



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADQUIRIDA EN
CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE HUMANO ESTIMULADAS CON
DIFERENTES MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS AISLADAS DE MEDIO
AMBIENTE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

Martha Romy Vieyra Lobato

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso
Facultad de Medicina**

**Dr. Julio César Carrero Sánchez
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

MÉXICO, D. F. junio, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal y en la Unidad de Investigación Médica en Linfopoyesis del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la Codirección de la Dra. Rosana Pelayo Camacho.

El proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyectos SALUD-2007-C01-68729 y SALUD-2020-C01-140998) y del proyecto DGAPA-PAPIIT IN227611. Durante el desarrollo de la tesis la sustentante fue becario CONACYT con número de registro 204519.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por acompañarme en mi camino, ser mi luz y mostrarme la verdad detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.

A mis padres, por su ejemplo de vida, por darme su apoyo en todos los sentidos para alcanzar mis metas, amar mi trabajo y seguir teniendo sueños.

A mis hermanos por su ejemplo, compañía y apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de su comunidad.

A la Dra. Yolanda López Vidal por su asesoría y dirección en la realización de esta tesis. Así como por brindarme su apoyo.

A la Dra. Laura Bonifaz y al Dr. Julio César Carrero por su tutoría durante estos dos años de trabajo y por sus consejos tan valiosos para la cosección de los resultados.

ÍNDICE GENERAL

1.- Resumen.	1
2.- Introducción.	2
2.1.- Generalidades de las micobacterias no tuberculosas.	2
2.2.- Epidemiología de las infecciones por micobacterias no tuberculosas.	3
2.3.- Respuesta inmune contra las micobacterias.	4
2.4.- Respuesta inmune TH1 inducida por la vacuna de <i>M. bovis</i> BCG y el efecto modulador de <i>M. avium</i> sobre ésta.	5
2.5.- Células dendríticas.	7
2.6.- Los diferentes estados de maduración de las células dendríticas y su asociación con tolerancia.	8
2.7.- Fuentes de células dendríticas humanas.	9
3.- Justificación.	11
4.- Hipótesis.	11
5.- Objetivos.	11
5.1.- Objetivo general.	11
5.2.- Objetivos particulares.	11
6.- Material y métodos.	12
6.1.- Obtención de sangre de cordón umbilical.	12
6.2.- Obtención de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+).	12
6.3.- Diferenciación hacia células dendríticas.	12
6.4.- Micobacterias.	12
6.5.- Co-cultivo de las células dendríticas con las micobacterias no tuberculosas.	13
6.6.- Controles.	13
6.7.- Citometría de flujo.	13
6.8.- Determinación de citocinas.	14

7.- Análisis estadístico.	14
8.- Resultados.	15
Apartado I. Selección positiva de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+).	15
Apartado II. Elección de las concentraciones de los factores de crecimiento y el tiempo de diferenciación.	16
Apartado III. MOI de micobacterias.	18
Apartado IV. Células dendríticas y micobacterias.	19
- ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS OBTENIDAS A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL CON MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.	
a) Expresión de moléculas de superficie.	19
b) Citocinas.	21
- ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS OBTENIDAS A PARTIR DE MONOCITOS CON MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.	
a) Expresión de moléculas de superficie.	22
b) Citocinas.	23
9.- Discusión.	24
10.- Conclusiones.	28
11.- Perspectivas.	29
Referencias.	30
Anexo.	35

1. RESUMEN.

Las micobacterias no tuberculosas causan enfermedad en humanos infectando diversos tejidos, el número de casos reportados así como el número de especies involucradas van en aumento. *M. avium* y *M. scrofulaceum* son las especies que dominan en los casos de micobacteriosis pulmonar e infección de ganglio linfático, sin embargo, también existen micobacterias no tuberculosas inocuas, como es el caso de *M. smegmatis*, la cual sólo causa enfermedad en individuos inmunosuprimidos. Además, se ha observado en modelo murino que *M. avium* tiene la capacidad de modificar la respuesta inmune clásica TH1 protectora de la única vacuna disponible hasta el momento a nivel mundial para prevenir la tuberculosis de *Mycobacterium bovis* BCG hacia una respuesta inmune tolerogénica caracterizada por la presencia de células dendríticas con un fenotipo inmaduro-tolerogénico que conduce al linfocito T CD4 a la tolerancia (linfocitos T CD4 foxp3). Se presume que otras especies de micobacterias no tuberculosas patógenas para el hombre también puedan disminuir la eficacia de la vacuna mencionada.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las células dendríticas humanas obtenidas a partir de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical estimuladas con *M. avium*, *M. scrofulaceum* y *M. smegmatis* presentaban un fenotipo diferente después de 24 hrs de estímulo. Los fenotipos se definieron por la expresión de la molécula presentadora de antígeno HLA II, moléculas co estimuladoras CD40, CD80, CD86 y la co inhibidora CD273 (PDL-2) así como de citocinas pro inflamatorias IL-12, IL-6 y TNF α y la anti inflamatoria IL-10.

De esta manera, las células dendríticas estimuladas con BCG presentaron sobre expresión de moléculas co estimuladoras y citocinas pro inflamatorias, sin embargo también sobre expresaron a la molécula de co inhibición PDL-2 y a la citocina anti inflamatoria IL-10. Este fenotipo define a una célula dendrítica semi madura – tolerogénica. El fenotipo de las células dendríticas estimuladas con *M. avium* fue diferente, orientado hacia uno inmaduro: sin sobre expresión de moléculas co estimuladoras ni HLA II, además están presentes procesos de inhibición sumados por la presencia de CD273 y de IL-10. El fenotipo observado para las células dendríticas estimuladas con *M. scrofulaceum* es uno de tipo inmaduro en el cual la célula dendrítica no cambia su expresión de moléculas co estimuladoras ni co inhibidoras. A diferencia de las anteriores, *M. smegmatis* logró madurar a la célula dendrítica pues ésta sobre expresó HLA II y ligeramente CD86, además CD273 no se sobre expresó. Las citocinas pro inflamatorias se sobre expresaron e IL-10 se mantuvo en niveles bajos.

2. Introducción.

2.1 Generalidades de las micobacterias no tuberculosas.

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) pertenecen al género *Mycobacterium*, a un grupo diferente al complejo de *M. tuberculosis*, son bacterias con morfología bacilar, aerobias, no esporuladas y ácido alcohol resistentes; propiedad que les confiere su pared celular de ácidos micólicos. Son ubicuas, por lo que se encuentran en diversas fuentes naturales como el agua, suelo, plantas, protozoarios, animales salvajes, domésticos y en el humano [15,16].

En 1950 se identificaron como organismos capaces de causar enfermedad en humanos y en 1990 se incrementó el número de reportes, las especies aisladas fueron 42 obtenidas a partir de muestras clínicas [19,42]. Con el paso del tiempo y el uso de técnicas más discriminativas tales como HPLC (high performance liquid chromatography) y PCR punto final con sondas específicas (16S, hsp65, rpoB) el número de especies conocidas aumentó. Actualmente se identifican más de 150 especies que representan una importante causa de morbi – mortalidad, con frecuencia en la forma de enfermedad progresiva pulmonar pero también son capaces de infectar tejidos extra pulmonares como ganglios linfáticos, huesos, articulaciones, tejidos blandos y piel [57]. Antes del incremento de infecciones por MNT en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), éstas se concentraban en individuos en edades entre 50 y 59 años y en personas con afecciones pulmonares pre existentes u ocupacionalmente expuestas a aerosoles [26], actualmente el intervalo de edad de la población afectada va desde la infantil hasta la senil [13,20]. Sin embargo, no todos los casos de enfermedad por MNT se reportan. Por lo que no se cuenta con datos epidemiológicos a nivel mundial, los únicos reportes que se tienen son locales y son resultado de los estudios realizados por grupos de investigación en poblaciones delimitadas. Así, en estos reportes aislados se observa que *M. avium* ocupa el primer lugar como agente causal de micobacteriosis por MNT, la cual infecta principalmente al pulmón, en segundo lugar al ganglio linfático sobre todo en edad infantil y en sujetos con VIH ocasiona la forma diseminada. La recuperación de esta MNT en los pacientes con infección causada por ella ha permitido su identificación clonal relacionada con la que se recuperó de agua en contacto con ellos [16].

Debido a que son ubicuas y a que no se ha comprobado su transmisión de persona a persona, se tiene la hipótesis de que infectan al humano a partir de fuentes naturales donde éstas se encuentran y con las que el humano tiene contacto. Así por ejemplo en los suelos del bosque boreal de Finlandia en donde se han aislado una variedad de MNT existe una frecuencia alta de infecciones en personas con VIH e incluso en personas sin VIH que han sido diagnosticadas con micobacteriosis por *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. malmoense*. De este modo, en Estados Unidos, la frecuencia de mujeres y hombres con micobacteriosis pulmonar está en incremento sin que éstos presenten factores predisponentes como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasia o neumoconiosis. La importancia

de las MNT no sólo radica en que son potencialmente patógenas, sino que también se postula a *M. avium* como un factor que induce la tolerancia inmunológica que impacta en la disminución de la eficacia protectora de la única vacuna disponible para prevenir la tuberculosis a nivel mundial de *Mycobacterium bovis* BCG [20].

2.2. Epidemiología de las infecciones por micobacterias no tuberculosas.

Un número reducido de MNT son patógenas para el humano, el resto son oportunistas ya que causan enfermedad cuando la persona se encuentra en condiciones que comprometen la salud. El tratamiento y la gravedad de la enfermedad depende de la especie que sea la causa de la micobacteriosis por lo que es de importancia su identificación a partir de criterios microbiológicos, de acuerdo a ellos están divididas en dos grupos: MNT de crecimiento rápido que aparecen como colonias visibles en medio sólido en 7 días o menos y de crecimiento lento que requieren más de 7 días para su crecimiento en medio sólido. Las MNT de crecimiento lento son principalmente responsables de enfermedad pulmonar y de ganglio linfáticos mientras que las de crecimiento rápido afectan piel, huesos y articulaciones [18].

En cuanto a las infecciones pulmonares que son las más frecuentes, la infección ocurre por inhalación de micobacterias presentes en aerosoles. Las MNT responsables con mayor frecuencia de esta infección pertenecen al complejo de *M. avium* al cual pertenecen 2 especies de mayor importancia *M. avium* y *M. intracellulare* [31].

La infección de ganglio linfático por MNT es una afección típica de niños, en la mayoría de los casos es unilateral y aparece en la región cervical. La vía oral de infección es más probable, siendo *M. avium* la MNT prevalente en este padecimiento [27,59].

Las infecciones en piel y tejidos blandos (mano, codo, rodilla y pie) se caracterizan por lesiones granulomatosas que se desarrollan unas semanas después de la infección en donde los ganglios linfáticos locales pueden infectarse también. Las fuentes de contacto con MNT para desarrollar este tipo de infección son aguas contaminadas, peces infectados, a través de heridas e intervenciones quirúrgicas.

Este tipo de infección se le atribuye principalmente a las MNT de crecimiento rápido como *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. ulcerans*. El agua de ríos y lagos es un reservorio natural de *M. ulcerans* [18].

Las infecciones que involucran articulaciones y huesos se originan principalmente a partir de traumas como fracturas o intervenciones quirúrgicas, la funcionalidad de estos sitios anatómicos se ve afectada y evolucionan a osteomielitis. Los sujetos predispuestos a este tipo de infección son aquellos que padecen reumatismo articular o que están sujetos a tratamiento farmacológico con esteroides. Las especies involucradas son *M. haemophilum*, *M. kansasii*, el complejo de *M. avium*, *M. asiaticum* y *M. goodii* [8].

La infección diseminada por *M. avium* se presenta casi siempre en personas con un estado grave de inmunocompromiso y el caso más conocido es el VIH [25]. El sistema respiratorio y el gastrointestinal son las principales vías para contraer la infección y el paciente cursa con fiebre, diarrea, pérdida de peso, anemia, hepatomegalia y esplenomegalia, la progresión de la enfermedad suele ser muy rápida y fatal. Esta afección fue una de las primeras detectadas en pacientes con VIH y se estima que afecta al 50% de los que tienen un recuento menor de 100 CD4/ μ L [31]. *M. genavense* es otro agente etiológico de esta complicación [46]. Sin embargo, no sólo esta forma de inmunosupresión predispone para el desarrollo de la diseminación de MNT, también son susceptibles las personas inmunosuprimidas que van a recibir un trasplante o que cursen con alguna enfermedad autoinmune y aquellas que estén recibiendo terapias contra el cáncer [58].

2.3. Respuesta inmune contra las micobacterias.

La respuesta inmune mediada por células es crítica en la defensa del huésped contra las micobacterias, ésta debe estar polarizada hacia TH1, en donde el IFN γ que se produce mejora la actividad fagocítica y presentadora de los macrófagos y de CD que juegan un papel muy importante en etapas tempranas de la infección y además influyen en la respuesta inmune adaptativa. El IFN γ es producido por linfocitos T y células NK [1,3].

Los macrófagos residentes alveolares son las primeras células que reconocen y fagocitan a la micobacteria, sin embargo ésta puede persistir y replicarse dentro de los macrófagos que permanecen inactivados en los que la micobacteria es capaz de evadir la vacuola fagosomal principalmente de dos maneras: previniendo la incorporación de bombas de protones ATPasas en las vacuolas fagosomales y con ello la subsecuente acidificación de éstas o también quedándose la micobacteria libre en el citoplasma [36]. Además, los macrófagos también orquestan junto con las CD la respuesta inmune adaptativa contra la micobacteria mediante la presentación y co estimulación de linfocitos T, la producción de citocinas y quimiocinas [1].

Las células NK desempeñan un papel importante durante la infección temprana, también conocidos como linfocitos grandes granulares las células NK se activan con el contacto directo con la micobacteria, a diferencia de los linfocitos T que necesitan de la presentación de los antígenos por células accesorias para ser activados. Una vez activadas las células NK, proliferan, producen citocinas y desarrollan su actividad citotóxica. Experimentos en los que se estimulan células NK con *M. bovis* BCG, éstas son capaces de producir IFN γ y además son citotóxicas. El IFN γ podría mejorar la actividad microbicida de los macrófagos cuando éstos aún no cuentan con el IFN γ producido por linfocitos T durante la respuesta inmune adquirida (tardía) [51]. El co cultivo de NK con *M. avium* aumenta su habilidad de lisar células tumorales y monocitos infectados con bacterias [7].

Los linfocitos $T\gamma\delta$ participan en la respuesta inmune temprana, rápidamente son reclutadas en los pulmones de ratones infectados con *M. bovis* BCG, producen IFN γ así como otras citocinas del perfil TH1 y son citotóxicos para las células infectadas. Estos linfocitos activados inducen la producción de cantidades significativas de IL-15 la cual participa en la diferenciación, homeostasis y expansión de linfocitos TCD8.

Las CD son un sistema de células especializadas en la presentación del antígeno al linfocito T, en este ámbito son las más potentes para iniciar una respuesta inmune en linfocitos T vírgenes. Trabajos experimentales han demostrado que provee un ambiente para la sobrevivencia de la micobacteria cuando ésta inhibe la fusión del fagosoma con el lisosoma igual que en los macrófagos pero a diferencia de lo que ocurre en éstos, en las CD es incapaz de replicarse [39].

Las CD infectadas con *M. tuberculosis* o con *M. bovis* BCG producen IL-12, TNF α , IL-1 e IL-6 [53]. Sin embargo, también producen la citocina anti inflamatoria IL-10 la cual inhibe la respuesta celular contra la micobacteria a través de la inhibición de la producción de IL-12 la cual potencia la secreción de IFN γ y TNF α por los linfocitos T y NK que a su vez mejoran la actividad antimicrobiana de los macrófagos. [24,45,53]

Dentro de los pocos trabajos realizados con MNT se cuenta con experimentos *in vivo* en los que se realizó una sensibilización inmune de ratones con *M. avium*, *M. fortuitum* y *M. chelonae* y posteriormente se inmunizaron con BCG donde sólo *M. avium* logró disminuir la cantidad de IFN γ que se produce en respuesta a BCG y la sobrevivencia de la misma [38]. En el 2010 Coronel y col. explican la baja producción de IFN γ en linfocitos T que permanecieron en co cultivo con CD pre estimuladas con *M. avium* como consecuencia de un fenotipo inmaduro-tolerogénico en la CD que conduce al linfocito T a la tolerancia (linfocitos T foxp3) [17].

Por otra parte, en un estudio diferente con *M. smegmatis*, monocitos humanos los cuales son precursores inmediatos de CD fueron estimulados con esta MNT lo que resultó en su diferenciación hacia CD con un fenotipo maduro, además produjeron IL-10 pero conservaron la capacidad de producir IL-12 y cuando se realizó el co cultivo de las CD estimuladas con linfocitos T se obtuvo una polarización de éstos tanto hacia TH1 como hacia TH2 [43].

2.4. Respuesta inmune TH1 inducida por la vacuna de *M. bovis* BCG y el efecto modulador de *M. avium* sobre ésta.

La tuberculosis, enfermedad causada por *M. tuberculosis*, sigue siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad en todo el mundo. La única vacuna disponible es la BCG la cual es una cepa viva atenuada de la cepa de *M. bovis* que usada durante casi 100 años. Esta vacuna confiere protección sostenida y segura contra tuberculosis meníngea y diseminada

en niños pero la eficacia es variable contra la enfermedad pulmonar la cual representa la mayor causa de morbi-mortalidad por tuberculosis. Es por ello el interés de desarrollar una vacuna más eficaz, para ello es necesario entender la respuesta inmune típica protectora que debiera despertar esta vacuna en el organismo. La presencia de una respuesta inmune celular es indispensable para tener protección ante una enfermedad por micobacterias. Además la respuesta debe ser de tipo TH1, donde los linfocitos TCD4 restringidos a la presentación de antígeno por HLA II junto con las citocinas $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ desempeñan un papel principal [23]. Durante el establecimiento de esta respuesta inmune clásica contra micobacterias las células presentadoras de antígeno (CPA) pertenecientes a la respuesta inmune innata juegan un papel principal en la activación de la respuesta inmune adquirida debido a que estimulan a los linfocitos TCD4 específicos para antígenos micobacterianos mediante la expresión en su superficie de moléculas que co estimulan su activación como CD80, CD86 y la liberación al medio de citocinas pro inflamatorias como IL-12, IL-6 y $TNF\alpha$, para que después los linfocitos TCD4 a su vez estimulen a las CPA con $IFN\gamma$ que liberan al medio el cual incrementa sus funciones bacteriostáticas y bactericidas contra las micobacterias que hospedan dentro de ellas. En este respecto las CD son las únicas CPA que activan a los linfocitos TCD4 vírgenes (naive) y además son productoras de grandes cantidades de IL-12 después del estímulo micobacteriano y en consecuencia son altamente eficientes en la inducción de respuestas inmunes de tipo TH1 [5].

Como se mencionó anteriormente, la eficacia de la vacuna BCG es variable, se hipotetiza que esta variabilidad se debe a factores como el uso de distintas cepas de *M. bovis* para la vacunación en cada región del mundo y al contacto con MNT, este efecto ha sido específicamente estudiado con *M. avium* en un modelo animal, en el cual esta MNT modula la respuesta inmune tipo TH1 generada por la vacunación y la dirige hacia una respuesta inmune tolerogénica.

La capacidad de modulación de la respuesta inmune por *M. avium* se sustenta en las siguientes observaciones:

-La protección que confiere BCG contra la tuberculosis pulmonar en regiones tropicales donde *M. avium* y otras MNT están presentes en gran cantidad tiende a ser 0% [22].

-La protección que confiere la vacunación con BCG en niños que tienen nula o poca exposición a MNT por su tiempo de vida, es alta sobre todo contra las formas graves de tuberculosis que son la miliar y la meníngea [2,14,44].

-La sensibilización con *M. avium* y posterior vacunación con BCG en el ratón condiciona a una baja sobrevivencia de las micobacterias de la cepa vacunal en el pulmón y a una baja producción de $IFN\gamma$ por el linfocito T CD4 [38].

-Las células dendríticas (CD) estimuladas con *M. avium* desarrollan un fenotipo inmaduro-tolerogénico que conduce al linfocito T a la tolerancia (linfocitos T CD4 foxp3), los cuales

conservan este fenotipo aún cuando se han estimulado previamente o posteriormente con la vacuna BCG [17]. En este estudio se estimularon CD provenientes de la diferenciación de precursores celulares de médula ósea de ratón con *M. avium* en las cuales se encontró una alta expresión de la molécula co inhibidora de linfocitos T PDL-2 y de la citocina anti inflamatoria IL-10, con disminución en la expresión de moléculas co estimuladoras CD40 y CD86 y citocinas pro inflamatorias IL-12 y TNF α por la CD y más relevante aún fue el hallazgo de que se conservaba después de la estimulación de estas mismas CD con la cepa vacunal de BCG. Todo ello señala que el fenotipo inducido por *M. avium* en la CD podría estar implicado en la inducción de mecanismos de tolerancia que podrían impactar en la respuesta de linfocitos T CD4 en la vacunación con BCG como se observó en el co cultivo de linfocitos T CD4 con las CD estimuladas en cada uno de los casos. Así cuando fueron estimuladas con *M. avium* la proliferación de linfocitos T fue menor en comparación con aquellas estimuladas con la vacuna BCG. La baja proliferación de éstos se observó en CD estimuladas con *M. avium* expuestas antes o después a la vacuna BCG. El fenotipo inducido en la CD por *M. avium* afecta negativamente la proliferación de linfocitos T CD4 específicos de antígeno a través de una interacción PD1: PDL-2 y sobre producción de IL-10 que inhibe a IL-12 la cual tiene el papel de estimular un perfil de citocinas TH1. Además, los linfocitos T CD4 estimulados con CD que estuvieron en contacto con *M. bovis* BCG expresaron altos niveles de IFN γ , lo cual no ocurrió con *M. avium*. En conjunto, estos resultados indican que el fenotipo en la CD inducido por la exposición a *M. avium* como único estímulo o con previa o posterior exposición a *M. bovis* BCG no dirige hacia uno de tipo TH1 que es el que se requiere en la respuesta inmune contra micobacterias en un modelo murino.

2.5. Células dendríticas.

Las CD son una población heterogénea (formada por sub poblaciones) de células presentadoras de antígeno profesionales que desempeñan un papel crucial en la iniciación y regulación de la respuesta inmune adaptativa celular y humoral. Estas células fueron descritas por primera vez en 1868 por Langerhans pero no fue sino hasta 1973 que se nombraron “células dendríticas” por Steinman y Cohn, quienes las aislaron y caracterizaron a partir de bazo de ratón [54]. Su papel en la regulación de la respuesta inmune se estableció varios años después con una serie de experimentos llevados a cabo entre 1970 y 1980 [30,55]. Sin embargo la investigación en esta área se vio obstaculizada debido a que bajo condiciones fisiológicas normales un número muy bajo de CD está presente en sangre periférica. Además, en ese momento y hasta ahora no existen marcadores de superficie en las CD exclusivos de ellas que permitan obtener a la población pura.

Las CD completamente maduras son muy eficientes en la activación de los linfocitos T y esto depende del fenotipo que presenten las CD el cual está definido por la sobre expresión de moléculas de superficie CD40, CD80 y CD86 así como por las citocinas que producen IL-1 β ,

IL-6, TNF e IL-12 y es confirmado por la proliferación de los linfocitos T cuando se activan en el co cultivo con las CD [1,40].

Las CD están presentes en casi todos los tejidos funcionando como centinelas en un estado “inmaduro” en el cual son incapaces de activar a los linfocitos T, se distinguen por un fenotipo muy característico; expresan bajos niveles de la molécula presentadora de antígeno MHC en el ratón o su homólogo HLA en CD humanas, baja expresión de moléculas co estimuladoras CD80, CD86 así como de citocinas IL-12 y TNF α , sin embargo son muy hábiles para capturar y procesar antígenos. Posterior a la fagocitosis exponen péptidos formando complejos en su superficie con moléculas HLA, misma que se sobre expresa al igual que moléculas co estimuladoras y citocinas, migran hacia órganos linfoides secundarios: bazo y ganglios linfáticos, donde activan a linfocitos T específicos de antígeno. La maduración de las CD puede ser inducida tanto por agentes infecciosos como por productos inflamatorios. Todas las moléculas anteriores (HLA, moléculas co estimuladoras y citocinas) son sobre expresadas después de un día de exposición a sustancias estresantes y dañinas, incluyendo productos microbianos [32].

En presencia de CD maduras y de IL-12 que ellas mismas producen, los linfocitos T se vuelven productores de IFN γ convirtiéndose así en linfocitos de tipo TH1 [32], los cuales polarizan la respuesta inmune hacia una de tipo pro inflamatoria contra patógenos intracelulares como las micobacterias.

Sin embargo, las CD no sólo capturan, procesan y presentan antígenos exógenos a los linfocitos T, también lo hacen con antígenos propios sin crear ninguna respuesta inmune, propiciando así tolerancia hacia lo propio de manera que no existan procesos autoinmunes [32].

2.6. Los diferentes estados de maduración de las células dendríticas y su asociación con tolerancia.

Las CD residentes de tejidos (células de Langerhans, CD intersticiales, de parénquima, de mucosa) permanecen en un estado inmaduro hasta que se enfrentan a un antígeno exógeno o propio. Con antígenos exógenos la CD madura completamente o parcialmente dependiendo del estímulo producido por el antígeno. Con antígenos propios la CD madura parcialmente. En todos los casos anteriores la CD migra hacia los órganos linfoides secundarios y presenta el antígeno al linfocito T. Si el fenotipo de la CD es inmaduro dirige al linfocito T hacia la anergia, si es parcialmente maduro a tolerancia, pero si su fenotipo es completamente maduro podrá llevarlo hasta su completa activación [40].

No existe un criterio definitivo bien establecido de expresión de marcadores de superficie que correlacione con un estado de maduración determinado de la CD. La prueba final

confirmatoria es el ensayo funcional en el cual se co cultivan las CD con los linfocitos T CD4 y se evalúa en ellos la proliferación y producción de citocinas y de esta manera se puede saber si la CD con un fenotipo determinado provocará tolerancia o una respuesta inmunogénica en el linfocito T.

Sin embargo, aunque no existe un criterio definitivo en base al fenotipo de la CD para determinar si ésta es madura, como preámbulo a la confirmación con el ensayo funcional con linfocitos T se pueden aplicar criterios presuntivos en base a 3 estados de maduración de la CD definidos por la expresión de la molécula HLA II, moléculas co estimuladoras y la producción de citocinas:

Inmaduro: HLA II^{low}, moléculas co estimuladoras^{neg/low}, IL-12⁻, IL-10⁻, IL-6⁻, TNF α ⁻, IL-1 β ⁺

Semi maduro: HLA II^{high}, moléculas co estimuladoras^{high}, IL-12⁻, IL-10^{+/-}, IL-6⁻, TNF α ⁻, IL-1 β ⁺

Completamente maduro: HLA II^{high}, moléculas co estimuladoras^{high}, IL-12⁺, IL-6⁺, TNF α ⁺, IL-1 β ⁺ [31].

Un inmunofenotipo maduro en la CD puede inducirse *in vitro* con inductores bien conocidos como lo es el lipopolisacárido (LPS), el TNF α y los anticuerpos contra la molécula CD40 (anti CD40). En cambio, si se estimulan con IL-10 adquieren un inmunofenotipo tolerogénico [15].

2.7. Fuentes de células dendríticas humanas.

Las CD humanas se han obtenido de diversas fuentes con el fin de cultivarlas *ex vivo* y así poder estudiarlas. Actualmente no existen líneas celulares de CD humanas, de tal manera que todas provienen de algún sitio anatómico y lo más común es obtenerlas a partir de la diferenciación de monocitos de sangre periférica mediante su cultivo con factores de crecimiento durante 5 días. Otros las obtienen directamente de la piel y en los últimos años a partir de la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) provenientes de médula ósea o de sangre de cordón umbilical (SCU) cultivados con factores de crecimiento durante 14 días.

En comparación con las CPH de la médula ósea adulta de un humano, las CPH de SCU están mayormente enriquecidas en progenitores primitivos pluripotentes con capacidad de repoblación a largo plazo y alta proliferación de células [9].

Las CPH se pueden aislar a partir de leucocitos mediante una selección positiva de células que tienen en su superficie el marcador común CD34, todas ellas pueden ser desde células troncales hasta precursores de algún tipo celular, siendo todas indiferenciadas. Esta propiedad se aprovecha para manipular su diferenciación hacia CD con el uso de factores de crecimiento específicos en condiciones de cultivo estándar [48].

Los primeros reportes en los que se describe la diferenciación de CD humanas *ex vivo* a partir de CPH provenientes de SCU se publicaron en 1992 [12,49], en ambos las CD se obtuvieron del cultivo de CPH CD34+ en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera y como factores de crecimiento GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos) y TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). Posteriormente se realizaron múltiples combinaciones de citocinas hasta que se logró optimizar el rendimiento de CD.

Actualmente se practican las “condiciones estándar” para su obtención basadas en la combinación de 1) factores de acción temprana: SCF (factor de células troncales) y Flt3-L (ligando de la tirosina cinasa de hígado fetal 3) que promueven la expansión de las CPH, y 2) factores de diferenciación: GM-CSF y TNF α para la obtención final de CD [9]. La elección de estos factores de crecimiento requirió de varios años de trabajo y experimentación por grupos de investigación en diferentes partes del mundo, destacan los trabajos realizados por Canque, Rosenzweig, Banchereau y Gluckman [9,12]. El control de todos los factores del sistema de diferenciación de CD es importante para lograr un alto rendimiento de CD. Los factores principales son dos:

1) El rendimiento de células CD34+ aisladas, el cual se expresa en porcentaje, debe ser mayor al 80%. Un rendimiento bajo de estas células representa un impedimento para los estudios funcionales porque se obtendrían a su vez bajas cantidades de CD diferenciadas [9].

2) El uso de dosis y combinaciones óptimas de los factores de crecimiento. Los factores de crecimiento de acción temprana SCF y Flt3-L deben ser usados en una concentración mínima de 50 ng/mL, a la cual las células CD34+ se expanden eficientemente. A esta concentración no se interfiere en su diferenciación posterior o su función. El GM-CSF potencia la diferenciación y sobrevivencia de las CD por lo que cuando se usan concentraciones sub óptimas (< 20 ng/mL) las CD sufren apoptosis alrededor del día 10-12 de la diferenciación. Por lo anterior se ha estandarizado su uso en concentraciones que van desde 20 hasta 50 ng/mL [9].

3. Justificación.

Trabajos previos han documentado que las CD de ratón presentan un fenotipo inmaduro al ser estimuladas con *M. avium*, el cual se conserva inalterable por la pos o pre estimulación con *M. bovis* BCG. Sin embargo al ser éste un modelo murino, es de importancia realizar el estudio en CD humanas con ésta y otras MNT. El tipo de respuesta inmune producida en las CD diferenciadas a partir de CPH ayudará a definir a ciertas especies de MNT como inductoras de un fenotipo maduro o inmaduro en la CD humana, sugiriendo su participación como atenuantes de la respuesta inmune.

4. Hipótesis.

Las CD humanas diferenciadas a partir de CPH de SCU presentarán un fenotipo inmaduro-tolerogénico al ser estimuladas con *M. avium* y con *M. scrofulaceum* y un fenotipo maduro al ser estimuladas con *M. smegmatis*.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo general.

Determinar el fenotipo (expresión de moléculas de superficie y citocinas) en CD humanas expuestas a diferentes MNT: *M. avium*, *M. scrofulaceum* y *M. smegmatis*.

5.2. Objetivos particulares

Generar CD humanas a partir de la proliferación y diferenciación de CPH de SCU *ex vivo*.

Estimular a las CD con tres especies de MNT: *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis* y también con *M. bovis* BCG.

Evaluar el perfil de citocinas y expresión de moléculas de superficie de las CD estimuladas con MNT 24 horas post estimulación.

6. Material y métodos.

6.1 Obtención de sangre de cordón umbilical.

La SCU se obtuvo de mujeres clínicamente sanas que cumplían con los criterios de inclusión de nuestro estudio al momento del parto (anexo 1). Por punción de la vena del cordón se recolectó la sangre en una bolsa estéril sellada de plástico que contenía anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato y dextrosa), a partir de la cual se hizo la selección positiva de CPH para su posterior diferenciación hacia células dendríticas.

6.2 Obtención de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+).

Se realizó la separación de células mononucleares (CMN) de sangre total por gradiente de densidad con Ficoll. A partir de estas CMN se hizo la selección positiva de CPH CD34+ mediante su separación con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti CD34 (Midi MACS de Miltenyi Biotec).

6.3 Diferenciación hacia células dendríticas.

Las CPH se contaron y cultivaron en una relación apropiada de 100000 células/200 μ L de medio alfa MEM adicionado con factores de crecimiento para su proliferación SCF 50ng/mL, Flt3-L 50ng/mL y para su diferenciación GM-CSF 20ng/mL, en condiciones estándar de 37°C y 5% de CO₂, con 1% de antibióticos Estreptomicina/Amfotericina y 10% de suero fetal bovino durante 14 días, con un cambio de medio a los 7 días.

La estandarización de las concentraciones de los factores de crecimiento, así como el tiempo necesario para la diferenciación de las CPH de SCU son factores fundamentales para la obtención de CD. Con base en las concentraciones reportadas de SCF, Flt3-L y GM-CSF se procedió a usar 50 ng/mL para los dos primeros y 20 ng/mL para el tercero. Con estas concentraciones se diferenciaron durante 7 y 14 días las células CD34+ y se probaron 3 distintas combinaciones de los factores de crecimiento: 1) SCF y GM-CSF, 2) SCF y Flt3-L y 3) SCF, Flt3-L y GM-CSF.

6.4 Micobacterias.

Mycobacterium avium subespecie *hominisuis*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium smegmatis* aisladas de agua de los canales de Xochimilco de la Ciudad de México, México fueron así identificadas por análisis del polimorfismo de los genes *hsp65*, *rpoB* y *16S RNAr* [9].

Las micobacterias se cultivaron en medio de cultivo líquido Sauton hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.6 (fase de crecimiento exponencial) bajo agitación de 150 rpm a 37°C. Las bacterias se cosecharon y se centrifugaron a 5000 x g a 4°C durante 15 min. El paquete bacteriano se sometió a 3 lavados con solución salina amortiguadora de fosfatos

(PBS pH 7.4, 0.01 M) y se resuspendió en la misma solución con glicerol al 10% distribuyéndolo en alícuotas de 1 mL, las cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso.

La viabilidad y las unidades formadoras de colonia (UFC) de BCG Phipps y MNT se realizaron por plaqueo de diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} en medio Middelbrook 7H10 (DIFCO Laboratories, Detroit MI, USA) suplementado con ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa ([OADC] Becton Dickinson, Ireland). Las placas se incubaron a 37°C . La cuenta de colonias se realizó el día 7 para *M. smegmatis* (de crecimiento rápido) y el día 21 para *M. scrofulaceum*, *M. avium* y *M. bovis* BCG (de crecimiento lento) para determinar las UFC/mL.

6.5 Co-cultivo de las células dendríticas con las micobacterias.

El día 14 de cultivo, 100 000 CD inmaduras se estimularon con reactivo PPD, $\text{TNF}\alpha$, *M. bovis* BCG Phipps, *M. avium*, *M. scrofulaceum* o *M. smegmatis* y se incubaron durante 24 hrs a 37°C y 5% de CO_2 . Las células se cosecharon y marcaron con anticuerpos fluorescentes para determinar la expresión de CD40, CD80, CD86, CD273 (PD-L2) por citometría de flujo y en el sobrenadante se buscaron citocinas IL-12, IL-6, IL-1 β , $\text{TNF}\alpha$, IL-10, mediante el uso del kit Milliplex MAP.

Para estandarizar la MOI de micobacterias fueron evaluadas las relaciones 1:1, 1:2 y 1:3 (CD: micobacteria) según la viabilidad y el cambio en la expresión de marcadores de superficie HLA II, CD40, CD80, CD86 y CD273 de las CD estimuladas con las micobacterias,

6.6 Controles.

Como control del experimento se analizaron CD sin estimular, CD estimuladas con reactivo PPD, CD estimuladas con $\text{TNF}\alpha$ y CD estimuladas con *M. bovis* BCG.

6.7 Citometría de flujo.

Las CD cultivadas y estimuladas o no se cosecharon y se trasladaron de cada pozo de cultivo a eppendorf y se centrifugaron a 1500 rpm, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para la posterior determinación de las citocinas. El pellet celular se bloqueó con solución PBS 1X al 2% de suero fetal bovino (10^8 células/mL) durante 20 minutos. Al término del bloqueo las CD se resuspendieron en la mezcla de anticuerpos en solución de PBS 1X e incubaron durante 30 min a 4°C . Todos los anticuerpos fueron utilizados en una dilución 1:10. Fueron utilizadas dos mezclas o cocktails de anticuerpos: 1) HLA II-FITC, CD86-PE, CD11c-APC y 2) CD80-FITC, CD273-PE, CD40-PECy5, CD11c-APC. Las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se evaluaron por citometría de flujo.

6.8 Determinación de la secreción de citocinas.

Se realizó mediante el uso del kit Mlliplex MAP el cual utiliza perlas magnéticas acopladas a dos fluorocromos en diferentes combinaciones para la detección de diferentes citocinas al mismo tiempo en una muestra y una molécula fluorescente reportera estreptavidina-ficoeritrina PE.

7. Análisis estadístico.

Se determinó el promedio de 2 repeticiones de cada experimento por duplicado.

8. Resultados.

Apartado I. Selección positiva de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+).

Se obtuvieron de 50-60 mL de SCU y a partir de ésta 14.1×10^7 CMN por el método de Ficoll (carbohidrato de alto peso molecular). A partir de estas CMN y mediante selección positiva se obtuvieron CPH por medio de su marcador común de superficie CD34. La pureza de esta selección fue de 96.7%, la cual debe ser mayor al 80% [7].

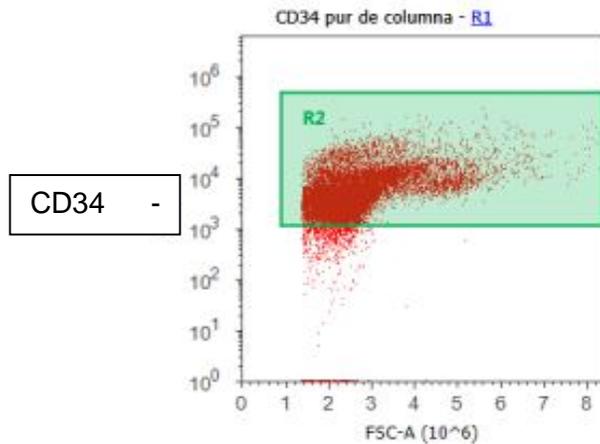


Figura 1. Selección positiva de CPH (R2) mediante columnas y perlas magnéticas con anticuerpos anti CD34 en su superficie. Para su análisis se realizó una tinción citométrica con anticuerpos anti CD34 marcados con PE. La pureza obtenida fue de 96.7%

Apartado II. Elección de las concentraciones de los factores de crecimiento y el tiempo de diferenciación.

El tiempo óptimo para la obtención de CD a partir de CPH fue de 14 días en cultivo con los tres factores de crecimiento SCF, Flt3-L y GM-CSF.

La elección de las dos condiciones anteriores se basó en el análisis por citometría de flujo midiendo el porcentaje de células del cultivo que se habían diferenciado a CD identificadas como tales por la presencia del marcador CD11c.

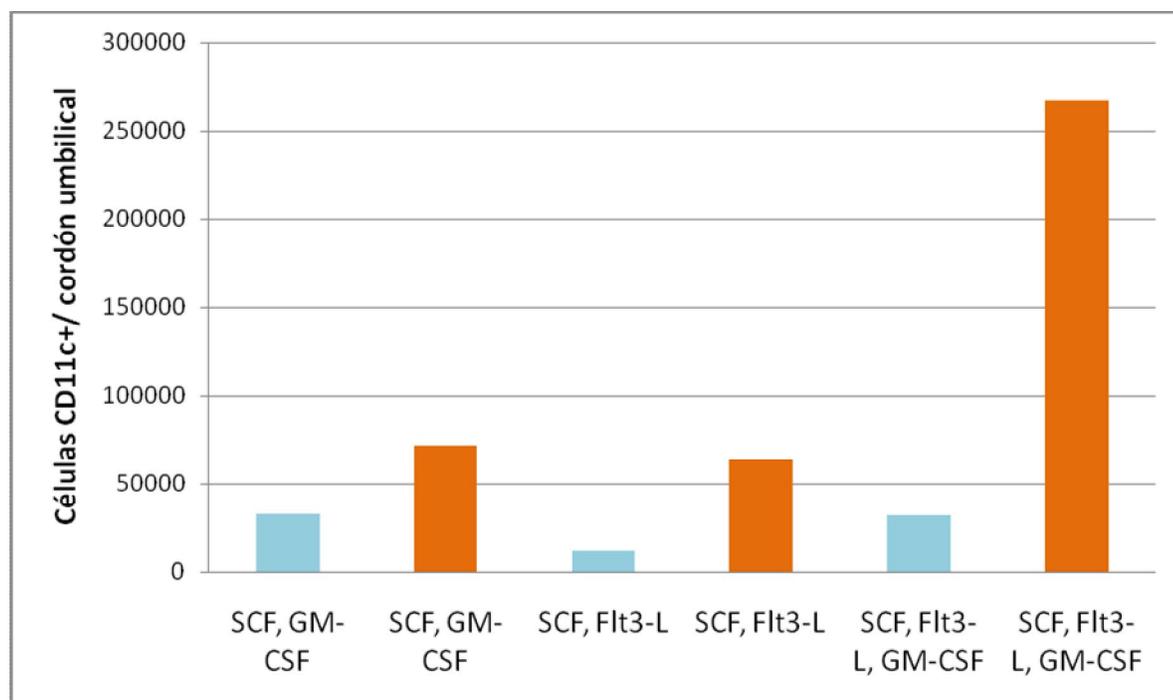


Figura 2. Diferenciación de CD durante 7 días (barras en azul) y 14 días (barras en naranja) con 3 diferentes combinaciones de factores de crecimiento en cultivo: 1) SCF y GM-CSF, 2) SCF y Flt3-L y 3) SCF, Flt3-L y GM-CSF. Se evaluó la producción de CD por el porcentaje de éstas en el total del cultivo, identificándolas por su marcador de superficie CD11c.

En promedio la SCU rindió 3×10^5 CD11c por cada 2×10^4 células CD34 diferenciadas en cultivo durante 14 días con los tres factores de crecimiento, con lo cual se logró una expansión de los progenitores hematopoyéticos de 15 veces. Según el reporte de Canque del 2003 se obtiene una expansión de hasta 50 veces con los factores aquí utilizados más $\text{TNF-}\alpha$ [9]. Por cada cordón umbilical procesado las cantidades obtenidas fueron 81×10^5 CD CD11c+ (72%) tras el cultivo de 55×10^4 CPH obtenidas a su vez a partir de 14.1×10^7 CMN provenientes de SCU. Estas cantidades son un promedio de los cordones de 8 neonatos.

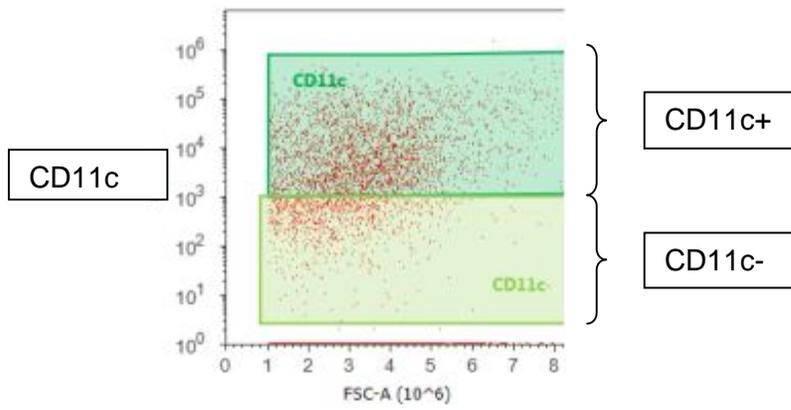


Figura 3. Células dendríticas CD11c+ obtenidas por diferenciación de CPH de SCU. El rendimiento al final de la diferenciación fue del 72% de células CD11c+ después de 14 días bajo condiciones estándar de cultivo y con factores de proliferación SCF (50ng/mL), Flt3-L (50ng/mL) y de diferenciación GM-CSF 20 (ng/mL). Se evaluaron un total de 30 000 eventos.

Apartado III. MOI de micobacterias.

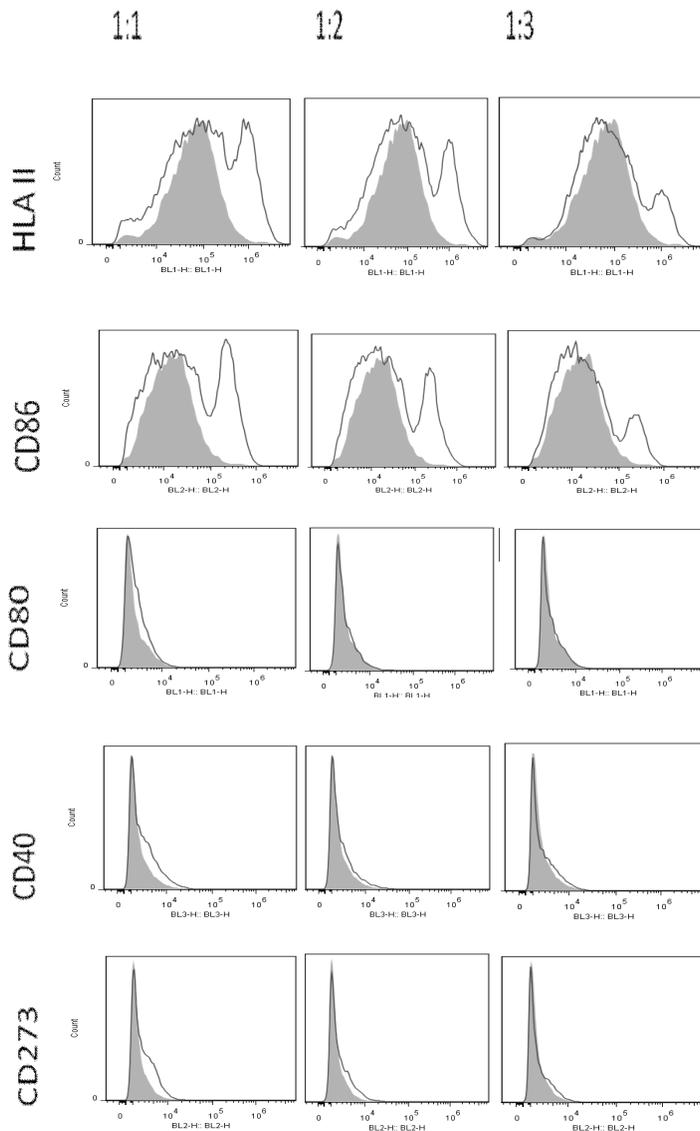


Figura 5. Expresión de marcadores de superficie en CD humanas diferenciadas a partir de CPH de SCU durante 14 días con un cocktail de factores de crecimiento *ex vivo* y su posterior estimulación con *M. bovis* BCG en diferentes relaciones: 1:1, 1:2 y 1:3 durante 24 horas. Se analiza la intensidad de fluorescencia mediante histogramas y su desplazamiento comparando la expresión del marcador de superficie celular de las células estimuladas (línea) y las células sin estimular (sólido).

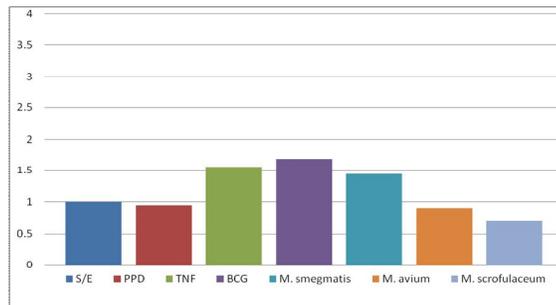
Apartado IV. Células dendríticas y micobacterias.

ESTIMULACIÓN DE CD OBTENIDAS A PARTIR DE CPH DE SCU CON MNT.

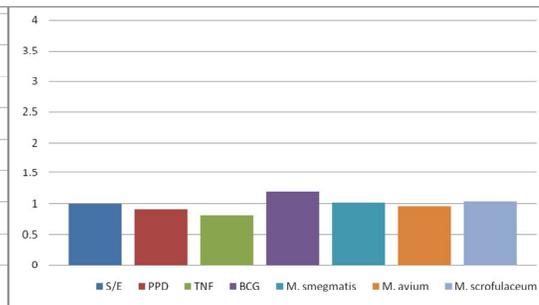
a) Expresión de moléculas de superficie.

Los resultados muestran la expresión de moléculas de superficie de manera diferencial dependiente de la especie de micobacteria con la que se estimula.

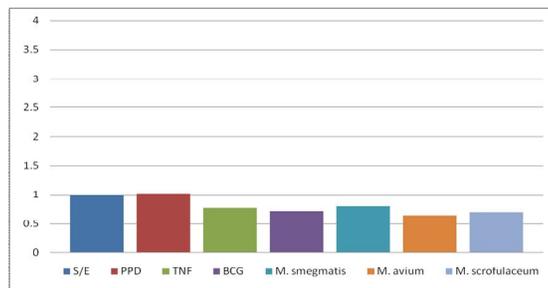
Expresión de HLA



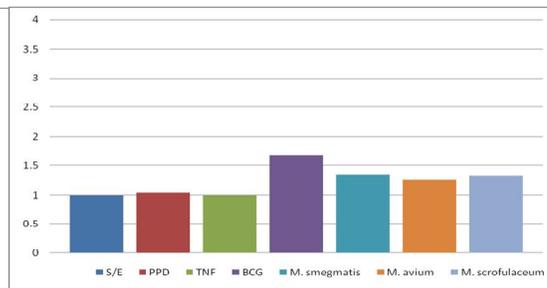
Expresión de CD40



Expresión de CD80



Expresión de CD86



Expresión de CD273

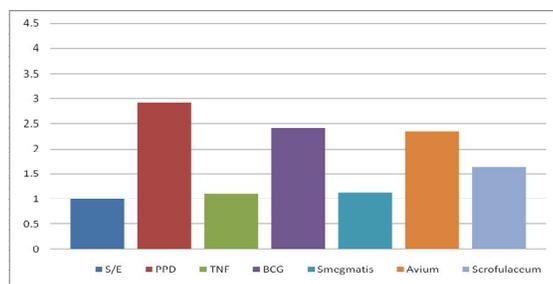


Figura 6. Expresión de marcadores de superficie en CD humanas diferenciadas a partir de CPH de SCU durante 14 días con un cocktail de factores de crecimiento *ex vivo* y su posterior estimulación con PPD (4 UT/mL), TNF α (40 ng/mL), *M. bovis* BCG, *M. smegmatis*, *M. avium* y *M. scrofulaceum* (1:1) durante 24 horas. La expresión de cada marcador está representada en el eje de las Y como número de veces de expresión con respecto al control (células dendríticas sin estimular =1). Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes a partir de la SCU de dos neonatos.

Los resultados anteriores también pueden ser analizados por medio de la comparación de histogramas como se muestra a continuación.

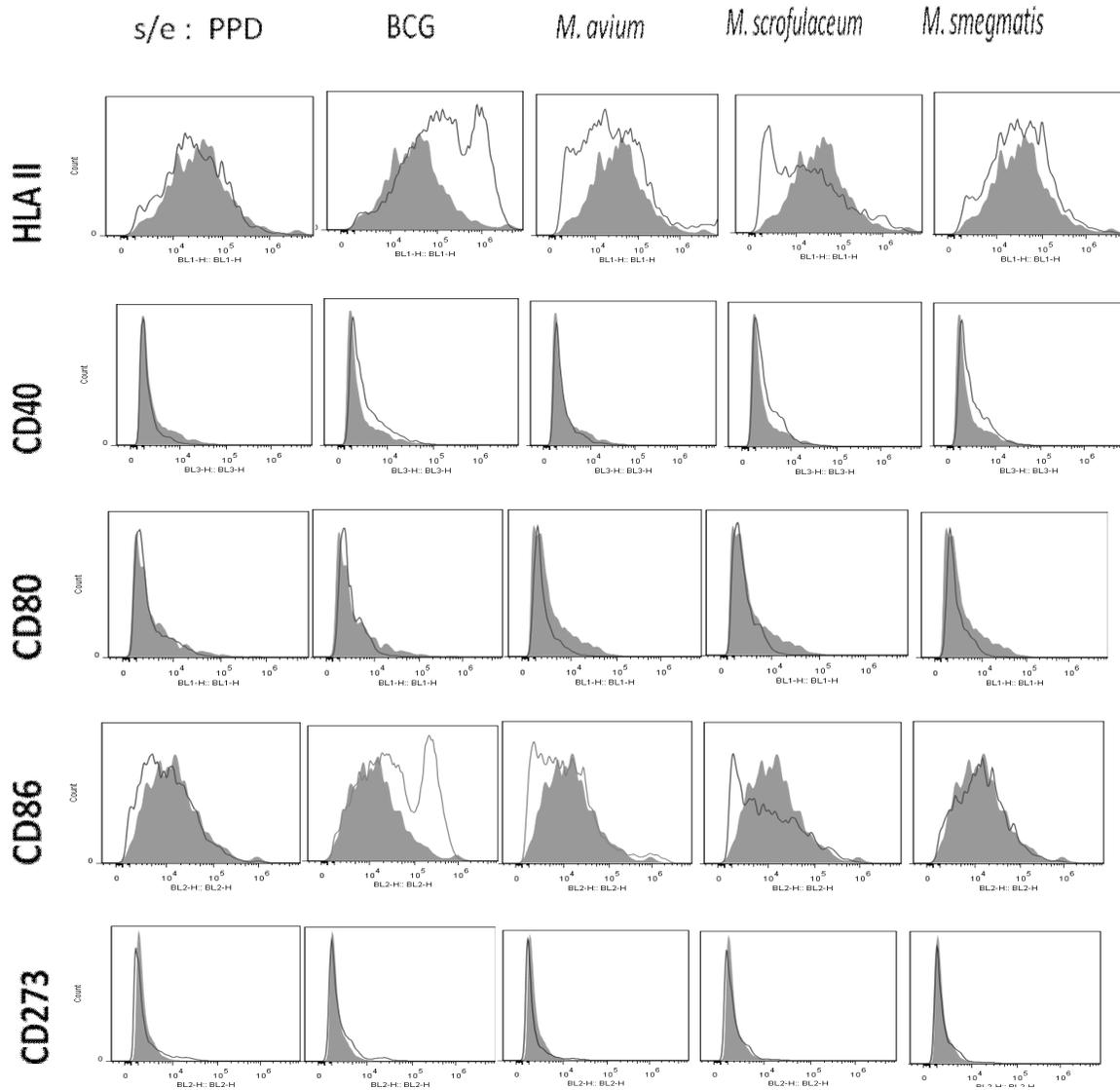


Figura 7. Expresión de marcadores de superficie en CD humanas diferenciadas a partir de CPH de SCU durante 14 días con un cocktail de factores de crecimiento *ex vivo* y su posterior estimulación con PPD (0.25 UT/mL), *M. bovis* BCG, *M. avium*, *M. scrofulaceum* y *M. smegmatis* (1:1) durante 24 horas. Se analiza la intensidad de fluorescencia mediante histogramas y su desplazamiento comparando la expresión del marcador de superficie de las células estimuladas (línea) y las células sin estimular (sólido).

b) Citocinas.

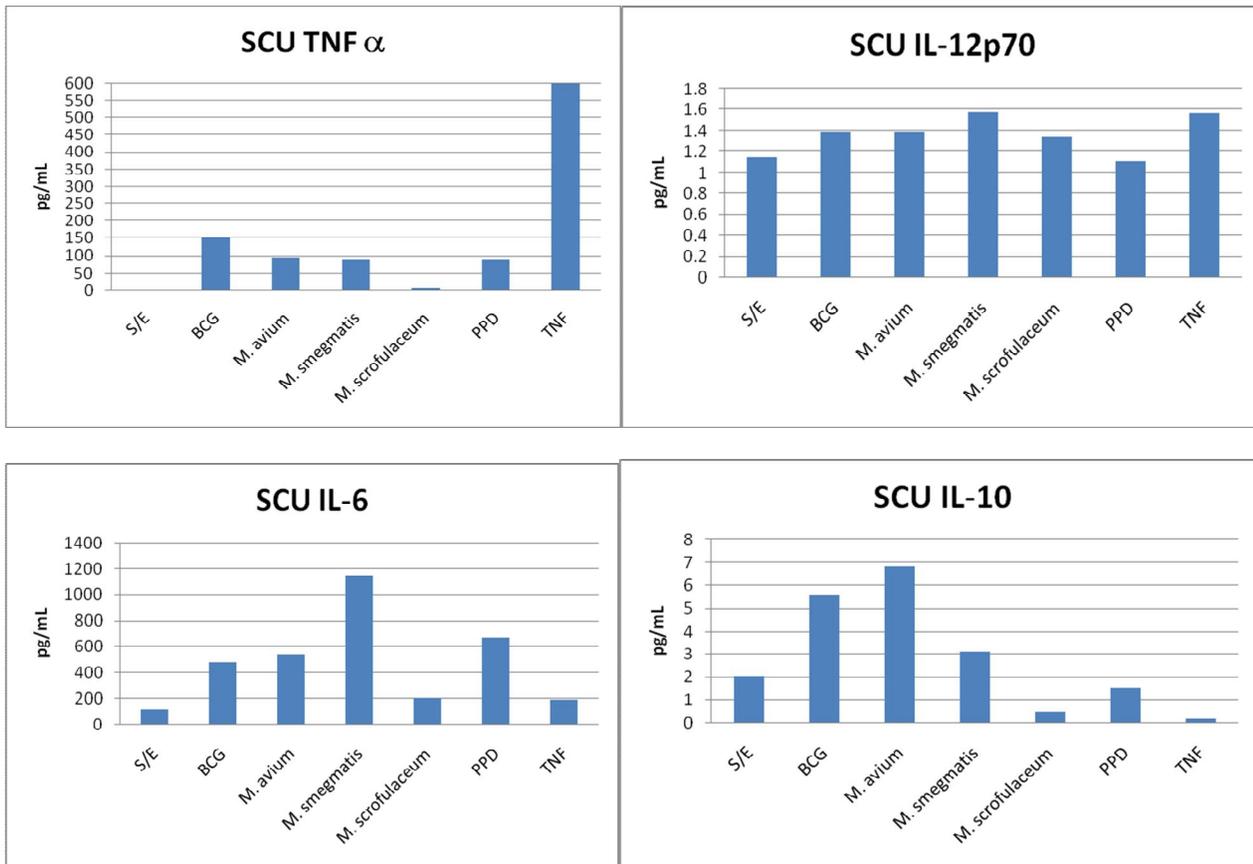


Figura 8. Producción de citocinas por CD humanas diferenciadas a partir de CPH de SCU durante 14 días con un cocktail de factores de crecimiento *ex vivo* y su posterior estimulación con PPD (4 UT/mL), TNF α (40 ng/mL), *M. bovis* BCG, *M. avium*, *M. scrofulaceum* y *M. smegmatis* (1:1) durante 24 horas. Se mide la cantidad de proteína producida en pg/mL en el sobrenadante de las CD estimuladas y se compara con el de las CD sin estimular.

Debido a que las CD obtenidas mediante el cultivo de CPH de SCU proveniente de un neonato son diferentes a las CD obtenidas de monocitos de sangre periférica provenientes de un adulto en cuanto a que las primeras provienen de células más primitivas, aunque no obstante expresen los mismos receptores TLR-2, TLR-4 y CD14 [37] se analizó también el fenotipo de las segundas después de ser estimuladas con las micobacterias.

ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍCICAS OBTENIDAS A PARTIR DE MONOCITOS CON MICROBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.

a) Expresión de moléculas de superficie.

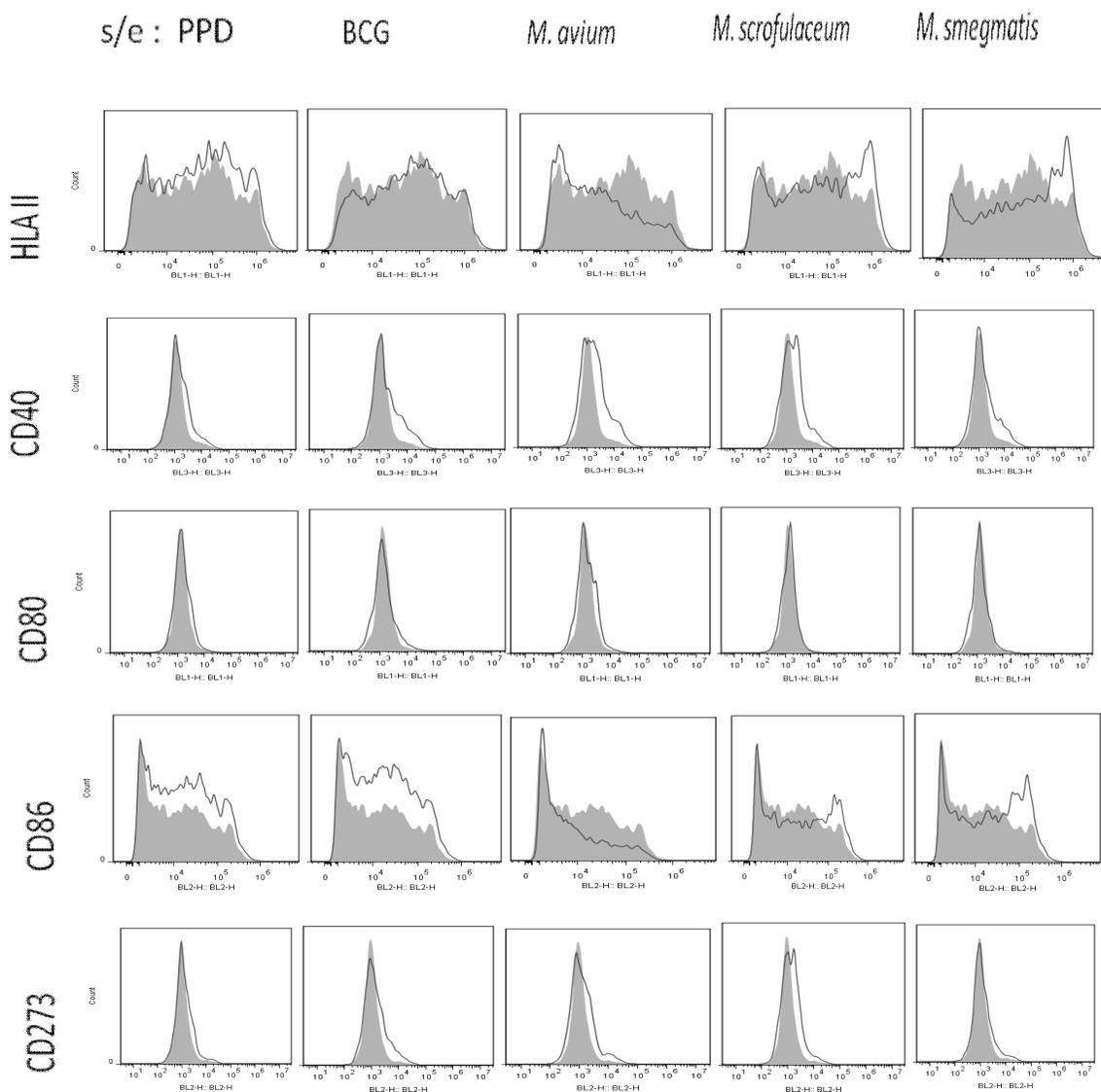


Figura 9. Expresión de marcadores de superficie en CD humanas diferenciadas a partir de monocitos de adulto durante 5 días con un cocktail de factores de crecimiento *ex vivo* y su posterior estimulación con PPD (0.25 UT/mL), *M. bovis* BCG, *M. avium*, *M. scrofulaceum* y *M. smegmatis* (1:1) durante 24 horas. Se analiza la intensidad de fluorescencia mediante histogramas y su desplazamiento comparando la expresión del marcador de superficie de las células estimuladas (línea) con respecto a las células sin estimular (sólido).

b) Citocinas.

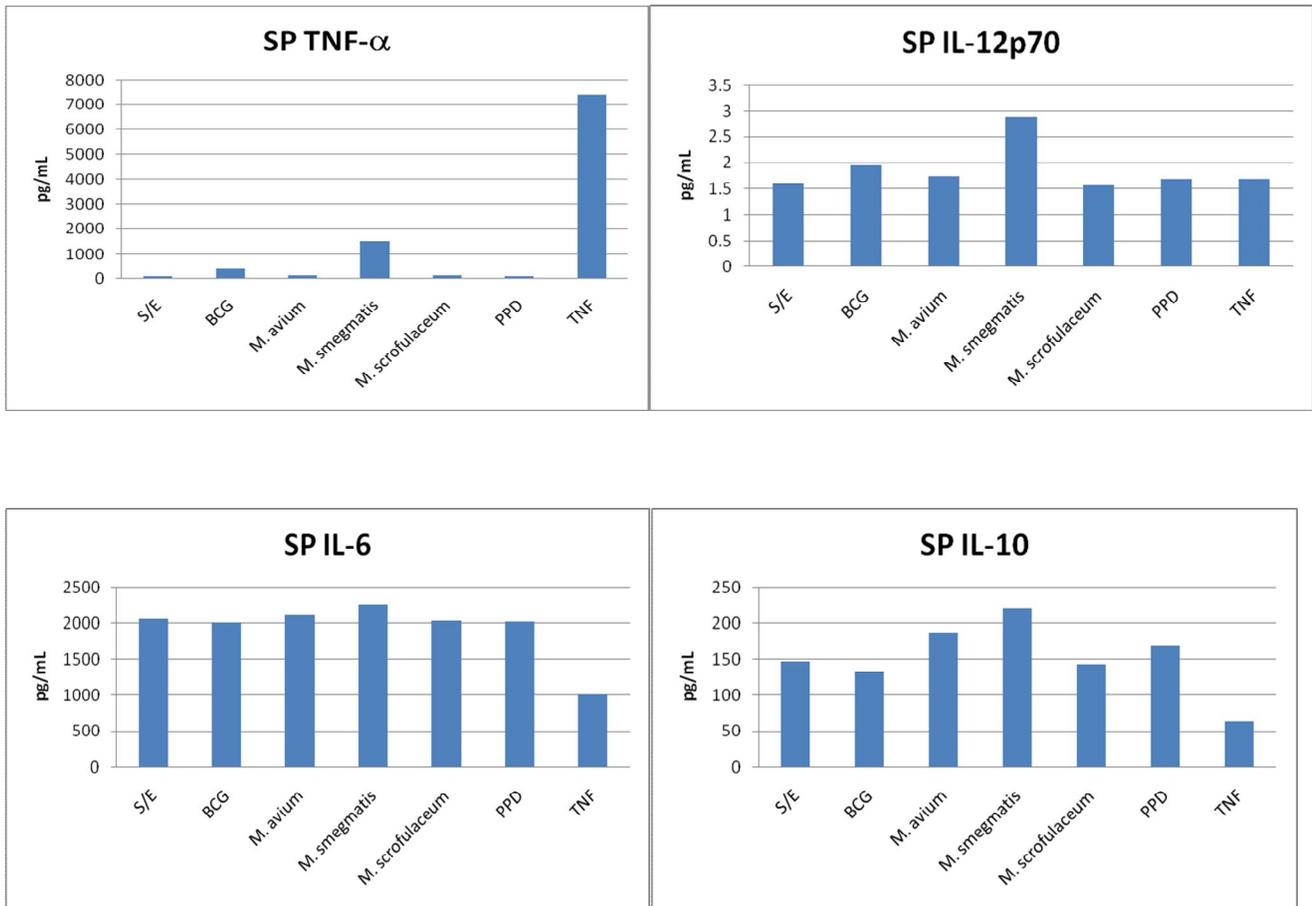


Figura 10. Producción de citocinas por CD humanas diferenciadas a partir de monocitos de adulto durante 5 días con un cocktail de factores de crecimiento *ex vivo* y su posterior estimulación con PPD (0.25 UT/mL), TNF α (40 ng/mL) *M. bovis* BCG, *M. avium*, *M. scrofulaceum* y *M. smegmatis* (1:1) durante 24 horas. Se mide la cantidad de proteína producida en pg/mL mediante su cuantificación en el sobrenadante de las CD estimuladas comparando con el de las CD sin estimular.

9. Discusión.

El estado de activación de la CD se define por la cantidad de expresión de moléculas de superficie y de citocinas, es decir su fenotipo y éste fue diferente con cada estímulo.

Las CD estimuladas con BCG tienen una sobre expresión de la molécula presentadora de antígeno HLA II, esto quiere decir que la CD tiene la capacidad de presentar al linfocito T CD4 los antígenos de la micobacteria, sin embargo para una activación eficiente de los linfocitos T la CD debe de co estimularlo con moléculas accesorias que presenta en su superficie una vez que se activó por el reconocimiento del antígeno a través de sus receptores, las cuales reciben el nombre de moléculas co estimuladoras, que en este caso son CD80 y CD86. El hecho de no observar cambios en la expresión de CD80 podría corresponder a que las CD no expresan esta molécula de manera constitutiva y cuando se estimula su expresión puede tardar en aparecer en la superficie de estas células desde horas hasta días dependiendo del tipo de estímulo, en cambio para CD86 que se expresa de manera constitutiva se observa una sobre expresión, lo cual indica que las CD pueden co estimular a los linfocitos T a través del reconocimiento de esta molécula por CD28. Sin embargo la CD no sólo puede activar al linfocito T sino que puede llevarlo hacia la tolerancia y para ello expresa en su superficie moléculas de co inhibición como CD273 conocida también como PDL-2 la cual específicamente inhibe la activación del linfocito T, en este caso las CD sobre expresan más del doble de esta molécula, lo cual muestra que aunque pueda existir una buena presentación de antígeno por parte de HLA II y una buena co estimulación por parte de CD86 son células que en contacto con linfocitos T estarían contrarrestando su activación. Como se mencionó en los antecedentes el estado de maduración de una CD se define por la sobre expresión de moléculas co estimuladoras y/o co inhibidoras y de citocinas pro inflamatorias y/o anti inflamatorias por lo que se realizó un estudio con todas ellas, así la citocina TNF α se encontró sobre expresada, ésta al ser reconocida por otras células activa factores de transcripción como NF $\kappa\beta$ y AP-1 que promueven la expresión de citocinas pro inflamatorias, quimiocinas y moléculas co estimuladoras. Además, la IL-12p70 también se encontró sobre expresada, aunque ligeramente, lo cual indica que al contacto con linfocitos T CD4 la respuesta puede polarizarse hacia TH1 y en consecuencia habrá linfocitos T productores de IFN γ necesario para la actividad microbicida de los fagocitos contra patógenos intracelulares como lo son las micobacterias. La citocina generadora de inflamación local y sistémica IL-6 está sobre expresada, específicamente estaría estimulando la producción de neutrófilos en médula ósea. Sin embargo, la citocina anti inflamatoria IL-10 también se sobre expresa e inhibe la producción de IL-12, moléculas co estimuladoras y HLA II.

De manera general, las CD estimuladas con BCG presentan sobre expresión de moléculas co estimuladoras y citocinas pro inflamatorias lo cual significa una eficiente presentación de antígeno con activación de linfocitos TCD4, sin embargo no sólo están sobre expresando moléculas de co estimulación sino también de co inhibición y en el ambiente de citocinas no

solamente se encuentran las pro inflamatorias sino también la anti inflamatoria IL-10. Este fenotipo estaría definiendo a una CD semi madura – tolerogénica que puede activar a linfocitos T CD4 presentándole al antígeno mediante la interacción de sus moléculas HLA II de superficie con el receptor TCR, además puede co estimularlo con su molécula CD86 y promover la diferenciación del linfocito hacia TH1 por IL-12 pero esta actividad se ve contrarrestada por la acción anti inflamatoria de la IL-10 y por la inhibición directa de la activación del linfocito T por parte de PDL-2 cuando une a su receptor en éste y que es PD1.

Por otra parte, si pusiéramos a las CD estimuladas con *M. avium* en contacto con linfocitos TCD4 no presentarían al antígeno ni lo activarían eficientemente debido a que no sobre expresan HLA II ni moléculas co estimuladoras, nuevamente como sucedió con BCG no hay cambios para la expresión de CD80 pero además tampoco para CD86. Por el contrario CD273 está sobre expresada y esto indica la inhibición de la activación del linfocito T por la CD. La sobre expresión de TNF α indicaría que se está promoviendo la expresión de citocinas pro inflamatorias, quimiocinas y moléculas co estimuladoras, sin embargo esto no se ve de manera autócrina pues las moléculas co estimuladoras están disminuidas en las CD. La ligera sobre expresión de IL-12p70 estaría indicando una polarización hacia una respuesta TH1, sin embargo la sobre expresión de IL-10 es notable y la mayor de todos los estímulos, por lo que se tiene una fuerte inhibición de la producción de moléculas co estimuladoras, HLA II e IL-12. Por lo que el fenotipo de las CD estimuladas con *M. avium* se define hacia uno inmaduro: sin sobre expresión de moléculas co estimuladoras, HLA II ni citocinas pro inflamatorias los cuales al estar en contacto con linfocitos TCD4 provocarían anergia en ellos, es decir no podrían activarlos. Este fenotipo se caracteriza por la falta de producción de moléculas co estimuladoras en la CD para poder activar al linfocito T y procesos de inhibición sumados por la presencia de CD273 y de IL-10.

La ausencia de sobre expresión de moléculas de superficie como HLA II, co estimuladoras y la co inhibidora en las CD estimuladas con *M. scrofulaceum* denota un pobre reconocimiento de esta micobacteria o quizá sea necesario un mayor periodo de tiempo de estimulación para observar cambios. La producción de citocinas está disminuida y en ninguna se observó sobre expresión. En este caso y durante las primeras 24 horas de estimulación el fenotipo observado para las CD es uno de tipo inmaduro en el cual la CD no cambia su expresión y probablemente induciría anergia en linfocitos T CD4.

M. smegmatis logró madurar a la CD como se observa en su perfil de moléculas de superficie y citocinas, en este caso la CD sobre expresó HLA II y ligeramente CD86, además CD273 no se sobre expresó por lo que la presentación de antígeno acompañado por la co estimulación de moléculas accesorias augurarían una eficiente activación del linfocito T. La presencia de TNF α que está sobre expresada promueve la expresión de citocinas pro inflamatorias, quimiocinas y moléculas co estimuladoras, además de la apoptosis que se ha definido como el proceso de muerte celular que mejora la respuesta inmune al proporcionar antígenos en cuerpos apoptóticos disponibles para que otras células puedan tomarlos y llevar a cabo la

presentación. Aunado a esto, el estímulo con *M. smegmatis* fue el que produjo la mayor cantidad de IL-12p70 e IL-6, IL-12 polariza la respuesta inmune hacia TH1 y favorece la producción de IFN γ por los linfocitos, IL-6 promueve la inflamación local y sistémica. IL-10 se mantuvo en niveles bajos por lo que no hubo quien contrarrestara los efectos inflamatorios y de co estimulación para activación y polarización hacia TH1 del linfocito T, por lo que presuntivamente en un co cultivo de estas CD con linfocitos TCD4 naive éstos se activarían para ser efectores y productores de citocinas que definirían un perfil TH1.

Por lo anterior, el fenotipo observado para las CD estimuladas con *M. smegmatis* es uno tendiente a maduro pero no podemos decir tajantemente que sea maduro debido a que la expresión de moléculas co estimuladoras no fue tan grande y no hubo sobre expresión de CD80, quizá en un mayor lapso de tiempo se observen mayores diferencias.

En estos resultados se observa la diferencia de expresión de moléculas de superficie y citocinas entre las CD estimuladas con *M. smegmatis* y *M. avium*, ambas presentan diferencias en cuanto a la composición de su pared celular, *M. smegmatis* tiene fosfomioinositol lipoarabinomanana y se especula que es el responsable de la actividad pro inflamatoria en la CD que genera apoptosis y expresión de IL-12, mientras que de las patógenas como es el caso de *M. avium* se ha encontrado manosil lipoarabinomanana (Bohsali, 2010).

De esta manera se observan diferentes perfiles de expresión de moléculas de superficie y citocinas en la CD dependientes del estímulo que recibieron y que permiten comenzar a definir el estado de maduración de la CD pero definitivamente éste debería comprobarse con cada uno de los estímulos estudiándolas en un co cultivo con linfocitos TCD4 ya que sería la prueba de fuego al comprobar su activación o no.

Sin embargo, estos cambios son discretos lo que pudiera deberse a la presencia de sub poblaciones de CD [52] que están respondiendo cada una de manera diferente ante el estímulo y que al evaluarlas en conjunto no permiten observar diferencias marcadas.

En estos resultados el PPD no induce sobre expresión de ninguna molécula co estimuladora, se mantiene sin cambio, sin embargo sí induce la sobre expresión de casi el triple de la molécula co inhibidora CD273. PPD es un derivado proteico purificado de un extracto de cultivo de bacilos tuberculosos que al administrarse vía intradérmica puede provocar una reacción inflamatoria local que indica la infección con alguna micobacteria como prueba de la sensibilización previa hacia antígenos miobacterianos que son compartidos entre *M. tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas y *M. bovis* BCG [32], sin embargo no es capaz de sensibilizar por sí misma. Además, trabajos previos indican que no son suficientes los preparados antigénicos de micobacterias para activar una respuesta inmune primaria sino que es necesaria la micobacteria viva. En los resultados del presente trabajo la ausencia de cambio en la expresión de moléculas co estimuladoras y de HLA II en las CD estimuladas

con PPD podría ser indicio de que no es suficiente con las proteínas de la micobacteria para activar a la CD, sino que se requiere a la micobacteria viva, al menos en un primer estímulo.

10. Conclusiones.

Las CPH de SCU se expanden y se diferencian *ex vivo* en condiciones de cultivo con factores de crecimiento SCF, Flt3-L y GM-CSF durante 14 días.

Las CD diferenciadas a partir de estos progenitores y estimuladas con las MNT presentaron un fenotipo diferente según el tipo de estímulo, siendo evidente la presencia de un fenotipo inmaduro a semi maduro en las CD estimuladas con *M. avium*, uno de tipo inmaduro para las CD estimuladas con *M. scrofulaceum* y uno tendiente a maduro para las CD estimuladas con *M. smegmatis*.

La capacidad de respuesta de las CD obtenidas a partir de la diferenciación de CPH de SCU es diferente a la de las obtenidas de la diferenciación de monocitos de sangre periférica. Sin embargo, en cualquiera de los dos casos *M. avium* induce fenotipo inmaduro a semi-maduro en las CD después de 24 horas de estímulo.

11.- Perspectivas.

Cuantificar a CD83 en la superficie de las CD.

Reproducir un mayor número de veces los experimentos realizados.

Realizar el co cultivo con linfocitos TCD4 y evaluar proliferación, IFN γ e IL-10.

Identificar sub poblaciones de CD.

Separar cada una de las sub poblaciones por selección negativa.

Realizar el estímulo de cada una de las sub poblaciones con cada una de las micobacterias.

Realizar el co cultivo de cada una de las subpoblaciones de CD con linfocitos TCD4 y evaluar proliferación, IFN γ e IL-10.

Referencias.

- 1.- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. Inmunología celular y molecular. Editorial Elsevier. 2011.
- 2.- Al-Kassimi, F.A., M. S. Al-Hajjaj, I. O. Al-Orainey, and E. A. Bamgboye. Does the protective effect of neonatal BCG correlate with vaccine induced tuberculin reaction? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 1575-1578. 1995.
- 3.- Angelo Martino. Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. *J. Biosci.* 33: 137-144. 2008.
- 4.- Arend SM, Cerda DP, de Haas P et al. Pneumonia caused by *Mycobacterium kansasii* in a series of patients without recognised immune defect. *Clin Microbiol Infect*; 10: 738-748. 2004.
- 5.- Banchereau J, RM Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*; 19: 245-252. 1998.
- 6.- Barbara A. Brown-Elliott, Richard J. Wallace. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*; 15: 716-746. 2002.
- 7.- Blanchard DK, Mc Millen S, Hoffman SL, Djeu JY. Mycobacterial induction of activated killer cells: posible role of tyrosine kinase activity in interleukin-2 receptor alpha expresion. *Infect immunology*; 60: 2843-2849. 1992.
- 8.- Brown BA, Springer B, Steingrube VA et al. *Mycobacterium wolinsky* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov. rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. Syst. Bacterial.* 1999.
- 9.- Canque B, Rosenz wajg M, Gluckman JC. In vitro generation dendritic cells from cord blood CD34 hematopoietic progenitor cells. *Methods Mol Biol*; 215:311-25. 2003.
- 10.- Castillo-Rodal AI, Castanon-Arreola M, Hernandez-Pando R, Calva JJ, Sada-Diaz E, Lopez-Vidal Y. Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*; 74:1718-24. 2006.
- 11.- Castillo-Rodal AI, Mazari-Hiriart M, Lloret-Sánchez LT, Sachman-Ruiz B, Vinuesa P, López-Vidal Y. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31:683-694. 2012.
- 12.- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*; 360: 258-26. 1992

- 13.- Claudio Piersimoni and Claudio Scarparo. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerging infectious diseases*; 15: 1351-1358. 2009.
- 14.- Colditz, G. A., C. S. Berkey, F. Mosteller, T. F. Brewer, M. E. Wilson, E. Burdick, and H. V. Fineberg. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta analyses of the published literature. *Pediatrics*; 96: 29-35. 1995.
- 15.- Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol*; 166: 4312-4318. 2001.
- 16.- DeGroot MA, Pace NR, Fulton K, Falkinham JO. Relationships between Mycobacterium isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soil. *Appl. Environ. Microbiol*; 72:7602-6. 2006.
- 17.- Elizabeth Mendoza-Coronel, Rosa Camacho Sandoval, Laura C. Bonifaz, Yolanda López-Vidal. PD-L2 induction on dendritic cells exposed to *Mycobacterium avium* downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis*; 91: 36-46. 2010.
- 18.- E. Tortoli. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin. Microbiol. Infect*; 15: 906-910. 2009.
- 19.- Enrico Tortoli. Impact of genotypic studies in mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev*; 16: 319-354. 2003.
- 20.- Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol*; 9:177-215. 1996.
- 21.- Falkinham JO. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can J Infect Dis*; 14: 281-286. 2003.
- 22.- Fine, P. E. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev. Infect. Dis*; 11: 353-359. 1989.
- 23.- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol*; 19: 93-129. 2001.
- 24.- Giacobini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia E M. Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J. Immunol*; 166: 7033-7041. 2001.
- 25.- Greene JB, Sidhu GS, Leasin S et al. *Mycobacterium avium-intracellulare*: a cause of disseminated life threatening infection in homosexuals and drug abusers. *Ann. Intern. Med*; 97: 539-546. 1982.
- 26.- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Rouss S, von Reyn CF, Wallace RJ Jr, Winthrop K. An official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J Respir Crit Care Med*; 175:367-416. 2007.

- 27.- Hazra R, Robson CD, Perez-Atayde AR et al. Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy. Clin. Infect. Dis; 28:123-129. 1999.
- 28.- Henriques B, Hoffner SE, Petrini B et al. Infection with *Mycobacterium malmoense* in Sweden. Report of 221 cases, Clin Infect Dis; 18:596-600. 1994. 29.- Hiroyuki Saiga, Yosuke Shimada, Kiyoshi Takeda. Innate immune effectors in mycobacterial infection. Clinical and developmental immunology; 2011: 347-594. 2011.
- 30.- Inaba K, Witmer M. D., Steinman R. M. Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes and histocompatible B cells, during primary antibody responses *in vitro*. J. Exp. Med; 160:858-876. 1984.
- 31.- Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM. The *Mycobacterium avium* complex. Clin. Microbiol. Rev; 6:266-310. 1993.
- 32.- Jacques Banchereau, Ralph M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. Nature; 392: 245-252. 1998.
- 33.- Jean Francois Arrighi, Conrad Hauser, Bernard Chapuis, Rudolf H. Zubler, Vincent Kindler. Long-term culture of human CD34⁺ progenitors with FLT3-Ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34⁻CD14⁻ and a CD34⁻ CD14⁺ dendritic cell precursor. American society of hematology; 93: 2244-2252. 1999.
- 34.- Jenkins PA, Campbell IA. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium xenopi* in HIV-negative patients: five year follow-up of patients receiving standardized treatment. Respir Med; 97: 439-444. 2003.35.- Kemper CA, Bermudez LEM. The *Mycobacterium avium* complex. Clin. Microbiol Rev; 266-310. 1993.
- 36.- Kusner DJ. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. Clin. Immunol; 114: 239-247. 2005.
- 37.- Laura Drohan, James J. Harding, Bari Holm, Eileen Cordoba-Tongson, Cornelia L. Dekker, Tyson Holmes, Holden Maecker, Elizabeth D. Mellins. Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets. Human immunology; 65:1356-1369. 2004.
- 38.- Lise Brandt, Joana Feino Cunha, Anja Weinreich Olsen, Ben Chilima, Penny Hirsch, Rui Appelberg, Peter Andersen. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. Infection and immunity; 70: 672-678. 2002.
- 39.- Ludovic Tailleux, Olivier Neyrolles, Stéphanie Honoré-Bouakline, Emmanuelle Perret, Françoise Sánchez, Jean-Pierre Abastado, Philippe Henri Lagrange, Jean Claude Gluckman, Michelle Rosenzweig, Jean-Louis Herrmann. Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. The journal of immunology; 170:1939-1948. 2003.
- 40.- Manfred B. Lutz, Gerold Schuler. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends in immunology; 23: 445-449. 2002.

- 41.- Manual de vacunas. Sociedad venezolana de puericultura y pediatría. Editorial médica panamericana. 44-46. 2008.
- 42.- María del Mar Casal, Manuel Casal. Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. *Enf. Emerg.* 2(4): 220-230. 2000.
- 43.- Martino A, Sacchi A, Volpe E, Agrati C, De Santis R, Pucillo LP, Colizzi V, Vendetti. Non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis* induces the differentiation of human monocytes directly into fully mature dendritic cells. *J. Clin. Immunol*; 25: 365-375. 2005
- 44.- Miceli, I., I. N. de Kantor, D. Colaiacovo, G. Peluffo, I. Cutillo, R. Gorra, R. Botta, S. Hom, H. G. ten Dam. Evaluation of the effectiveness of BCG vaccination using the case-control method in Buenos Aires, Argentina. *Int. J. Epidemiol*; 17: 629-634. 1988.
- 45.- Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J. Immunol*; 166: 7477-7485. 2001.
- 46.- Pechere M, Opravil M, Wald A et al. Clinical and epidemiological features of infection with *Mycobacterium genavense*. *Arch. Intern. Med*; 155: 400-404. 1995.
- 47.- Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int. F. Epidemiol*; 22:1154-1158. 1993.
- 48.- Rossana Pelayo, Jesús Santa-Olalla, Iván Velasco. Células troncales y medicina regenerativa. PUIS UNAM. 2011.
- 49.- Santiago Schwarz, F., Belilos, E., Diamond, B., and Carsons, S.E. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J. Leuk. Biol*; 52:274-281.1992.
- 50.- Saubolle MA, Kiehn TE, White MH et al. *Mycobacterium haemophilum*: microbiology and expanding clinical and geographic spectra of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev*; 9:435-447. 1996.
- 51.- Semih Esin, Giovanna Batoni, Manuela Pardini, Flavia Favilli, Daria Bottai, Giuseppantonio Maisetta, Walter Florio, Renato Vanacore, Hans Wigzell, Mario Campa Functional characterization of human natural killer cells responding to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin. *Immunology*; 112:143-152. 2004.
- 52.- Shalin H Naik. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunology and cell biology*; 86:439-452. 2008.
- 53.- S P, Chan J and Salgame P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J. Immunol*; 168: 4636-4642. 2002.
- 54.- Steinman R. M., Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med*; 137:1142-1162. 1973.

- 55.- Steinman R. M., Witmer M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of primary mixed leucocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 75:5132-5136. 1978.
- 56.- Rodrigues, I. N. Guedes. Does the efficacy of BCG decline with the time since vaccination? *Int. J. Tuberc. Lung Dis*; 2:200-207. 1998.
- 57.- Timpe A, Runyon EH. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med*; 44:202-209. 1954.
- 58.- Vejlgard TB, Haahr V, Peterslund NA. Atypical mycobacteria. Disseminated infections in patients with hematologic diseases. *Ugeskr Laeg*; 1:5362-5367. 1997.
- 59.- Wolinsky E. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin. Infect. Dis*; 20:954-963. 1995.

ANEXO 1.

Criterios de selección de las mujeres embarazadas para recolección de SCU.

Criterios de Inclusión.

- Contar con el consentimiento informado.
- Embarazo de término (32-42 SDG).
- Sangre venosa de cordón umbilical almacenada en bolsas de ACD (ácido cítrico-citrato-dextrosa), como las utilizadas en banco de sangre.
- Embarazo de bajo riesgo.
- Pacientes mayores de 18 años y menores de 35 años.

Criterios de exclusión.

- Ausencia de consentimiento informado.
- Toda paciente que cuente con antecedente de patología obstétrica:
- Amenaza de aborto
- Placenta previa
- Infecciones durante el embarazo
- Distocia en el trabajo de parto
- Parto prematuro (<32 SDG)
- Fiebre materna (>38 grados)
- Presencia de meconio en líquido amniótico
- Sufrimiento fetal
- Anemia materna (<10.5 g/dl)
- Enfermedad infecciosa transmisible (VIH)

Criterios de eliminación.

- Sangre coagulada.