV-IPN tel: 57473344 ext 5660

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Vladimir Herman Miguel

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

Clave: 2810-009-013

Folio: 001

15.2. Dictamen del Hospital de la Mujer

SALUD

COMISIÓN COORDINADORA DE LOS INSTITUTOS NACIONALES
DE SALUD Y HOSPITALES DE ALTA ESPECIALIDAD
DIRECCIÓN GENERAL DE COORDINACIÓN DE LOS
HOSPITALES FEDERALES DE REFERENCIA

HOSPITAL DE LA MUJER
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN (REGISTRO COFEPRIS CI 03 036-974)



DICTAMEN DE EVALUACIÓN COMITÉ DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL DE LA MUJER

Ciudad de México, a 25 de abril de 2018.

Título del proyecto

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA DE LOS RETICULOCITOS
SANGUÍNEOS NEONATALES HUMANOS**

Investigador Responsable/Puesto

**Vladimir Hernán Miguel, CINVESTAV
Marco Antonio López Vega, CINVESTAV**

Registro No.

Reg. HM-INV/2018:02.09

Departamento de Adscripción

División de Enseñanza/

eMail

**vladimir.hernan@cinvestav.mx
mavega@cinvestav.mx**

Fecha de recepción

02 abril 2018

Fecha de Sesión Ordinaria

18 abril 2018

Sesión No.

2018.02

Fecha de recepción (corregido)

Vigencia

RESOLUCION DEL COMITÉ DE INVESTIGACION	
Aprobado	()
No Aprobado	()
Aprobado con modificaciones	(X)

OBSERVACIONES
<ol style="list-style-type: none"> Se sugiere plantear la operacionalización de sus variables para hacerlas consistentes con el diseño estadístico Ajustar el cronograma de actividades, ya que se considera iniciar la colección de muestras antes de que sea aceptado por el Comité Indicar investigador(es) colaborador(es) del Hospital de la Mujer

Atentamente,

**Dr. Javier Mancilla Ramírez
Secretario del Comité de Investigación
Hospital de la Mujer**

Ccp: Investigador(es) del Hospital de la Mujer.-
Archivo.-