



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Relación entre la respuesta adaptativa celular de  
linfocitos T cooperadores y el fenotipo de células  
dendríticas en sangre periférica de recién nacidos  
expuestos al VIH no infectados**

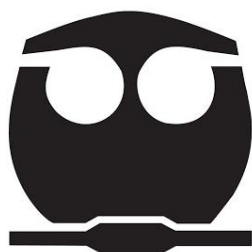
**T E S I S**

**Que para obtener el título de**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**ROCIO GUADALUPE VALERIANO BAENA**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



## **COMITÉ TUTORAL**

**Asesor:** Dr. en C. Ismael Mancilla Herrera, SNI-I. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Departamento de Infectología e Inmunología.

**Asesora técnica:** M. en C. Mextli Yoali Bermejo Haro, Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Departamento de Infectología e Inmunología.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Constantino III Roberto López Macías

**Vocal:** Laura Berrón Ruiz

**Secretario:** Ismael Mancilla Herrera

**Suplente 1:** Gibran Pérez Montesinos

**Suplente 2:** Octavio Castro Escamilla

## **Sitio donde fue desarrollado el tema:**

Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', Departamento de Infectología e Inmunología.

Asesor: Dr. Ismael Mancilla Herrera

---

Asesora Técnica: M. Mextli Yoali Bermejo Haro

---

Sustentante: Rocio Guadalupe Valeriano Baena

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, por el invaluable apoyo para la realización de este proyecto, proporcionando las instalaciones, equipo y financiamiento del proyecto “Caracterización de la respuesta humoral y celular adaptativa en infantes expuestos no infectados (ENI) de madres VIH+” (Protocolo No. 2019-1-31).

## DEDICATORIAS

## RESUMEN

Gracias a los cuidados perinatales y a la terapia antirretroviral en mujeres embarazadas infectadas por el VIH, se ha reducido la transmisión vertical. Si bien están ausentes de la infección por el virus, la tasa de morbimortalidad de infantes expuestos al VIH no infectados (ENI) durante su primer año de vida es mayor a la de infantes no expuestos al VIH no infectados (NENI), cuya causa principal son las enfermedades infecciosas. Lo anterior, se ha asociado a alteraciones en los componentes del sistema inmunológico neonatal ENI. Previamente, reportamos reducidos porcentajes de linfocitos Th diferenciados en sangre periférica. No obstante, se desconoce si las células dendríticas mieloides (mDC), plasmacitoides (pDC) y el ambiente sérico de citocinas, también pudieran estar afectados. El objetivo de este trabajo fue evaluar si los porcentajes de linfocitos Th, mDC, pDC, su fenotipo de activación y la concentración de citocinas plasmáticas, están relacionados entre sí en recién nacidos ENI y si difieren de los neonatos NENI. Para ello, determinamos los fenotipos celulares mediante paneles multiparamétricos por citometría de flujo, y cuantificamos la concentración de citocinas a través de inmunoensayos en sangre de 15 recién nacidos ENI y 4 neonatos NENI. Encontramos que las mDC y pDC del grupo ENI, poseen una tendencia de mayor porcentaje y expresión de CD80; por otro lado, el porcentaje de células Th1, Th1/Th17 y Treg tiende a ser menor, mientras que el de linfocitos Th17 y Th2 tiende a ser mayor en comparación con recién nacidos NENI. Además, apreciamos una tendencia de mayor concentración de IL-6, IL-12p70, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-33, IFN- $\alpha$ 2 e IFN- $\gamma$  en neonatos ENI, en cambio, la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18 y TNF- $\alpha$  tiende a ser menor respecto al grupo control. También, reportamos que la expresión de CD80 y CD86 en mDC y pDC se relaciona positivamente con la concentración de las citocinas cuantificadas, pero negativamente con linfocitos Th1, Th1/Th17, Th2 y Th17; interesantemente, la expresión de CD86 en mDC correlaciona directamente con células Treg en recién nacidos ENI. Estos hallazgos son opuestos a los observados en la población NENI, lo que nos sugiere que las CD de los neonatos ENI promueven un ambiente preferentemente inmunomodulador sobre respuestas efectoras, generando un desequilibrio inmunológico que podría explicar la mayor vulnerabilidad de estos recién nacidos a enfermedades infecciosas durante su primer año de vida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Abacavir
BIC	Bictegravir
CD	Célula dendrítica
CPA	Célula presentadora de antígeno
CpG ODN	Oligodesoxinucleótidos CpG
DGT	Dolutegravir
DRV	Darunavir
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFV	Efavirenz
ENI	Expuesto al VIH no infectado
FSC-A	<i>Forward scatter area</i> (Área de dispersión frontal)
FSC-H	<i>Forward scatter height</i> (Altura de dispersión frontal)
FTC	Emtricitabina
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
LPS	Lipopolisacárido
MCP-I	Proteína quimiotáctica de monocitos I (por sus siglas en inglés)
mDC	Célula dendrítica mielóide (por sus siglas en inglés)
MHC-I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (por sus siglas en inglés)
MHC-II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (por sus siglas en inglés)
NENI	No expuesto al VIH no infectado
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno (por sus siglas en inglés)
PCA	Análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés)



pDC	Célula dendrítica plasmacitoide (por sus siglas en inglés)
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón (por sus siglas en inglés)
RAL	Raltegravir
SDG	Semanas de gestación
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SSC-A	<i>Side scatter area</i> (Área de dispersión lateral)
TCR	Receptor de célula T (por sus siglas en inglés)
TDF	Tenofovir
TLR	Receptor de tipo Toll (por sus siglas en inglés)
TNF	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
3TC	Lamivudina

<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	V
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	VI
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	X
<b>LISTA DE FIGURAS COMPLEMENTARIAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABLAS COMPLEMENTARIAS</b> .....	XI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 VIH en el contexto actual y sus repercusiones en la edad reproductiva</b> .....	1
<b>1.2 Infantes expuestos al VIH no infectados (ENI)</b> .....	3
<b>1.2.1 Mortalidad y morbilidad en infantes ENI</b> .....	3
<b>1.3. Alteraciones en el sistema inmunológico reportadas en los infantes ENI</b> ....	4
<b>1.3.1. Afectaciones en las respuestas innatas</b> .....	6
<b>1.3.2. Afectaciones en las respuestas adaptativas humorales y celulares</b> .....	8
<b>1.4 Células dendríticas y diferenciación de linfocitos T CD4+</b> .....	12
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	18
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>5.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>5.2. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	18
<b>6. MATERIAL Y METODOS</b> .....	19
<b>7. RESULTADOS</b> .....	28
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	43
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	51
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	52
<b>11. MATERIAL COMPLEMENTARIO</b> .....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Muertes relacionadas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) a nivel mundial de 2000 a 2020 y objetivos para 2020-2025	<b>1</b>
Figura 2	Nuevas infecciones verticales del VIH por causa de transmisión a nivel mundial en 2020	<b>2</b>
Figura 3	Esquema de las condiciones inmunológicas observadas en madres VIH positivo y recién nacidos ENI	<b>5</b>
Figura 4	Aspectos maternos y su impacto en la salud de los recién nacidos e infantes ENI	<b>6</b>
Figura 5	Impacto de la condición materna por el VIH, terapia antirretroviral e inflamación en los porcentajes de linfocitos Th diferenciados de su progenie	<b>12</b>
Figura 6	Activación de célula T CD4+ virgen	<b>14</b>
Figura 7	Diferenciación de linfocitos Th0	<b>15</b>
Figura 8	Esquema general de trabajo	<b>19</b>
Figura 9	Algoritmo de análisis para la identificación de células dendríticas mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC) en recién nacidos ENI y NENI	<b>23</b>
Figura 10	Algoritmo de análisis para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores en recién nacidos ENI y NENI	<b>25</b>
Figura 11	Porcentaje de células dendríticas y su expresión relativa de CD80 y CD86 en recién nacidos ENI y NENI	<b>30</b>
Figura 12	Porcentaje de linfocitos T diferenciados y linfocitos Th0 en recién nacidos ENI y NENI	<b>32</b>
Figura 13	Concentraciones plasmáticas de citocinas en recién nacidos ENI y NENI	<b>33</b>
Figura 14	Correlaciones de Pearson entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos NENI	<b>34</b>

Figura 15	Correlaciones de Pearson entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos ENI	<b>35</b>
Figura 16	Biplot de análisis de componentes principales entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos NENI	<b>36</b>
Figura 17	Biplot de análisis de componentes principales entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos ENI	<b>37</b>
Figura 18	Porcentaje de células dendríticas y su expresión relativa de CD80 y CD86 en recién nacidos e infantes ENI	<b>39</b>
Figura 19	Porcentaje de linfocitos T diferenciados y Th0 en recién nacidos e infantes ENI	<b>40</b>
Figura 20	Concentraciones plasmáticas de citocinas en recién nacidos e infantes ENI	<b>41</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabla 1	Panel de anticuerpos para la identificación de células dendríticas	<b>22</b>
Tabla 2	Panel de anticuerpos para la caracterización de linfocitos Th	<b>22</b>
Tabla 3	Características maternas	<b>29</b>
Tabla 4	Características neonatales	<b>29</b>

## LISTA DE FIGURAS COMPLEMENTARIAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura Complementaria 1	Preparación de curva patrón	<b>61</b>

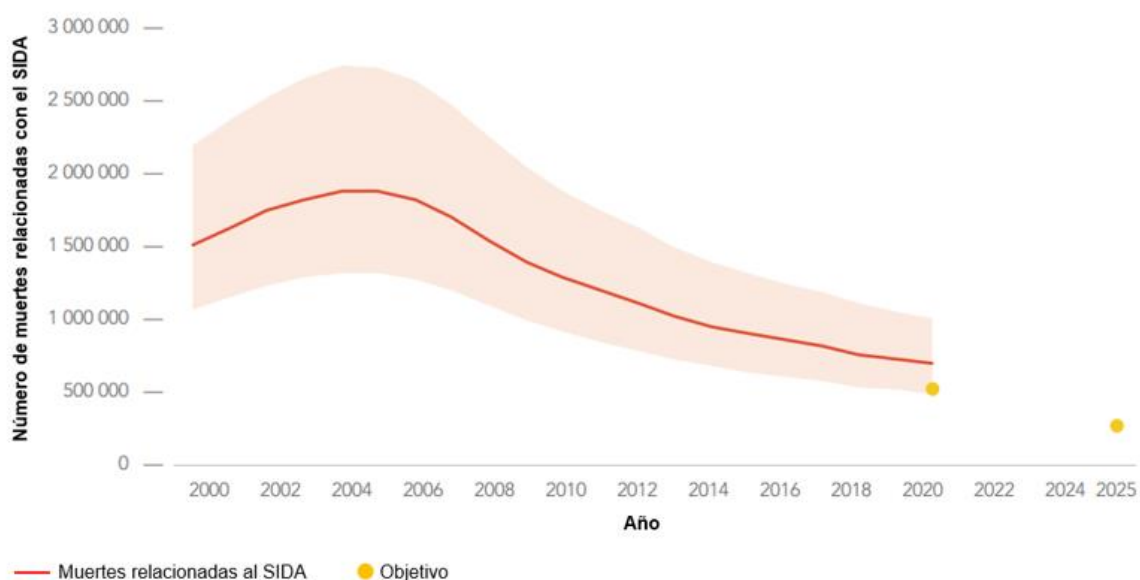
## LISTA DE TABLAS COMPLEMENTARIAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabla Complementaria 1	Características maternas y de los infantes ENI al nacimiento	<b>62</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 VIH en el contexto actual y sus repercusiones en la edad reproductiva

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, pues desde el inicio de la epidemia y hasta la actualidad, se han registrado 40.1 millones de defunciones. Si bien actualmente no existe una cura para esta infección, su cuadro clínico y transmisión pueden controlarse mediante un diagnóstico temprano, tratamiento con antirretrovirales y cultura de prevención. Al respecto, la implementación a nivel global de la terapia antirretroviral ha evitado alrededor de 16.6 millones de muertes por VIH en las últimas dos décadas, disminuyendo la tasa de mortalidad en un 47% desde el 2010 (Figura 1) (UNAIDS, 2021; WHO, 2022).

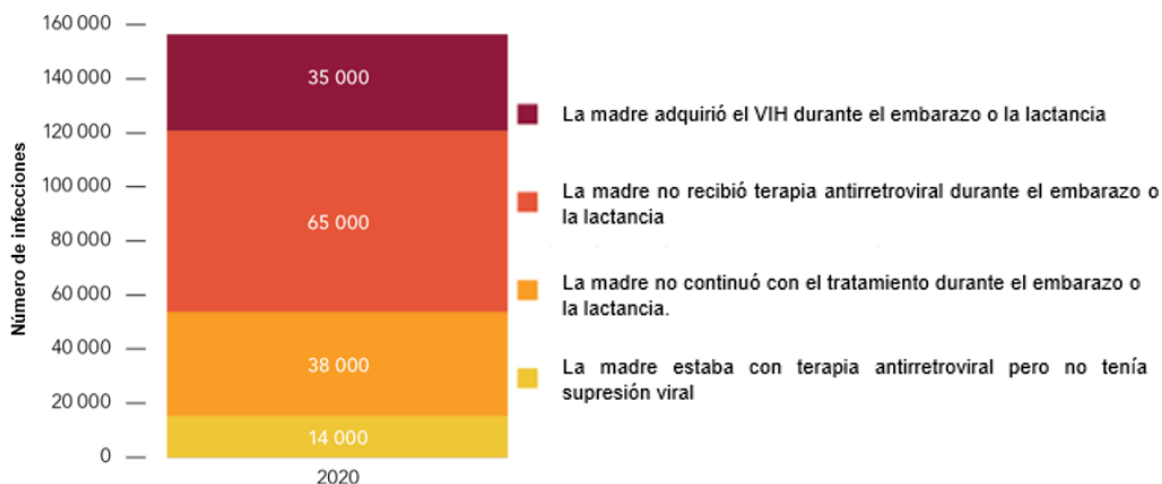


**Figura 1. Muertes relacionadas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) a nivel mundial de 2000 a 2020 y objetivos para 2020-2025.** A partir del 2006, las muertes por VIH en etapa de SIDA han ido disminuyendo, se espera que para 2025 continúe esta tendencia a la baja. Traducido y modificado de (UNAIDS, 2021).

Durante el 2020 el número de personas registradas que vivían con VIH en el mundo fue de 37.7 millones, suscitándose a diario 4000 nuevos casos de infecciones en adultos y niños, de los cuales aproximadamente un 20% correspondía a mujeres jóvenes de entre 15 y 24 años (UNAIDS, 2021). Dado que las mujeres en edad reproductiva representan más de la mitad de los pacientes con VIH, son una población de especial

interés porque son más susceptibles de padecer otras enfermedades de transmisión sexual, por ejemplo: sífilis, herpes, tricomoniasis, clamidia, gonorrea y candidiasis, así como anomalías en su ciclo menstrual (Sharma, Marfatia, & Modi, 2009). Adicionalmente, en mujeres embarazadas infectadas por el VIH, aumenta el riesgo de transmisión del virus a su descendencia, aborto, mortinato, parto prematuro y bajo peso al nacer de la prole (Abdi, Alimoradi, & Alidost, 2019).

En 2020, La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó a nivel global que alrededor del 85% de las 1.3 millones de mujeres embarazadas infectadas por el VIH, recibieron terapia antirretroviral para prevenir y eliminar la transmisión materno-infantil del virus, además de mejorar la calidad de vida de las pacientes y su descendencia (WHO, 2021). Gracias al aumento en la cobertura de esta terapia, se logró reducir el número de infecciones por VIH en recién nacidos e infantes en un 54% durante el periodo comprendido entre 2010 y 2020 (UNAIDS, 2021). Sin embargo, las cifras de infecciones por VIH en infantes continúan siendo alarmantes, a consecuencia de un control aún deficiente de la infección materna y su transmisión (Figura 2).



**Figura 2. Nuevas infecciones verticales del VIH por causa de transmisión a nivel mundial en 2020.** Anualmente, se reportan nuevos casos de infecciones pediátricas por VIH con base en la causa de transmisión. Traducido y modificado de (UNAIDS, 2021).

El Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA reportó que en México, cerca de 68 000 mujeres de 15 años o más vivían con VIH: de las mujeres embarazadas, aproximadamente el 44.56% de ellas recibieron terapia antirretroviral,

dando como resultado a 26 000 infantes expuestos al VIH no infectados (ENI) en el año 2021 (UNAIDS, 2022).

## **1.2 Infantes expuestos al VIH no infectados (ENI)**

Una de las principales problemáticas que conlleva la infección por VIH, es la transmisión vertical del virus (de madre a hijo), la cual puede ocurrir durante el embarazo (*in útero*), el parto o posterior al nacimiento (predominantemente por la lactancia). La infección por VIH en la infancia posee un elevado riesgo de mortalidad, con una supervivencia neta del 52% al año si se infecta por vía perinatal o del 78% si se adquiere a través de la lactancia (Mellqvist, Saggars, Elfvin, Hentz, & Ballot, 2021).

Dicha transmisión puede prevenirse gracias a los cuidados perinatales y a la terapia antirretroviral que recibe la madre y el neonato de manera profiláctica: la OMS, indica que la terapia proporcionada debe constar de una combinación de dosis fija de tenofovir, lamivudina o emtricitabina y efavirenz e iniciarse al menos 12 semanas antes del trabajo de parto; por otro lado, el neonato expuesto al VIH recibirá profilaxis con nevirapina inmediatamente después del nacimiento (Mellqvist et al., 2021; WHO, 2021). Con lo anterior, se ha logrado reducir el número de infecciones por VIH en recién nacidos e infantes en un 54% del 2010 al 2020 (UNAIDS, 2021), por lo que las infecciones evitadas dan como resultado una población creciente de infantes ENI, de quienes en diversos estudios se ha reportado que poseen mayores índices de morbilidad y mortalidad en comparación con infantes no expuestos al VIH no infectados (NENI), entre cuyas causas se encuentran la exposición al VIH y a la terapia antirretroviral, la falta de lactancia materna, así como diversos factores ambientales y socioeconómicos (Mellqvist et al., 2021; Slogrove, Goetghebuer, Cotton, Singer, & Bettinger, 2016)

### **1.2.1 Mortalidad y morbilidad en infantes ENI**

La exposición al VIH se ha relacionado con partos prematuros y bajo peso al nacer, por lo que un diagnóstico temprano de la infección en las madres y su progenie es de vital importancia para mejorar las intervenciones de tratamiento y prevención, pues se ha documentado que la máxima mortalidad en neonatos se da entre las seis semanas y los cuatro meses posteriores al nacimiento (Mellqvist et al., 2021; UNAIDS, 2021).



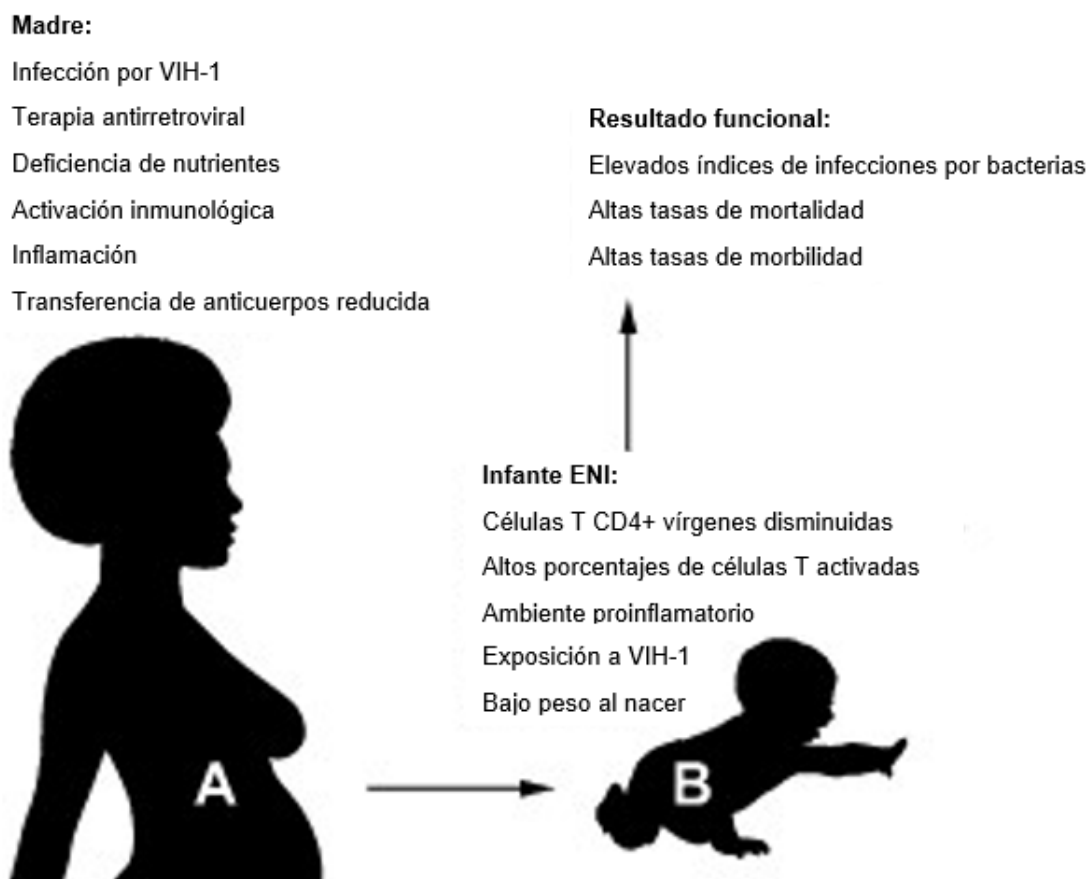
Uno de los primeros trabajos en evaluar y comparar la mortalidad y morbilidad de los infantes ENI con respecto a infantes NENI, fue la revisión de Slogrove y colaboradores, en la que destaca una mayor morbimortalidad en recién nacidos e infantes expuestos al VIH no infectados de Sudáfrica debido a: partos prematuros, desnutrición por la ausencia de lactancia materna y mayor exposición a patógenos, proteínas virales y ambiente proinflamatorio (Slogrove et al., 2016). Brennan y colaboradores realizaron un metaanálisis para examinar la tasa de mortalidad por diferentes causas entre infantes expuestos y no expuestos al VIH no infectados, observando un incremento del riesgo de mortalidad en recién nacidos e infantes ENI en comparación con los infantes NENI. Adicionalmente, Arikawa y colaboradores reportaron evidencias de mortalidad en infantes ENI estratificados por edad, cuyas observaciones se llevaron a cabo por dos años obteniendo tasas de mortalidad acumuladas de 2.0%, 3.6%, 5.5% y 11% a los 3, 6, 12 y 24 meses respectivamente (Arikawa, Rollins, Newell, & Becquet, 2016; Brennan et al., 2016).

Al tener reportadas altas tasas de mortalidad y morbilidad en los infantes ENI, durante los últimos años se han realizado más estudios para conocer los efectos de la exposición al VIH en su salud en el transcurso de su primer año de vida. En comparación con neonatos NENI, los infantes ENI son más susceptibles de padecer enfermedades infecciosas como tuberculosis, infecciones gastrointestinales y del tracto respiratorio inferior; cabe resaltar que las neumonías de este grupo vulnerable, suelen ser más graves debido a que sus agentes causales son diversos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pneumocystis jirovecii* y *Aspergillus spp*) y aumentan la probabilidad de hospitalización (Mellqvist et al., 2021). Estas observaciones ponen de manifiesto que los infantes ENI pudieran tener algún desorden inmunológico que incremente la probabilidad de padecer dichas enfermedades infecciosas.

### **1.3. Alteraciones en el sistema inmunológico reportadas en los infantes ENI**

La mayor predisposición de los recién nacidos e infantes ENI a padecer enfermedades infecciosas, se ha atribuido a posibles alteraciones en la funcionalidad de su sistema inmunológico como probable consecuencia de su exposición a la infección materna por VIH y a medicamentos antirretrovirales. En general, se ha observado que la activación

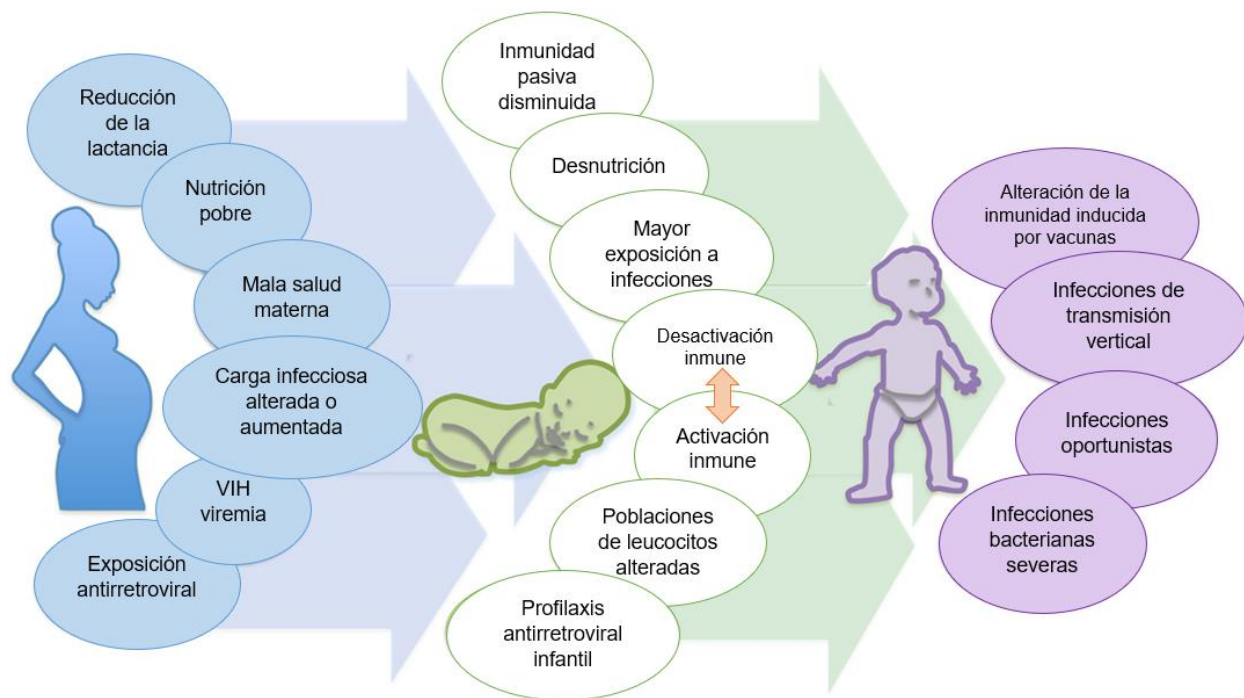
inmunológica crónica a la que está sometida la madre, afecta al sistema inmunológico del neonato: tienen porcentajes bajos de células T CD4+ y CD8+ vírgenes, porcentajes elevados de células dobles negativas (CD4-CD8-, lo que sugiere una función tímica alterada) y niveles bajos de anticuerpos transferidos por la madre al momento del nacimiento (Figura 3) (Afran et al., 2014; Kuhn et al., 2005; Mellqvist et al., 2021).



**Figura 3. Esquema de las condiciones inmunológicas observadas en madres VIH positivo y recién nacidos ENI.** La infección materna por VIH y la exposición a la terapia antirretroviral alteran el ambiente gestacional y, en consecuencia, afectan al sistema inmunológico del infante ENI, aumentando sus tasas de mortalidad y morbilidad. Traducido y modificado de (Afran et al., 2014).

La infección materna por VIH representa un ambiente alterado para el crecimiento y desarrollo fetal, donde el entorno inflamatorio al que está sometido el útero, expone al sistema inmunológico neonatal en desarrollo a antígenos y a un ambiente potencialmente proinflamatorio de mediadores químicos. De igual manera, la microbiota vaginal parece estar afectada en mujeres infectadas por el VIH, lo que podría resultar importante para la colonización de microorganismos en la primera infancia (Abu-Raya,

Kollmann, Marchant, & MacGillivray, 2016). Asimismo, el ambiente materno afectado posee el potencial de preparar y perturbar el desarrollo de las respuestas inmunes innatas y adaptativas neonatales a nivel cualitativo y cuantitativo (Figura 4).



**Figura 4. Aspectos maternos y su impacto en la salud de los recién nacidos e infantes ENI.** El estado de salud materno influye en la composición, estado y respuesta del sistema inmunológico de su progenie, alterando su capacidad de responder a infecciones y vacunas. Traducido y modificado de (C. Ruck, Reikie, Marchant, Kollmann, & Kakkar, 2016).

### 1.3.1. Afectaciones en las respuestas innatas

Las respuestas inmunes innatas son una defensa inicial y esencial en contra de agentes infecciosos en los recién nacidos y a su vez, se encargan de dirigir las respuestas inmunes adaptativas. El sistema inmunológico innato detecta patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) mediante receptores de reconocimiento de patrón (PRR) y de manera clásica, no posee memoria inmunológica. Con base en las respuestas innatas de los infantes ENI y NENI, se han documentado diferencias que, en general, radican en un perfil proinflamatorio en los ENI con cambios en la proporción y perfil de los subconjuntos de células que componen al sistema inmunológico innato. Actualmente, existen pocos estudios que evalúen este tipo de respuestas en infantes ENI: se ha descrito una mayor secreción de TNF, IL-6 e IL-12 por células dendríticas

mieloides (mDC) y monocitos en respuesta a ligandos bacterianos en infantes de Sudáfrica, especialmente a las 2 y 6 semanas de edad (Moncunill et al., 2020).

Bunders y colaboradores estudiaron los recuentos de neutrófilos en infantes ENI y NENI desde el nacimiento y hasta los 20 meses de vida, obteniendo niveles de neutrófilos más bajos en el grupo ENI desde que nacieron en comparación con infantes NENI. Otros estudios asociaron esta disminución de neutrófilos que perdura hasta los 18 meses de edad, con la exposición a terapia antirretroviral (Abu-Raya et al., 2016; Bunders et al., 2005).

Respecto a las células dendríticas, existen principalmente dos subconjuntos denominados células dendríticas mieloides y plasmacitoides (pDC). Si bien existen pocos estudios que describan la frecuencia y función de estas células en recién nacidos e infantes de madres VIH positivo, Velilla y colaboradores informaron que los neonatos ENI poseen un mayor porcentaje de células dendríticas mieloides que los recién nacidos NENI y, en cuanto a las células dendríticas plasmacitoides, ambos grupos de neonatos tienen un porcentaje similar durante su primer año de vida. También, observaron que las mDC del grupo ENI, tienen una mayor capacidad de responder ante la estimulación con lipopolisacárido (LPS) en comparación con bebés NENI. Adicionalmente, Reikie y colaboradores mostraron que una mayor proporción de mDC de infantes ENI, respondió a la estimulación con ligandos bacterianos a través de la secreción de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 hasta la sexta semana de edad y, en semanas posteriores, la respuesta de las mDC fue comparable entre los grupos de neonatos. En estos dos estudios, observaron que las pDC de ENI y NENI respondieron de forma semejante al nacimiento frente a la estimulación con CpG ODN, mientras que la secreción de IFN- $\alpha$  fue similar, indicando una funcionalidad normal de las células dendríticas plasmacitoides. Los hallazgos anteriores, sugieren que la exposición gestacional al VIH incrementa la capacidad de respuesta de las células dendríticas mieloides en recién nacidos ENI, con una tendencia a establecer respuestas proinflamatorias hacia las seis semanas de vida y que se normalizan al año (Abu-Raya et al., 2016; Reikie et al., 2014; Velilla et al., 2008).

Bunders y colaboradores, determinaron que los recuentos de monocitos eran menores en infantes ENI que en el grupo control desde el nacimiento y hasta los 8 meses de edad y, en el estudio de Reikie y colaboradores, apreciaron que los monocitos de los infantes ENI producían respuestas proinflamatorias mediante TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 cuando se enfrentaban a estímulos de tipo PAMP. No obstante, las diferencias en la respuesta del sistema inmunológico innato entre los monocitos de infantes ENI y NENI, desaparecieron al año de vida. Respecto a las células natural killer (NK), hay información muy limitada que describe su cantidad y funcionalidad en ambos grupos de recién nacidos e infantes: en el trabajo de Slyker y colaboradores, reportan que al nacimiento no hay diferencias en el porcentaje de células NK totales entre los ENI y NENI y, en cuanto a la evaluación de su funcionalidad, observaron una disminución en el porcentaje de células NK activadas y positivas a perforina en la población ENI. Lo anterior, sugiere que la baja expresión de perforina podría comprometer la capacidad de los neonatos ENI para responder frente a infecciones virales (Abu-Raya et al., 2016; Bunders et al., 2005; Reikie et al., 2014; Slyker et al., 2012).

Estos hallazgos sugieren alteraciones en la cantidad y función de los diferentes tipos de células que componen al sistema inmunológico innato, por ende, las respuestas inmunes innatas se encuentran perturbadas en recién nacidos e infantes ENI.

### **1.3.2. Afectaciones en las respuestas adaptativas humorales y celulares**

Existen estudios que evidencian diferentes alteraciones tanto en respuestas inmunes humorales como en respuestas mediadas por células en recién nacidos e infantes ENI. Ruck y colaboradores, realizaron una revisión en la que asociaron las enfermedades infecciosas más recurrentes con alteraciones en la respuesta inmune adaptativa en infantes ENI, encontrando que las infecciones ocasionadas por hongos podrían estar relacionadas con la función y número de linfocitos T; las infecciones cuyos agentes causales sean bacterias capsuladas, están vinculadas con deficiencias en la respuesta humoral y las infecciones virales podrían deberse a defectos en la inmunidad mediada por células (C. Ruck et al., 2016).

Acerca de las alteraciones en la respuesta humoral, se ha documentado una reducida transferencia de anticuerpos maternos debido a que los neonatos ENI cursan con

niveles bajos de anticuerpos al nacimiento; además, se han estudiado anormalidades en los niveles de IgG de infantes ENI en comparación con infantes NENI, encontrando niveles más bajos de IgG2 (Afran et al., 2014; Baroncelli et al., 2022). No obstante, el conocimiento sobre la distribución en clases y subclases de anticuerpos y la relación que guardan con las condiciones de salud materna, es limitado. Al respecto, Camacho Pacheco evaluó las concentraciones de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE en muestras de 69 infantes ENI y 71 infantes NENI al nacimiento y durante su primer año de vida, hallando una mayor concentración de IgG1 seguida de IgG3 y una menor concentración de IgG2 en el grupo ENI en comparación con infantes control y, adicionalmente, se asociaron tales alteraciones con el conteo de linfocitos T CD4+ materno y la terapia antirretroviral que recibieron durante el embarazo (Camacho-Pacheco, 2019). Lo anterior, podría estar asociado a la respuesta humoral alterada y disminuida a una amplia gama de vacunas en infantes ENI: proporción de infantes que no respondieron a la vacuna contra la hepatitis B, disminución de anticuerpos neutralizantes de la vacuna contra la poliomielitis y una menor avidéz de anticuerpos junto con reducción de la opsonización de polisacáridos neumocócicos de la vacuna conjugada (Musimbi et al., 2019; Nduati et al., 2016).

Por parte de las alteraciones de la inmunidad mediada por células, se ha reportado que las células B se encuentran afectadas en neonatos ENI, pues se ha visto una proporción más baja de estas células en sangre periférica, mientras que en sangre de cordón umbilical se ha informado un incremento de linfocitos B CD19+CD5+. Además, se ha documentado que la población ENI tiene niveles elevados de apoptosis de linfocitos B en comparación con infantes NENI y a su vez, los niveles de apoptosis se elevan aún más en neonatos nacidos de madres VIH+ que también estuvieron expuestos a terapia antirretroviral (Miyamoto et al., 2010; Musimbi et al., 2019; Nduati et al., 2016)

Por otro lado, las alteraciones más estudiadas en la inmunidad mediada por células de neonatos ENI, corresponden a una disminución en el conteo de células T CD4+ y CD8+ vírgenes y un aumento en el conteo de células T CD4+ y CD8+ de memoria, evento que se ha asociado con la carga viral materna: infantes ENI nacidos de madres con

una carga viral >1000 copias/mL, tenían un menor número de linfocitos T CD4+ en comparación con infantes cuyas madres cursaban con una carga viral <50 copias/mL al momento del parto (Kakkar et al., 2014). Interesantemente, se ha reportado un aumento de células T inmaduras doble negativas (CD4-CD8-), lo que plantea una posible alteración funcional en el timo: un estudio evaluó el tamaño de este órgano en infantes ENI y observaron que se encuentra reducido, lo que probablemente conduciría a una mayor vulnerabilidad frente a infecciones (Afran et al., 2014).

A propósito de las respuestas celulares especializadas, los linfocitos T cooperadores (Th) diferenciados son de suma importancia para establecer respuestas de protección en contra de diferentes patógenos, así también respuestas de tolerancia frente a antígenos ambientales y propios (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012). Diversos trabajos han informado sobre la presencia de linfocitos T de memoria desde el segundo trimestre del embarazo, lo que demuestra que la condición prenatal no es inmunológicamente inmadura del todo (Bunders et al., 2012; Stras et al., 2019), además, las respuestas que se presentan al nacimiento son de tipo Th2 y Treg que cambian poco a poco al perfil Th1, cuyo equilibrio se establece durante los primeros 12 meses de vida (Debock & Flamand, 2014; Park, Jardine, Gottgens, Teichmann, & Haniffa, 2020).

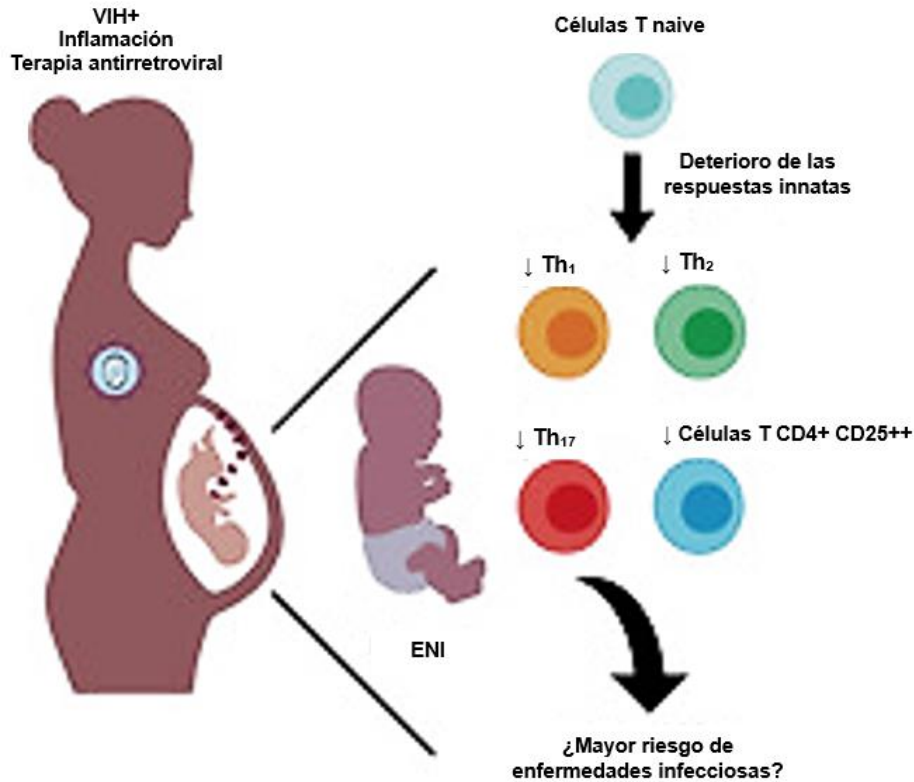
Adicionalmente, los recién nacidos e infantes ENI cursan con alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T diferenciados: Th1, Th2, Th17 y Treg. En 2014, Bunders y colaboradores, evaluaron la expresión de receptores de quimiocinas en células T CD4+ en sangre de cordón umbilical de 10 recién nacidos expuestos al VIH no infectados y 12 recién nacidos no expuestos, encontrando que, en una condición sin estímulo, los linfocitos T CD4+ poseían un fenotipo virgen, pero tras la estimulación con citocinas se presentó una mayor expresión de los receptores de quimiocinas relacionados con una respuesta inflamatoria: principalmente, se expresaron receptores vinculados con linfocitos Th2 tras el estímulo específico con IL-1 $\beta$  en recién nacidos ENI respecto a neonatos NENI, observando también niveles elevados de IL-1 $\beta$  e IL-8 en plasma. En resumen, la mayor expresión de receptores del perfil Th2, el aumento en los niveles de citocinas inflamatorias y la baja expresión de receptores de quimiocinas

de linfocitos Th1, respaldan que la activación inmunológica está potenciada en estos recién nacidos (Bunders et al., 2014).

En 2019, Jalbert y colaboradores estimularon células mononucleares de sangre periférica de infantes ENI y células mononucleares de cordón umbilical de recién nacidos NENI, cuyos resultados mostraron un aumento de células T reguladoras en la población ENI y proponen que este aumento es el causante de la disminución de las respuestas de células T a vacunas e infecciones (Jalbert et al., 2019).

En un estudio realizado por Brito y colaboradores en el grupo de investigación, demostraron que los neonatos ENI tienen una disminución de los fenotipos de células T CD4+ Th1/Th17/Th2 en sangre periférica en comparación con recién nacidos no expuestos al VIH no infectados (Figura 5). También, evaluaron la capacidad intrínseca de los linfocitos T CD4+ para diferenciarse hacia el perfil Th1, encontrando que dicha capacidad no está afectada por la condición de estudio (Brito-Perez et al., 2021). En conjunto, estos resultados sugieren que la capacidad de diferenciación podría estar afectada por las células que favorecen dichos estados, como lo son las células dendríticas.





**Figura 5. Impacto de la condición materna por el VIH, terapia antirretroviral e inflamación en los porcentajes de linfocitos Th diferenciados de su progenie.** Se ha reportado que los infantes ENI, tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades infecciosas como consecuencia de los bajos porcentajes de linfocitos Th. Traducido y modificado de (Brito-Perez et al., 2021).

#### 1.4 Células dendríticas y diferenciación de linfocitos T CD4+

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno (CPA) que desempeñan un papel crucial en la activación, diferenciación y función de células T CD4+, representando el vínculo entre el sistema inmunológico innato y adaptativo (Jain & Pasare, 2017). De este tipo de células se han caracterizado las denominadas células dendríticas mieloides y plasmacitoides, ambas se encuentran en circulación, pero en bajos porcentajes debido a que se distribuyen predominantemente a tejidos como mucosas y órganos linfoides secundarios (Orsini et al., 2012; Schmidt, Nino-Castro, & Schultze, 2012).

Las células dendríticas se presentan en tres estados de maduración: precursores de células dendríticas, CD inmaduras y CD maduras. Los precursores de células dendríticas migran de la médula ósea y circulan a través de la sangre hasta lugares específicos, donde maduran y desempeñan un papel de células centinelas. En ese

sentido, las CD inmaduras cumplen con la función de capturar y procesar antígenos, los cuales son degradados a péptidos que se unirán a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) o clase II (MHC II) (Kadowaki, 2007; Sallusto & Lanzavecchia, 2002; Vázquez, 2012; Ye, Gaugler, Mohty, & Malard, 2020).

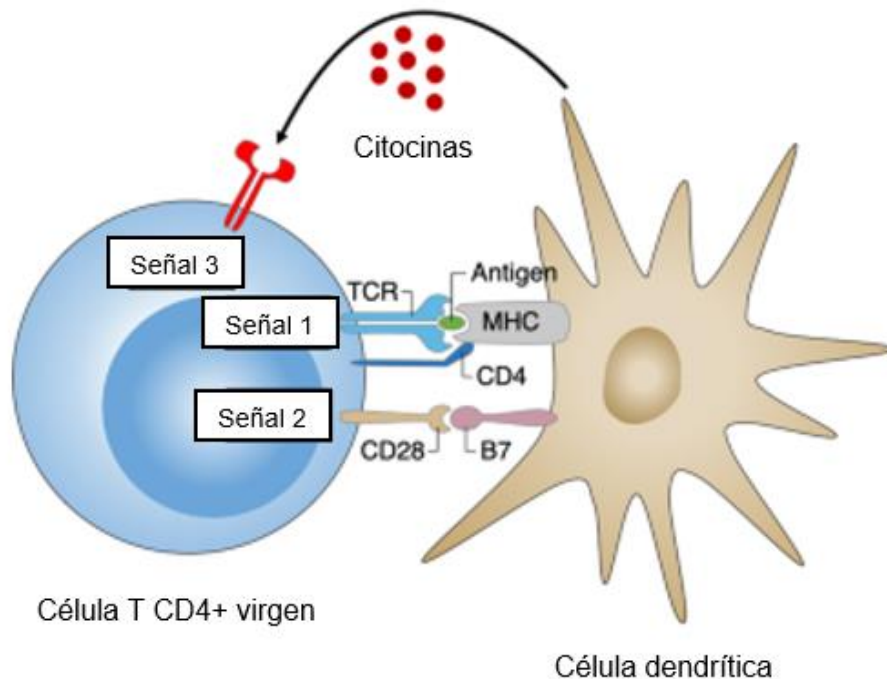
Las células dendríticas maduras son capaces de desplazarse a órganos linfoides secundarios y ayudar en el proceso de activación y diferenciación de linfocitos T CD4+, sin embargo, las mDC y pDC poseen características de expresión y secreción molecular diferentes, por lo que intervienen en la activación de las respuestas adaptativas de forma distinta: por un lado, las células dendríticas mieloides expresan más el MHC II en su superficie celular, así como moléculas de adhesión y de coestimulación (principalmente CD80 y CD86), por ello están más involucradas en la presentación antigénica; por su parte, las células dendríticas plasmacitoides secretan cantidades considerables de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  tras su activación, por ende, están fuertemente comprometidas en las respuestas inmunes en contra de infecciones virales (Schmidt et al., 2012; Ye et al., 2020). Además, ambos subconjuntos de CD participan en el proceso de diferenciación de linfocitos Th0 mediante la secreción de citocinas características de cada subpoblación Th (Hilligan & Ronchese, 2020). Por lo anterior, se asume que las respuestas innatas establecen y controlan las respuestas adaptativas.

Ahora bien, para que las células dendríticas puedan diferenciar a un linfocito T CD4+ virgen en un perfil T efector y determinar la naturaleza de la respuesta adaptativa desencadenante, requieren de varias señales consecutivas (Figura 6):

- a) La primera señal es la presentación del péptido antigénico para la activación del TCR: la célula dendrítica porta en su superficie un complejo péptido-MHC II para activar a linfocitos T CD4+ vírgenes.
- b) La segunda señal se brinda mediante moléculas de coestimulación que están reguladas al alza solo cuando el antígeno se asocia con un PAMP: las moléculas de coestimulación corresponden especialmente a CD80 y CD86 (conocidas como proteínas B7.1 y B7.2, respectivamente), que son reconocidas por el receptor CD28 en la superficie del linfocito T CD4+.

- c) La tercera señal consiste en la secreción de citocinas como resultado de la activación de PRR: este medio de citocinas ayuda a las células Th0 a diferenciarse en los diferentes perfiles Th, que son necesarios para establecer respuestas de protección y tolerancia. Cabe resaltar que este microambiente de citocinas puede ser producto de la célula dendrítica en cuestión y/o de otras células circulantes.

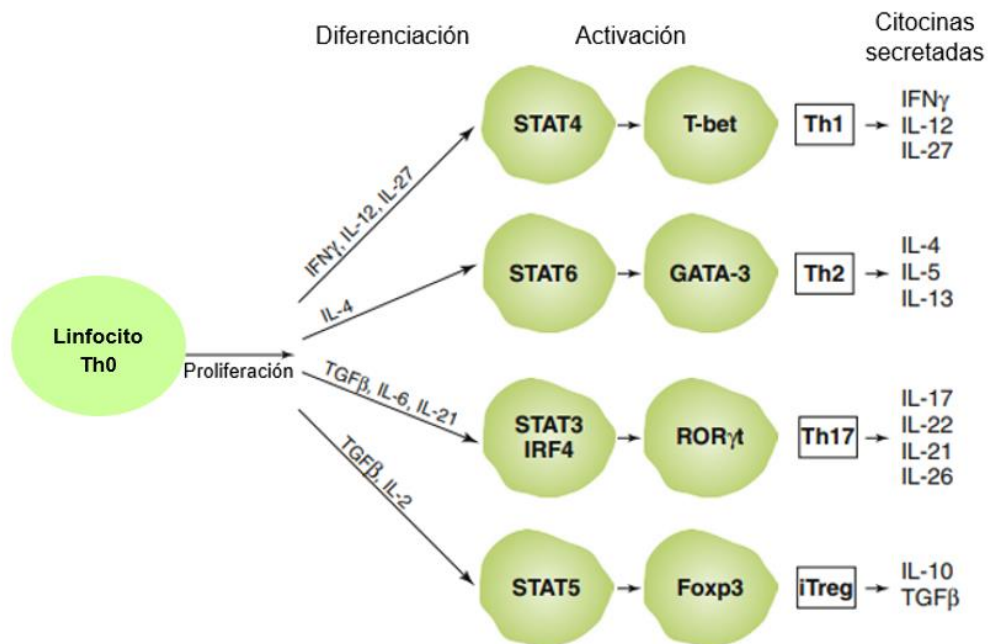
Adicionalmente, las mismas células T CD4+ promueven la expresión de CD80 y CD86 en las células dendríticas para tener un ciclo de retroalimentación positiva que incremente su respuesta (Alberts B, 2002; Jain & Pasare, 2017; Orsini et al., 2012).



**Figura 6. Activación de célula T CD4+ virgen.** La activación de linfocitos T vírgenes específicos de antígeno requiere de tres señales distintas y consecutivas: interacción TCR-antígeno-MHC, interacción CD28-CD80/CD86 y estimulación con citocinas. Traducido y modificado de (Lee, Cho, Choi, & Medicine, 2020).

Una vez que la célula dendrítica activa al linfocito T CD4+ virgen en un órgano linfoide secundario, este linfocito empieza a generar grandes cantidades de IL-2 y prolifera, la célula resultante se denomina célula Th0 y tiene la capacidad de diferenciarse en diferentes subconjuntos de linfocitos Th con capacidades efectoras (Th1, Th2 y Th17) y

supresoras (Treg), dependiendo de las citocinas presentes en el microambiente y la naturaleza de la CD que activó al linfocito T CD4+ virgen (Mak, Saunders, & Jett, 2014). Los patógenos intracelulares promueven que las pDC secreten IFN- $\gamma$  y que las mDC produzcan IL-12 e IL-27, en este ambiente de citocinas, los linfocitos Th0 se diferencian en linfocitos Th1, éstos secretan IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  para activar macrófagos y células T citotóxicas y establecer respuestas inmunes contra patógenos intracelulares. Por otro lado, una célula Th2 se genera en presencia de IL-4 secretada por células dendríticas mieloides, dicha célula es capaz de secretar IL-4, IL-5 e IL-13 para brindar protección contra patógenos extracelulares (por ejemplo, helmintos); las células Th17 son resultado de la exposición de linfocitos Th0 a TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-21 y producen IL-17A para tener respuestas antifúngicas y contra bacterias extracelulares, principalmente en mucosas. En contraste con las respuestas anteriores, las células Treg participan en la tolerancia periférica, siendo el resultado de la exposición a TGF- $\beta$  e IL-2 secretadas principalmente por mDC (Figura 7). A su vez, los linfocitos Th estimulan a linfocitos B para que produzcan anticuerpos (Alberts B, 2002; Lee et al., 2020; Mak et al., 2014).



**Figura 7. Diferenciación de linfocitos Th0.** Dependiendo de las citocinas presentes en el microambiente de la célula Th0, ésta va a adquirir un perfil Th1, Th2, Th17 o Treg. Las citocinas características de cada subconjunto Th, activan factores de transcripción específicos dentro del linfocito Th0 para dirigir la diferenciación. Cada subpoblación de linfocitos T cooperadores produce un perfil de citocinas que regula su función. Traducido y modificado de (Mak et al., 2014).

Lo anterior, muestra la importancia de las células dendríticas mieloides y plasmacitoides para la correcta activación y diferenciación de los linfocitos T CD4+ en los perfiles Th1/Th2/Th17/Treg y para las futuras respuestas de protección y tolerancia. Sin embargo, la caracterización de las células dendríticas mieloides y plasmacitoides en recién nacidos e infantes ENI es limitada y no se ha estudiado la relación de estas células con los bajos porcentajes de linfocitos T cooperadores diferenciados en este grupo vulnerable, por lo que es de nuestro interés establecer si las subpoblaciones de células dendríticas tienen una disfuncionalidad que esté impactando en el proceso de especialización de las células Th.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, alrededor de 1.3 millones de mujeres embarazadas viven con la infección por el VIH, teniendo alta probabilidad de transmitir el virus a su progenie durante el embarazo, el parto o la lactancia. No obstante, gracias a la implementación de la terapia antirretroviral, la tasa de infecciones pediátricas por VIH ha disminuido, dando como resultado una población creciente de recién nacidos ENI que, si bien no están infectados por este virus, tienen mayores tasas de mortalidad y morbilidad en comparación con recién nacidos NENI.

En este contexto, se ha observado que los neonatos ENI son más susceptibles de padecer enfermedades infecciosas durante su primer año de vida, así como retraso en su crecimiento y mayores tiempos de hospitalización por enfermedad grave. Lo anterior, se atribuye a que estos neonatos tienen alteraciones en la funcionalidad de su sistema inmunológico innato y adaptativo: las alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, son de especial interés porque se ha demostrado que los recién nacidos ENI tienen una disminución en los perfiles Th1/Th2/Th17/Treg en sangre periférica, lo cual puede adjudicarse a una disfunción en su capacidad de diferenciación.

Partiendo de que el origen de la alteración inmunológica radica en los eventos que ayudan a la diferenciación de los linfocitos Th, las células dendríticas mieloides y plasmacitoides son de suma importancia porque brindan el microambiente necesario para que dichos linfocitos tengan una adecuada diferenciación, ejemplo de ello es la coestimulación con moléculas de activación como CD80 y CD86 y la secreción de citocinas. Por lo anterior, este trabajo busca establecer si las células dendríticas mieloides y plasmacitoides tienen una disfuncionalidad que ayude a explicar la disminución de los linfocitos Th diferenciados, lo que permitiría el desarrollo de estrategias terapéuticas que reduzcan las tasas de mortalidad y morbilidad por infecciones de los recién nacidos e infantes ENI y les brinde la oportunidad de tener una mejor calidad de vida.

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las células dendríticas mieloides y plasmacitoides de recién nacidos ENI, cursan con alguna alteración fenotípica que impacte en el proceso de diferenciación de los linfocitos Th y el ambiente inflamatorio sérico?

### **4. HIPÓTESIS**

Las células dendríticas mieloides y plasmacitoides, así como sus marcadores de activación (CD80 y CD86), se relacionan con el grado de diferenciación de los perfiles Th (Th1/Th2/Th17/Treg) de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de recién nacidos expuestos al VIH no infectados y con el perfil de citocinas séricas.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

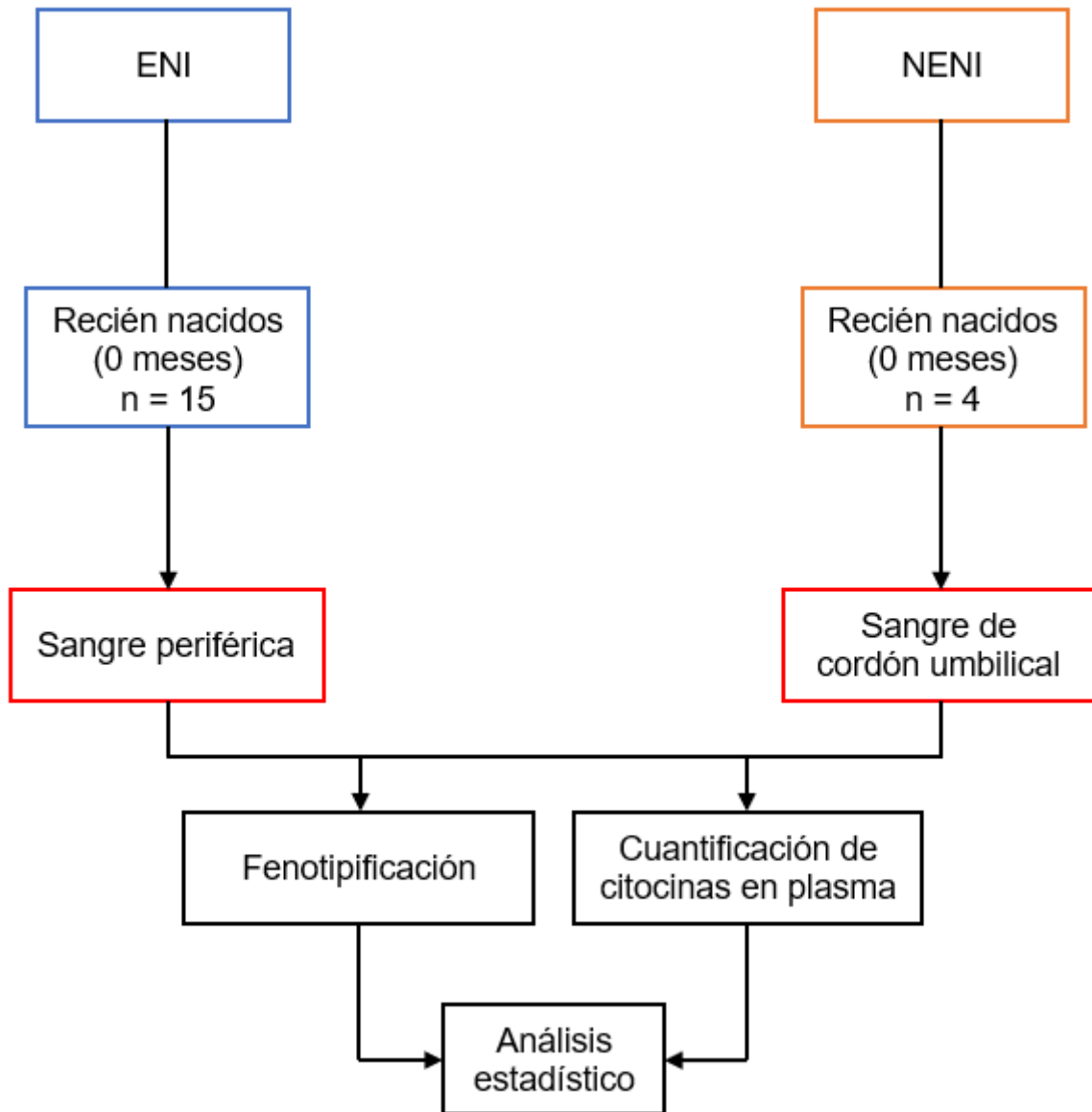
Determinar la asociación entre la presencia de linfocitos Th diferenciados y células dendríticas en sangre periférica de recién nacidos expuestos al VIH no infectados, y caracterizar su perfil sérico de citocinas.

#### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Diseñar un panel de marcadores y un algoritmo de análisis para identificar a las subpoblaciones de células dendríticas y de linfocitos Th.
- Aplicar el panel y algoritmo de análisis de células dendríticas y linfocitos Th diferenciados a muestras de sangre de recién nacidos ENI y NENI.
- Cuantificar la concentración de citocinas en plasma de recién nacidos ENI y NENI.
- Establecer la correlación estadística entre células dendríticas, linfocitos Th y citocinas séricas en ambos grupos de recién nacidos.
- Describir el grado de maduración de las células dendríticas y Th y el perfil sérico de citocinas de los infantes ENI durante el primer año de vida.

## 6. MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo está considerado dentro del Protocolo No. 2019-1-31 revisado y aprobado por los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), y financiado por el mismo Instituto. El esquema general de trabajo se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. Esquema general de trabajo.** Estrategia que llevó a cabo para la solución del problema planteado.



## CARACTERÍSTICAS DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio es de índole observacional de casos y controles, de tipo longitudinal por la temporalidad del estudio y de carácter analítico por la participación del investigador.

### Población de estudio

Recién nacidos e infantes no infectados expuestos al VIH *in útero* de madres VIH positivo cuyo diagnóstico se haya realizado antes o durante el embarazo, atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología.

Recién nacidos de madres VIH negativo como grupo control. La muestra de este grupo provenía de embarazos normoevolutivos de mujeres con índice de masa corporal pregestacional entre 18 y 24.9 Kg/m<sup>2</sup> con embarazo único, que no presentaron complicaciones en el nacimiento y que presentaron pruebas rápidas negativas a VIH.

- Criterios de selección:

Recién nacidos e infantes expuestos al VIH no infectados de madres diagnosticadas con VIH.

- Criterios de inclusión:

- a) Madres cuya edad fuera igual o mayor a 18 años.
- b) Embarazo único y seguimiento en el INPer.
- c) Recién nacidos que hayan llegado a término (>37 semanas de gestación).
- d) Con consentimiento informado firmado por la madre.
- e) Madres que hayan recibido terapia antirretroviral antes y/o durante el embarazo.
- f) Recién nacidos no infectados respaldado por pruebas de laboratorio.
- g) Infantes que no hayan recibido lactancia materna.

- Criterios de no inclusión:

- a) Recién nacidos en los que se detecten copias de VIH en su primera muestra.
- b) Cuando por el volumen de muestra se comprometan las determinaciones clínicas de su seguimiento.

• Criterios de eliminación:

- a) Infantes infectados durante el seguimiento perinatal.
- b) Madres que decidan abandonar por voluntad propia el seguimiento pediátrico y retiren su consentimiento.

### **Obtención de la muestra**

De las madres que cumplían con los criterios arriba mencionados y que firmaron el consentimiento informado, en los dos primeros días del nacimiento de su bebé se tomó una muestra de al menos 500  $\mu$ L de sangre por venopunción del dorso de la mano y se depositaron en tubos Microtainer con EDTA. El mismo procedimiento se realizó en infantes expuestos al VIH no infectados de diferentes meses de edad.

En el caso de recién nacidos no expuestos al VIH no infectados, se obtuvieron muestras de sangre de cordón umbilical.

### **Inmunofenotipificación por citometría de flujo**

De la muestra obtenida, 25.0  $\mu$ L de sangre periférica de recién nacidos ENI o de sangre de cordón umbilical de recién nacidos NENI, fueron empleados para la caracterización de células dendríticas (mieloides y plasmacitoides) y de linfocitos Th diferenciados. Para ello, la sangre se incubó con volúmenes de anticuerpos titulados (Tabla 1 y 2) durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad; posteriormente, se lisaron los eritrocitos y se fijaron las células con 225  $\mu$ L de la solución *BD FACSTM Lysing Solution 1x* (núm. de cat. 349202, preparada al instante 1:10 con agua miliQ), los tubos se agitaron por 10 segundos y se incubaron por 10 minutos bajo las mismas condiciones. Las células se lavaron con 500  $\mu$ L de *FACSFlowTM* para retirar el exceso de anticuerpos y se centrifugaron a 400rcf/5min, el sobrenadante fue eliminado por inversión. Las muestras fueron leídas y analizadas en un citómetro de flujo BD *FACSAriaTM* III con el programa DIVA V8.0.2 (BD, Biosciences).

**Tabla 1. Panel de anticuerpos para la identificación de células dendríticas.**

Anticuerpo	Fluorocromo	Marca	Número de catálogo	Volumen titulado (µL)
Lin*	FITC	BD	340546	2.5
HLA-DR	APC	BioLegend	307610	1.0
CD123	PerCP-Cy5.5	BD	558714	0.5
CD11c	PE-Cy7	BD	561356	0.3
CD80	PE	BD	557227	0.5
CD86	BV510	BD	563461	0.6
CD45	Pacific Blue	BioLegend	304029	0.3

\* Anticuerpos anti-CD3, -CD20, -CD19, -CD56, -CD16 y -CD14.

**Tabla 2. Panel de anticuerpos para la caracterización de linfocitos Th.**

Anticuerpo	Fluorocromo	Marca	Número de catálogo	Volumen titulado (µL)
CD3	AF488	BioLegend	300320	0.3
CD4	APC-Cy7	BioLegend	344616	0.3
CD45RA	PE-CF594	BD	562298	0.3
CXCR3	BV510	BD	740183	0.3
CCR4	APC	BioLegend	359408	0.3
CCR6	PerCP-Cy5.5	BD	560467	0.3
CD25	PE	BioLegend	985802	5.0

### Algoritmo de análisis para la identificación de subpoblaciones de células dendríticas

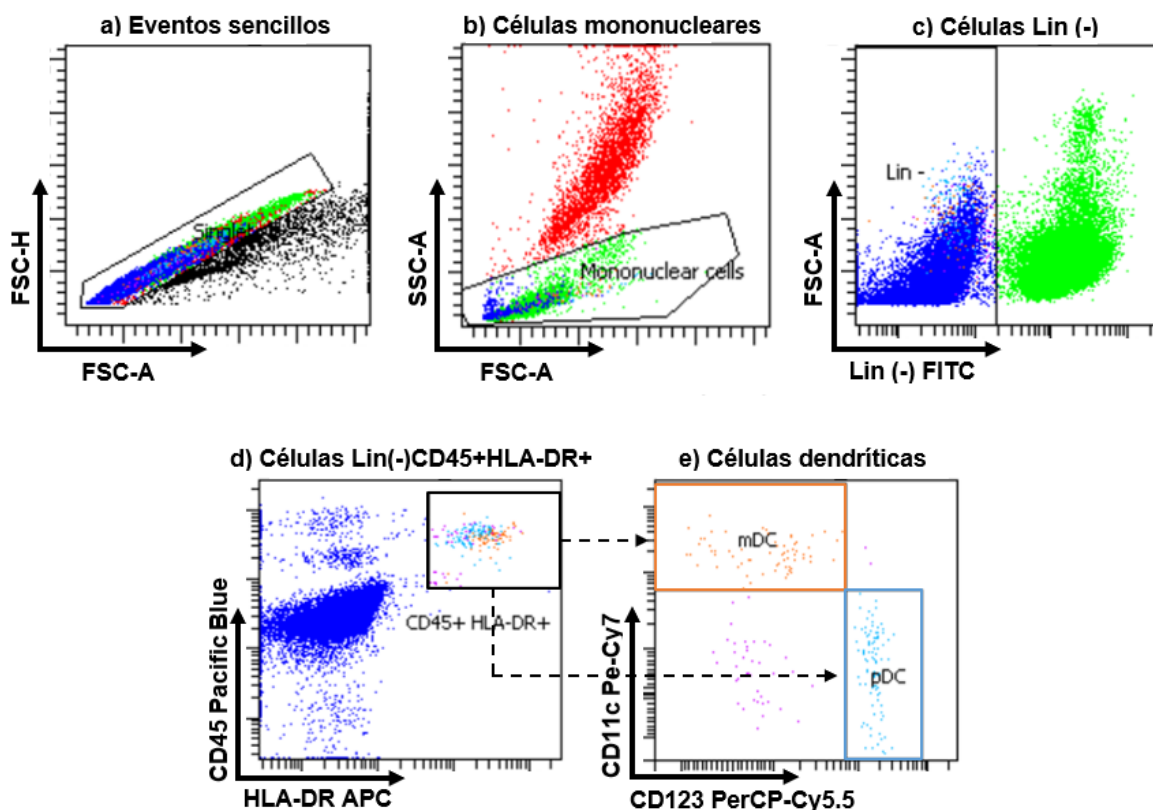
La estrategia de análisis para la identificación de células dendríticas mieloides y plasmacitoides fue la siguiente: a partir de una gráfica de puntos de tamaño área (FSC-A) contra tamaño altura (FSC-H), se seleccionaron los eventos sencillos (Figura 9a), con base en ella, se construyó una segunda gráfica de granularidad (SSC-A) contra FSC-A en la que se eligieron las células mononucleares (Figura 9b) y después se seleccionaron las células negativas a marcadores de linaje (Figura 9c). Finalmente, a partir de células Lin(-)CD45+HLA-DR+ y mediante la expresión diferencial de CD11c y

CD123, se identificaron células dendríticas mieloides y plasmacitoides (Figura 9e), cuyos fenotipos son:

Células dendríticas mieloides: Lin-CD45+HLA-DR+CD11c+CD123-

Células dendríticas plasmacitoides: Lin-CD45+HLA-DR+CD11c-CD123+

En ambas subpoblaciones de células dendríticas, se evaluó la expresión relativa de las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 a través del parámetro intensidad media de fluorescencia (IMF).



**Figura 9. Algoritmo de análisis para la identificación de células dendríticas mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC) en recién nacidos ENI y NENI.** A partir de eventos sencillos, se seleccionaron células Lin (-) para posteriormente identificar células CD45+HLA-DR+. La expresión diferencial de CD123 y CD11c, permitió identificar a células dendríticas mieloides (CD123-CD11c+) y plasmacitoides (CD123+CD11c-).

## Algoritmo de análisis para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos Th diferenciados

La estrategia de análisis para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos Th se enuncia a continuación: a partir de una gráfica de puntos de FSC-A contra FSC-H, se seleccionaron los eventos sencillos (Figura 10a), con base en ella, se construyó una segunda gráfica SSC-A contra FSC-A en la que se eligió la región linfoide (Figura 10b) para así determinar a los linfocitos T CD3+CD4+ (Figura 10c). Partiendo de estos linfocitos y mediante la expresión positiva o negativa de CD45RA, se determinaron los linfocitos T de memoria y vírgenes (Figura 10d): de los linfocitos T de memoria, se identificaron los diferentes fenotipos de linfocitos Th y, de los linfocitos T vírgenes, se seleccionaron a los linfocitos Th0. Los fenotipos de estos perfiles Th son:

Th0: CD3+CD4+CD45RA+CXCR3-CCR4-CCR6-

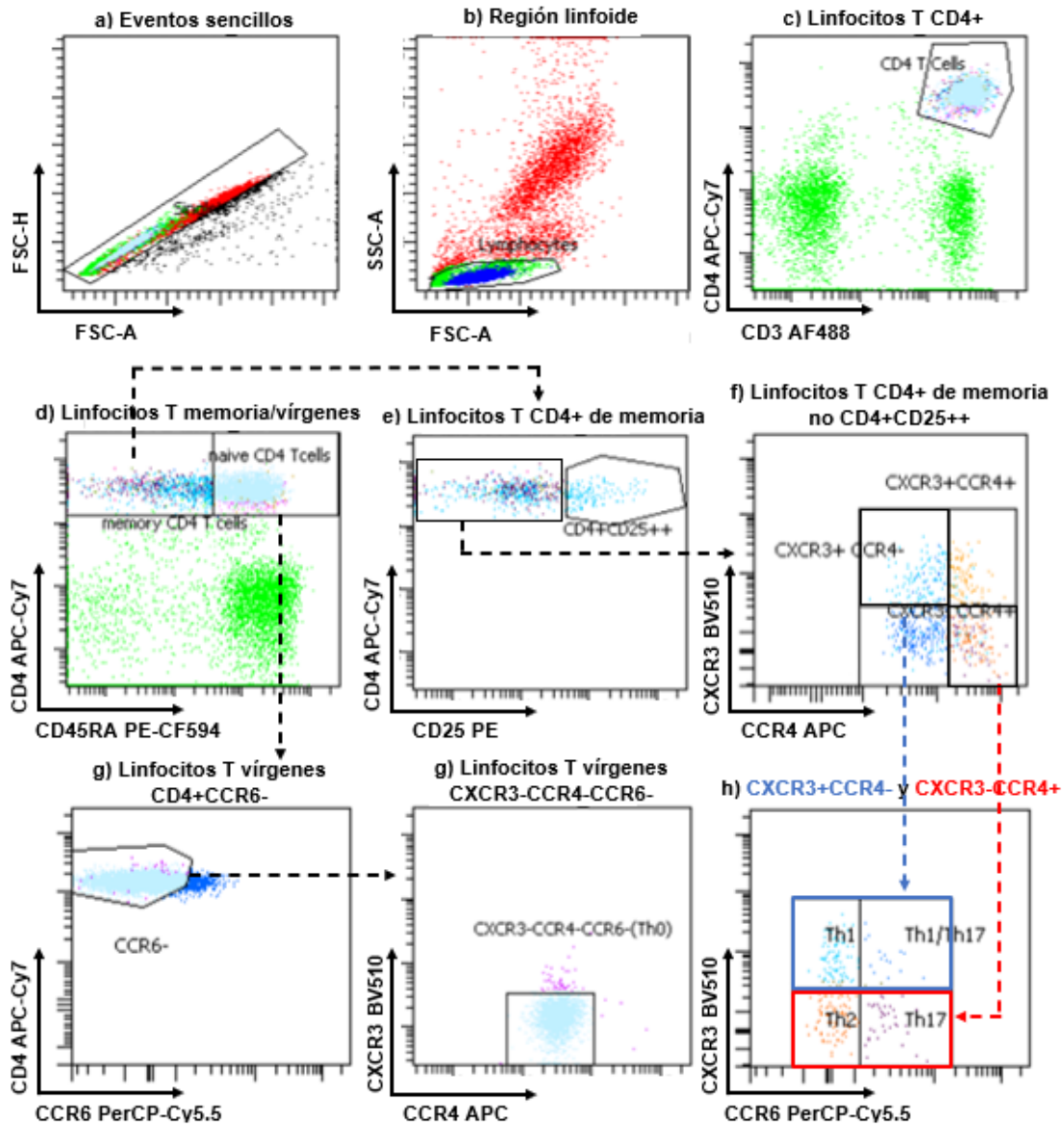
Th1: CD3+CD4+CD45RA-CXCR3+CCR4-CCR6-

Th1/Th17: CD3+CD4+CD45RA-CXCR3+CCR4-CCR6+

Th17: CD3+CD4+CD45RA-CXCR3-CCR4+CCR6+

Th2: CD3+CD4+CD45RA-CXCR3-CCR4+CCR6-

Treg: CD3+CD4+CD45RA-CD25++



**Figura 10. Algoritmo de análisis para la caracterización de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores en recién nacidos ENI y NENI.** A partir de eventos sencillos, se seleccionó la región linfoide para después identificar linfocitos T CD4+ y, mediante la expresión diferencial de receptores de quimiocinas, se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Th1/Th2/Th1/17/Th17/Treg).

### Cuantificación de citocinas

De la muestra sanguínea para el conteo exploratorio de linfocitos T CD4+ y carga viral, aproximadamente 200  $\mu$ L fueron centrifugados a 1000 rcf por 10 minutos para la obtención de plasma, en el cual se determinó la concentración de citocinas mediante inmunoensayos múltiples con el kit comercial *LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1* (BioLegend, núm. de cat. 740809) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Brevemente, en microtubos de 600  $\mu$ L se mezclaron 5  $\mu$ L de las perlas de captura para las citocinas IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33 con 5  $\mu$ L de buffer de ensayo (*Assay Buffer LEGENDplex<sup>TM</sup>*) y 5  $\mu$ L de cada muestra. Al término de una primera incubación de dos horas a temperatura ambiente en oscuridad, las perlas se lavaron con 100  $\mu$ L de buffer de lavado 1x (*Wash Buffer 20x LEGENDplex<sup>TM</sup>*) (centrifugando a 1000 rcf por 5 minutos), se adicionó el anticuerpo de detección y se incubaron por una hora en las mismas condiciones. Después, se agregó el reactivo de detección SA-PE y fueron incubados durante 30 minutos, transcurrido este tiempo, las perlas se lavaron nuevamente y se retiró el sobrenadante. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSAria<sup>TM</sup> III y los datos fueron interpolados utilizando una curva patrón preparada paralelamente al ensayo (Figura Complementaria 1), las concentraciones de citocinas se calcularon con ayuda del software LEGENDplex<sup>TM</sup> de BioLegend.

### **Análisis estadístico**

- Análisis por grupos

Para la comparación de la expresión relativa de CD80 y CD86 en mDC y pDC, la concentración de las citocinas IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33 y el porcentaje de células dendríticas mieloides, plasmacitoides, células T de memoria, T reguladoras y de los diferentes perfiles Th en los grupos de recién nacidos NENI y ENI, se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y posteriormente una prueba t de Student no pareada en caso de tener una distribución normal en ambos grupos o bien, una prueba U de Mann-Whitney si los datos no seguían una distribución normal. Lo anterior, también se aplicó para la comparación de talla, peso y semanas de gestación de ambos grupos de recién nacidos, así como para la edad materna gestacional. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de 0.05.

- Análisis de seguimiento

Para evaluar el grado de maduración de las subpoblaciones de células dendríticas, de linfocitos T CD4+ y el perfil de citocinas sérico durante el primer año de vida del grupo

ENI, comparamos la expresión relativa de CD80 y CD86 en mDC y pDC, la concentración de las citocinas IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33 y el porcentaje de células dendríticas mieloides, plasmacitoides, células T de memoria, T reguladoras y de los diferentes perfiles Th, entre grupos de infantes de diferentes meses de edad: grupo 0 (cero meses), grupo 1 (1-3 meses), grupo 2 (4-6 meses), grupo 3 (7-9 meses), grupo 4 (>9 meses). Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y, posteriormente, una prueba ANOVA y post hoc de Tukey en caso de tener una distribución normal o bien, una prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn si los datos no seguían una distribución normal. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de 0.05.

- Pruebas de correlación

Para conocer el impacto de las células dendríticas y sus marcadores de activación sobre el grado de diferenciación de linfocitos Th y el perfil inflamatorio sérico, se realizaron pruebas de correlación biparamétricas de Pearson con nivel de significancia de 0.05.

- Análisis multivariado por componentes principales

Con el objetivo de analizar los datos en un contexto multivariable e identificar las relaciones existentes entre células dendríticas, linfocitos T y citocinas de recién nacidos control y neonatos ENI, se realizaron análisis de componentes principales (PCA). Para ello, se construyeron matrices enteras y normalizadas de datos con el software GraphPad Prism™ 9.0 para generar componentes principales que expliquen al menos el 60% de la variación de los datos. Los resultados de este análisis se presentan en gráficos de biplot.



## 7. RESULTADOS

### Descripción de la población materna y neonatal

Los resultados presentados contemplan el análisis de 4 muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos NENI y 15 muestras de sangre periférica de recién nacidos ENI. Los parámetros maternos y las características neonatales se resumen en la Tabla 3 y 4 respectivamente. Brevemente, respecto a las características maternas (Tabla 3), ambos grupos están en una edad reproductiva considerada sana, con un intervalo de gestas entre 1 y 2 en el caso de las madres infectadas por el VIH. Como esperábamos, el conteo de linfocitos T CD4+ de las madres VIH+ se encuentra por debajo del valor de referencia (500-1500 célula/ $\mu$ L, siendo que la mayoría de estas pacientes se encuentra en un estado de inmunodeficiencia), todas recibieron terapia antirretroviral durante y después del embarazo, que consta de una combinación de tres medicamentos antirretrovirales que actúan en diferentes puntos del ciclo de replicación viral: inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos (tenofovir, emtricitabina, abacavir y lamivudina), inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (efavirenz), inhibidores de proteasa (darunavir) e inhibidores de la integrasa (raltegravir, bictegravir y dolutegravir).

Entre las características neonatales (Tabla 4), apreciamos que el tiempo de gestación fue similar en los grupos de recién nacidos, siendo que ambos llegaron a término (38-42 semanas de gestación). En las mediciones antropométricas como talla y peso, los valores tienden a ser menores en el grupo ENI sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. El estado general de salud evaluado por la escala APGAR, fue similar entre los grupos de recién nacidos y considerado como fisiológico. Adicionalmente, la proporción de participantes respecto al género del grupo ENI, está distribuido equitativamente y, al ser recién nacidos, las posibles diferencias inmunológicas no estarían sesgadas por este parámetro.

**Tabla 3. Características maternas.**

Parámetro	Madres VIH- (n=4)	Madres VIH+ (n=15)	Valor de P	Valores de referencia
Edad*	25.00 ± 6.83	26.13 ± 4.58	0.6951	No aplica
Número de gestas	Sin datos	1.87 ± 1.19	No aplica	No aplica
Conteo de linfocitos CD4 (célula/μL)	No aplica	332.80 ± 215.90	No aplica	(500-1500) célula/μL
Terapia antirretroviral	No aplica	DRV/TDF/FTC: 6.7% BIC/FTC/TDF: 13.3% RAL/FTC/TDF: 53.3% EFV/TDF/FTC: 13.3% DGT/TDF/FTC: 6.7% DGT/ABC/3TC: 6.7%	No aplica	No aplica

DRV: darunavir; TDF: tenofovir; FTC: emtricitabina; RAL: raltegravir; BIC: bictegravir; EFV: efavirenz; DGT: dolutegravir; ABC: abacavir; 3TC: lamivudina. \* Prueba t de Student no pareada. Valores de referencia obtenidos de (WHO, 2020).

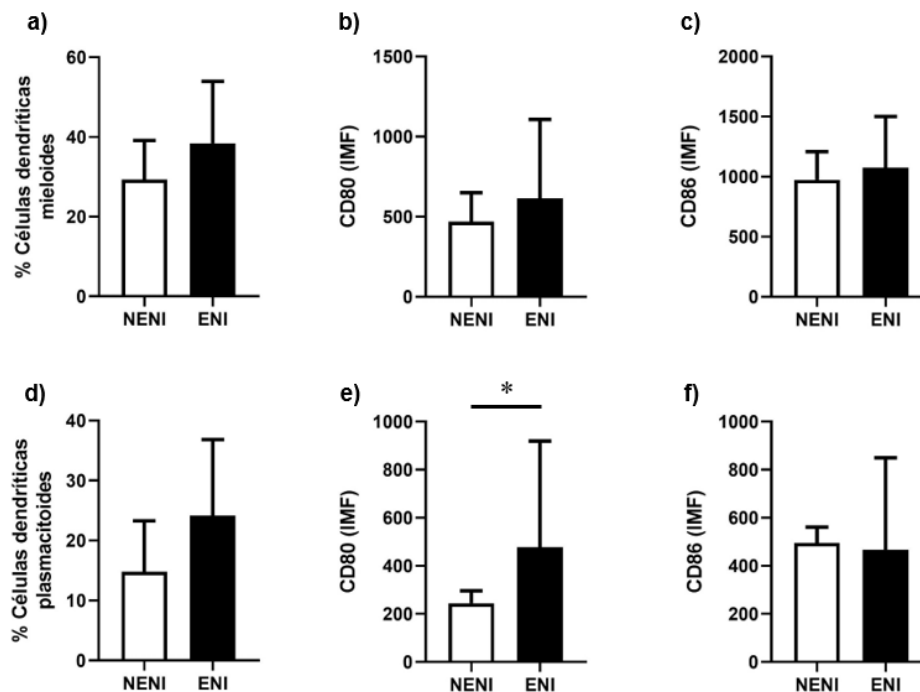
**Tabla 4. Características neonatales.**

Parámetro	NENI (n=4)	ENI (n=15)	Valor de P	Valores de referencia
Género	Femenino: 15% Masculino: 75%	Femenino: 53.3% Masculino: 46.7%	No aplica	No aplica
Talla (cm)*	49.25 ± 1.55	47.77 ± 1.67	0.1282	(49.1-49.9) cm
Peso (kg)**	3.11 ± 0.18	2.78 ± 0.32	0.0764	3.2 ± 0.4 kg
SDG**	38.25 ± 1.26	38.12 ± 0.75	0.5725	(38-42) SDG
APGAR	8/9	8/9: 93.3% 9/10: 6.7%	No aplica	7-10

SDG: semanas de gestación. \* Prueba t de Student no pareada; \*\* Prueba U de Mann-Whitney. Valores de referencia obtenidos de (WHO, 2006).

## Porcentaje de mDC y pDC en recién nacidos ENI y NENI

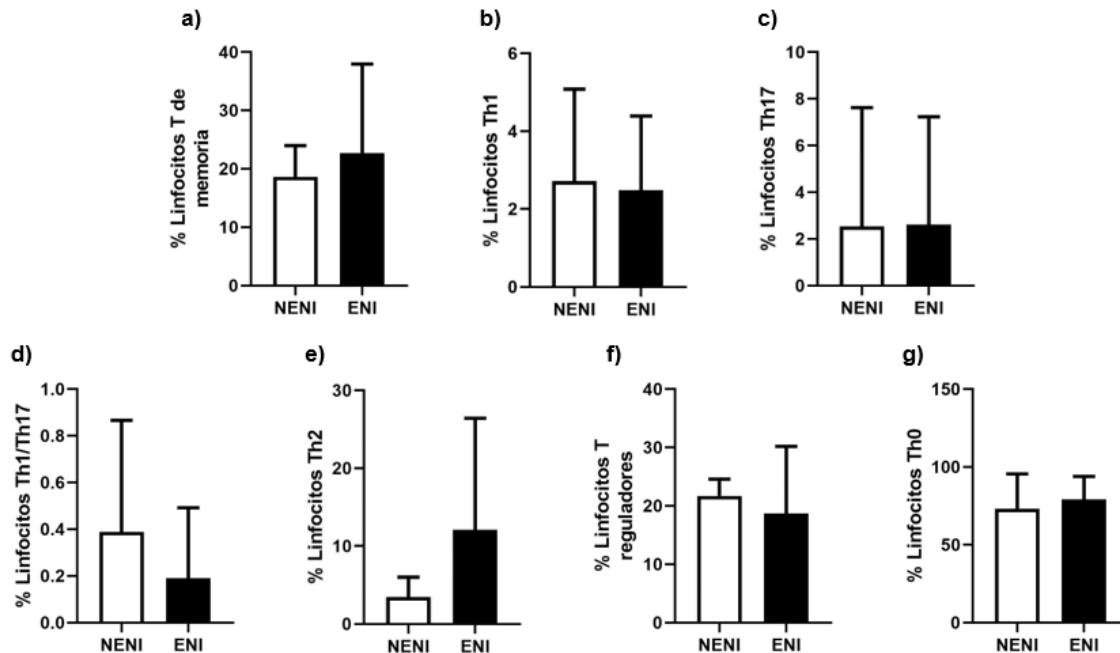
Para establecer si existe una relación entre células dendríticas y linfocitos Th diferenciados en recién nacidos ENI, aplicamos un panel multiparamétrico (Tabla 1 y Figura 9) para evaluar el porcentaje de células dendríticas y su expresión relativa de CD80 y CD86. Con esta estrategia observamos que, si bien no existen diferencias estadísticamente significativas, los porcentajes de células dendríticas mieloides y plasmacitoides tienden a ser mayores en recién nacidos ENI en comparación con la población NENI (Figura 11a y 11d), además, las células predominantes son las mDC en ambos grupos de neonatos. Por otro lado, las mDC de nuestra población ENI, muestran una tendencia de mayor expresión relativa de CD80 y CD86 respecto al grupo NENI (Figura 11b y 11c); por su parte, la expresión relativa de CD80 en pDC es significativamente mayor ( $p = 0.0341$ ), mientras que la expresión de CD86 tiende a ser menor en los recién nacidos ENI en comparación al grupo control (Figura 11e y 11f).



**Figura 11. Porcentaje de células dendríticas y su expresión relativa de CD80 y CD86 en recién nacidos ENI y NENI.** Muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos NENI ( $n=4$ ) y de sangre periférica de recién nacidos ENI ( $n=15$ ), fueron inmunomarcadas para evaluar el porcentaje de a) células dendríticas mieloides, su expresión relativa de b) CD80 y c) CD86, así como el porcentaje de d) células dendríticas plasmacitoides y su expresión de e) CD80 y f) CD86. Las barras centrales representan la media más la desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con prueba t de Student no pareada (a, b) o prueba U de Mann-Whitney (c, d, e, f),  $p = 0.0341$  (\*).

## **Porcentaje de linfocitos T CD4+ diferenciados en recién nacidos ENI y NENI**

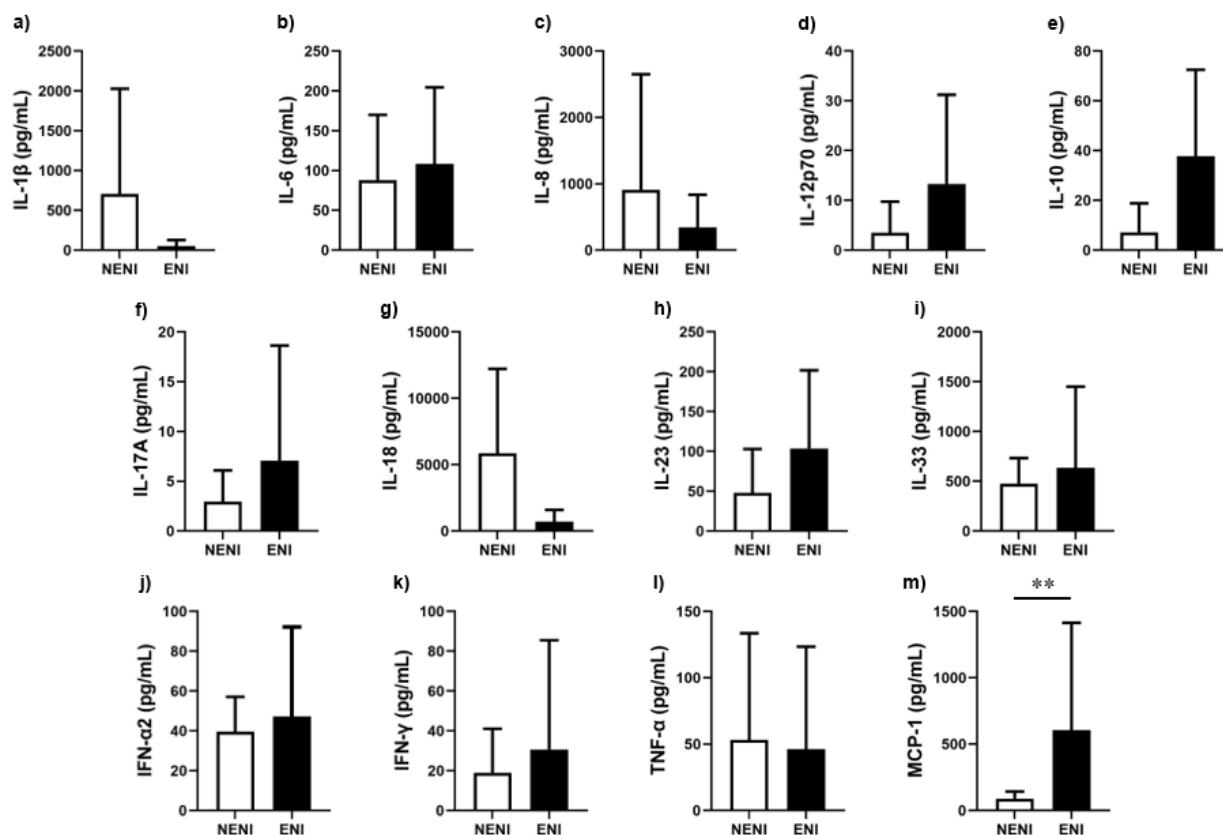
Para determinar si los porcentajes de linfocitos T CD4+ diferenciados son menores en recién nacidos ENI, aplicamos un panel multiparamétrico (Tabla 2 y Figura 10) que nos permitiera identificar linfocitos Th0 y de memoria de los perfiles Th1, Th1/Th17, Th2, Th17 y Treg. Con dicha estrategia, apreciamos que no hay diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, los linfocitos T de memoria de los recién nacidos ENI exhiben una tendencia de mayor porcentaje respecto a neonatos NENI (Figura 12a). Adicionalmente, dentro de los linfocitos T de memoria, las células Th1, Th1/Th17 y Treg muestran una tendencia de menor porcentaje en la población ENI en comparación al grupo control (Figura 12b, 12d y 12f); en cambio, los linfocitos Th17 y Th2 tienden a ser mayores en el grupo ENI (Figura 12c y 12e). Interesantemente, los linfocitos Th0 (Figura 12g) que corresponden a linfocitos no diferenciados, no presentan diferencias estadísticamente significativas, es decir, no parecieran ser diferentes entre ambos grupos de recién nacidos. En cuanto a orden de abundancia, los linfocitos T diferenciados predominantes son los T reguladores seguidos por los Th2 en ambos grupos de neonatos; los linfocitos Th1/Th17 representan menos del 0.4% de las células T CD4+ totales.



**Figura 12. Porcentaje de linfocitos T diferenciados y linfocitos Th0 en recién nacidos ENI y NENI.** Muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos NENI (n=4) y de sangre periférica de recién nacidos ENI (n=15), fueron inmunomarcadas para determinar los porcentajes de las siguientes subpoblaciones de linfocitos: a) linfocitos T de memoria, b) linfocitos Th1, c) linfocitos Th17, d) linfocitos Th1/Th17, e) linfocitos Th2, f) linfocitos T reguladores y g) linfocitos Th0. Las barras centrales representan la media más la desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con prueba t de Student no pareada (b) o prueba U de Mann-Whitney (a, c, d, e, f, g).

### Concentraciones plasmáticas de citocinas en recién nacidos ENI y NENI

Adicionalmente, evaluamos la concentración de diversas citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en plasma sanguíneo de recién nacidos ENI y NENI. Al comparar la concentración de dichas citocinas, observamos que IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18 y TNF- $\alpha$  exhiben una tendencia de menor concentración en neonatos ENI (Figura 13a, 13c, 13g y 13i), mientras que IL-6, IL-12p70, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-33, IFN- $\alpha$ 2 e IFN- $\gamma$  muestran una tendencia de mayor concentración en este grupo (Figura 13b, 13d, 13e, 13f, 13h-k). Además, la concentración de MCP-1 es significativamente mayor en recién nacidos ENI respecto al grupo control (Figura 13m,  $p = 0.0036$ ).



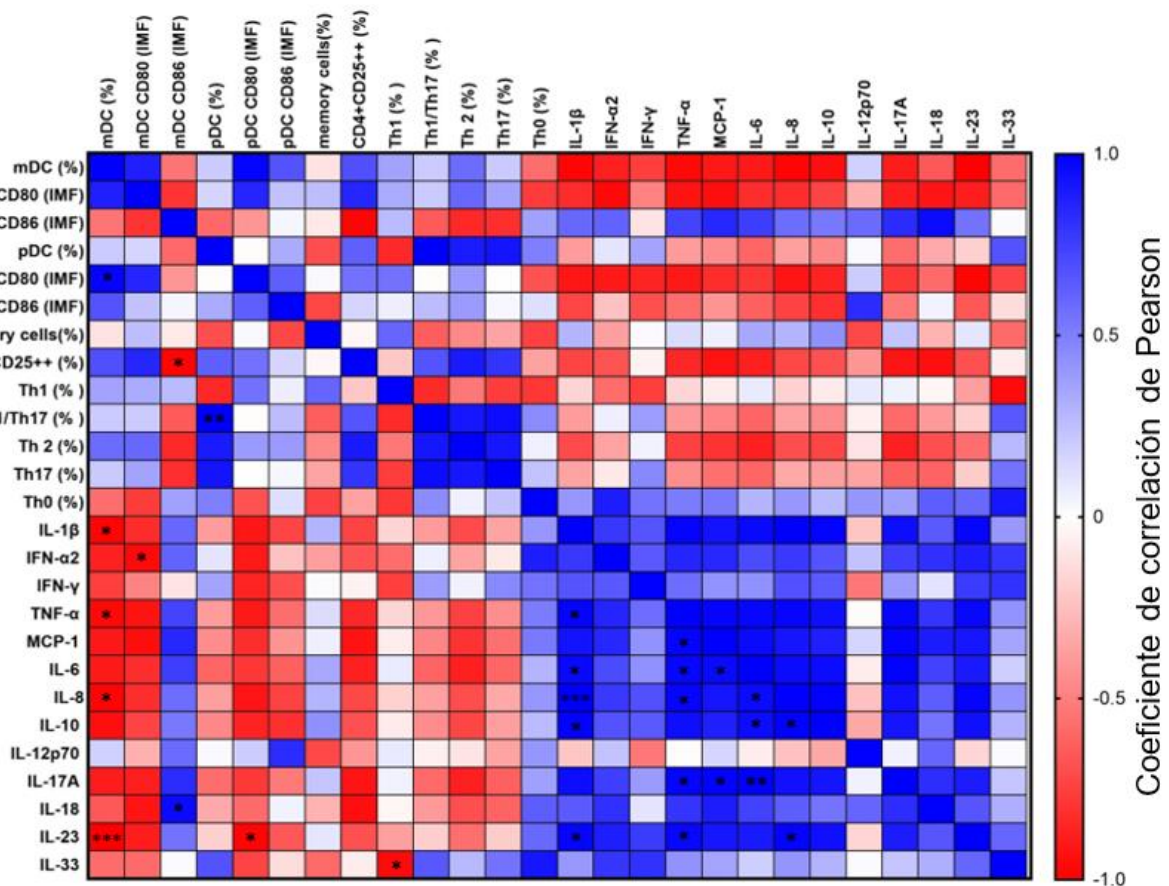
**Figura 13. Concentraciones plasmáticas de citocinas en recién nacidos ENI y NENI.** En plasma de recién nacidos NENI (n=4) y ENI (n=15), se cuantificó la concentración de las citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) IL-8, d) IL-12p70, e) IL-10, f) IL-17A, g) IL-18, h) IL-23, i) IL-33, j) IFN- $\alpha$ 2, k) IFN- $\gamma$ , l) TNF- $\alpha$  y m) MCP-1 a través de inmunoensayos múltiples basados en perlas y analizadas mediante citometría de flujo. Las barras centrales representan la media más la desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con prueba t de Student no pareada (h) o prueba U de Mann-Whitney (a, b, c, d, e, f, g, i, j, k, l, m),  $p = 0.0036$  (\*\*).

### Relación entre las poblaciones celulares y citocinas de recién nacidos ENI y NENI

Para establecer si la presencia de linfocitos Th se relaciona con la presencia de células dendríticas, su expresión de marcadores de activación y el perfil de citocinas sérico, realizamos análisis de correlación bivariado entre el porcentaje de cada subtipo de CD, la expresión de CD80 y CD86, así como la concentración de diferentes citocinas en sangre periférica y de cordón umbilical de recién nacidos ENI y NENI respectivamente.

Respecto al grupo control, en la Figura 14 se presenta la matriz de correlaciones de las variables arriba mencionadas evaluadas en neonatos NENI. En esta matriz apreciamos que el porcentaje de células dendríticas mieloides y plasmacitoides, así como la

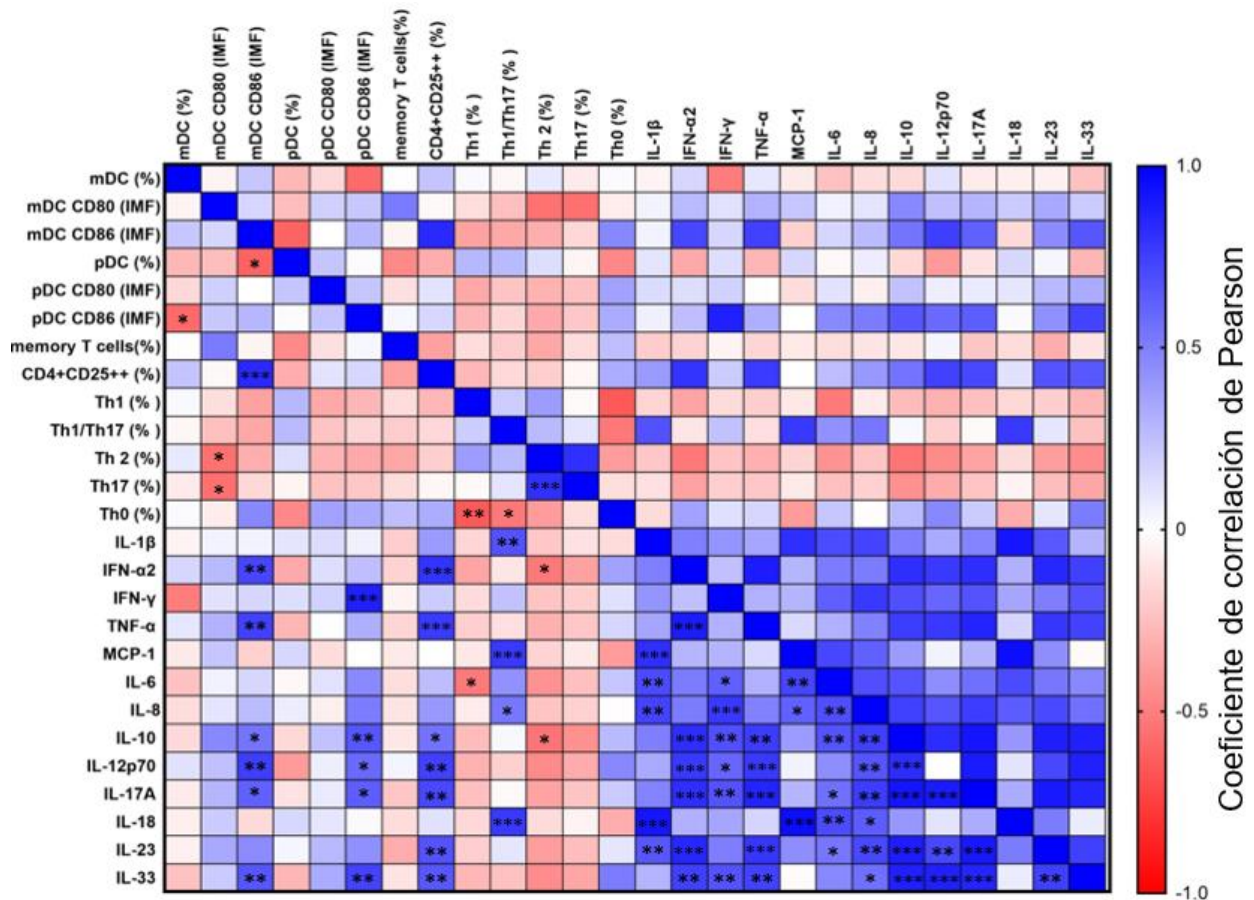
expresión relativa de CD80 en mDC y de CD80 y CD86 en pDC, correlaciona negativamente con la concentración de citocinas, pero positivamente con el estado de transición Th1/Th17 y con los perfiles Th2 y Th17; además, la expresión de CD86 en mDC se relaciona de forma negativa con células T reguladoras. Lo anterior, sugiere que las células dendríticas de los recién nacidos NENI no reciben estímulos adecuados a consecuencia de la baja concentración de las citocinas cuantificadas, sin embargo, conservan la capacidad de inducir respuestas efectoras y reguladoras.



**Figura 14. Correlaciones de Pearson entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos NENI.** Matriz de correlaciones de Pearson, el color de cada casilla indica el valor del coeficiente de correlación (R): azul para las correlaciones positivas, rojo para las correlaciones negativas y blanco para la no correlación.  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*). Las variables evaluadas se muestran en el eje vertical izquierdo y en el eje horizontal superior, la interpretación de los resultados se realizó en la matriz triangular inferior.

Adicionalmente, construimos una matriz de correlación de los parámetros evaluados en sangre periférica de recién nacidos ENI que corresponde a la Figura 15. En ella, observamos que la expresión de CD80 y CD86 tanto en mDC como en pDC

correlaciona positivamente con la concentración de las diferentes citocinas medidas, mientras que se relaciona de forma negativa con el porcentaje de linfocitos Th1, Th1/Th17, Th2 y Th17. De igual manera, la expresión relativa de CD86 en mDC se asocia con la presencia de linfocitos T reguladores que, a su vez, se correlaciona positivamente con las concentraciones de citocinas. En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de CD80 y CD86 en ambas subpoblaciones de células dendríticas, promueven un perfil regulador a costa de respuestas efectoras.



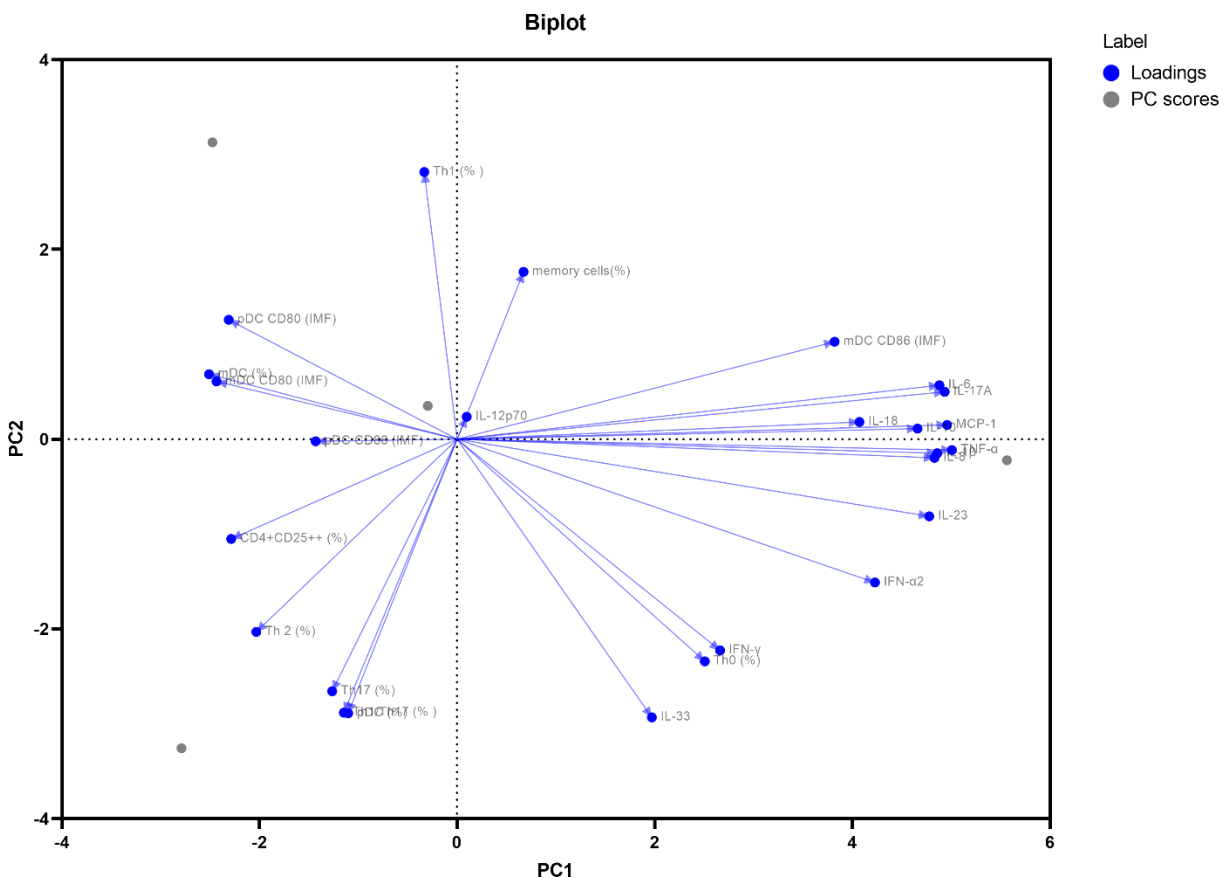
**Figura 15. Correlaciones de Pearson entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos ENI.** Matriz de correlaciones de Pearson, el color de cada casilla indica el valor del coeficiente de correlación (R): azul para las correlaciones positivas, rojo para las correlaciones negativas y blanco para la no correlación.  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*). Las variables evaluadas se muestran en el eje vertical izquierdo y en el eje horizontal superior, la interpretación de los resultados se realizó en la matriz triangular inferior.

Ahora bien, para tener un panorama más amplio del impacto de las células dendríticas mieloides y plasmacitoides sobre el grado de diferenciación de los perfiles Th de linfocitos T CD4+ en los recién nacidos ENI y NENI, y el ambiente de citocinas sérico,



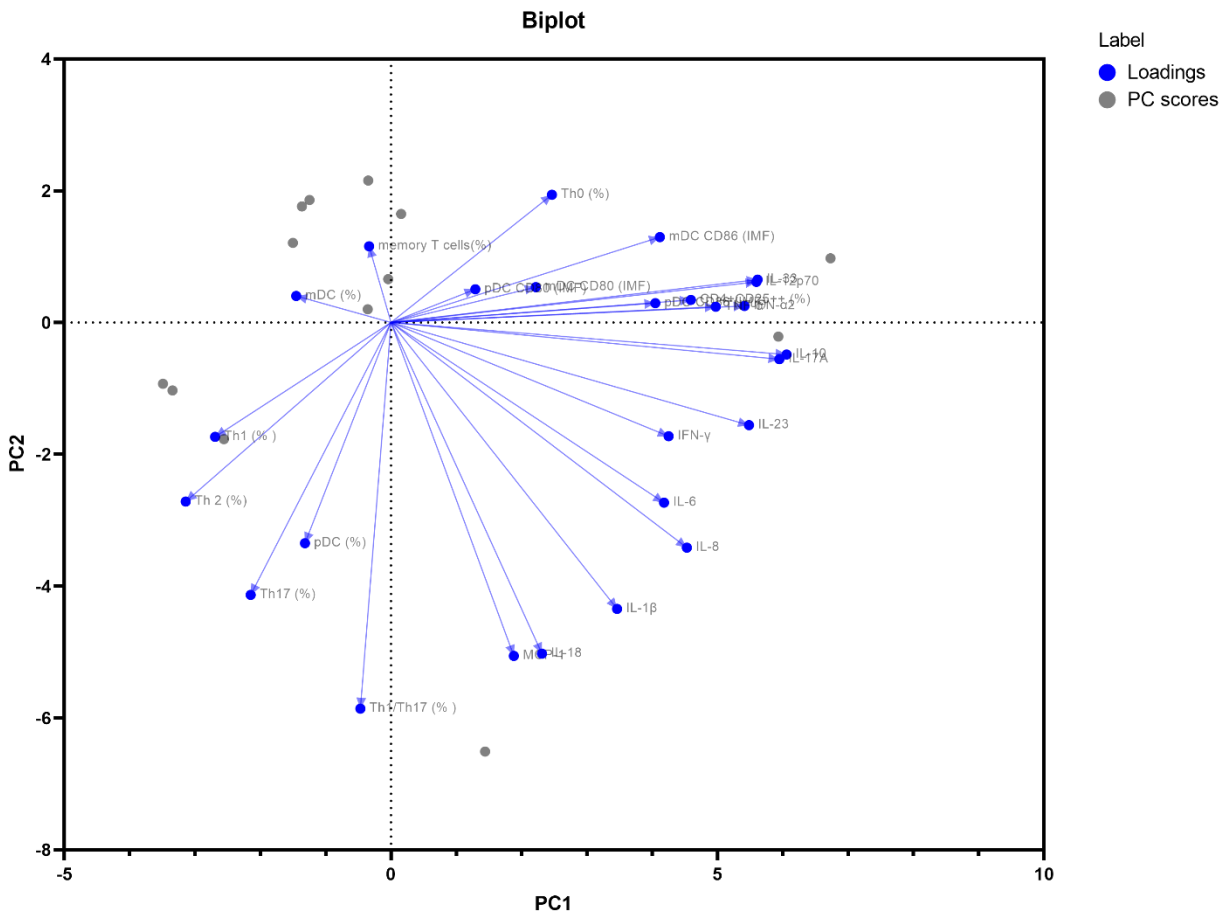
realizamos análisis de componentes principales, cuyos gráficos de reducción de variables se muestran en las Figuras 16 y 17 respectivamente.

En la Figura 16, se observa que los porcentajes de pDC, linfocitos Th17 y Th1/Th17 están fuertemente relacionados entre sí en la población control. Por otro lado, la expresión de CD86 en mDC presenta una asociación positiva con la concentración de las citocinas evaluadas y, por el contrario, no está relacionada con la presencia de linfocitos T reguladores. Las relaciones descritas son similares a las obtenidas en la matriz de correlaciones de los recién nacidos NENI (Figura 14). Cabe resaltar que en este gráfico, apreciamos que el porcentaje de células Th1 se relaciona negativamente con la presencia de células Th2.



**Figura 16. Biplot de análisis de componentes principales entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos NENI.** Gráfico de análisis de componentes principales que representa la correlación multivariable entre los parámetros evaluados en sangre de cordón umbilical de recién nacidos NENI (n=4). En este análisis se tomaron en cuenta dos componentes principales que explican el 60% de la variación de los datos. Representación realizada con el programa GraphPad Prism™ 9.0.

Respecto a los recién nacidos ENI, en la Figura 17 apreciamos que las células dendríticas plasmacitoides tienen una asociación positiva con los linfocitos Th17. En cuanto a la expresión de las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 en ambas subpoblaciones de células dendríticas, se relaciona fuertemente con las concentraciones de IL-33, IL-12p70 e IFN- $\alpha$ 2, así también con la presencia de linfocitos T reguladores, no obstante, se asocia negativamente con el porcentaje de pDC y con los fenotipos Th1, Th2 y Th17. Estas observaciones son similares a las descritas en la Figura 15. Cabe destacar que, en los recién nacidos ENI, percibimos que la presencia de linfocitos Th1 está relacionada con la presencia de linfocitos Th2.



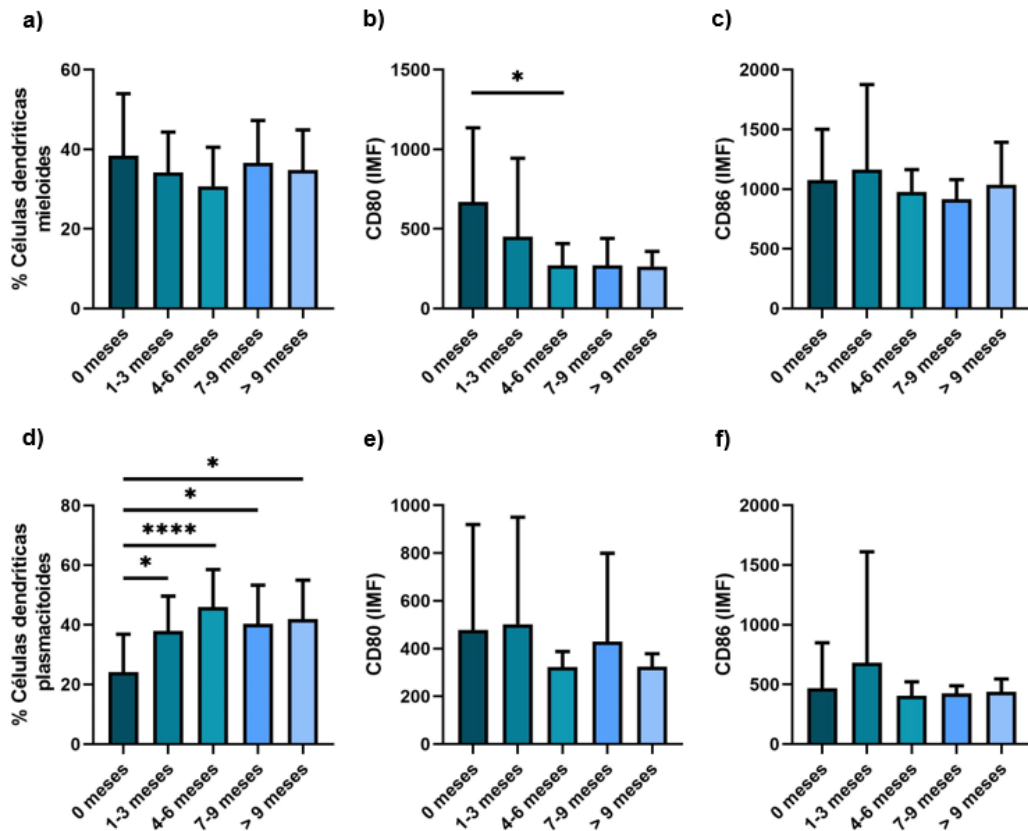
**Figura 17. Biplot de análisis de componentes principales entre subpoblaciones y moléculas de coestimulación de células dendríticas, perfiles Th de linfocitos T CD4+ y citocinas en recién nacidos ENI.** Gráfico de análisis de componentes principales que representa la correlación multivariable entre los parámetros evaluados en sangre periférica de recién nacidos ENI (n=15). En este análisis se tomaron en cuenta dos componentes principales que explican el 60% de la variación de los datos. Representación realizada con el programa GraphPad Prism™ 9.0.

Los resultados anteriores, sugieren que las células dendríticas de neonatos ENI inducen un perfil preferentemente regulador por encima de perfiles efectores. En contraste, las células dendríticas de los recién nacidos NENI promueven la diferenciación de linfocitos Th0 a fenotipos tanto efectores como reguladores, preferentemente a respuestas Th2 sobre Th1, en tanto que los bebés ENI exhiben ambos tipos de respuesta.

### **Seguimiento inmunológico de infantes ENI**

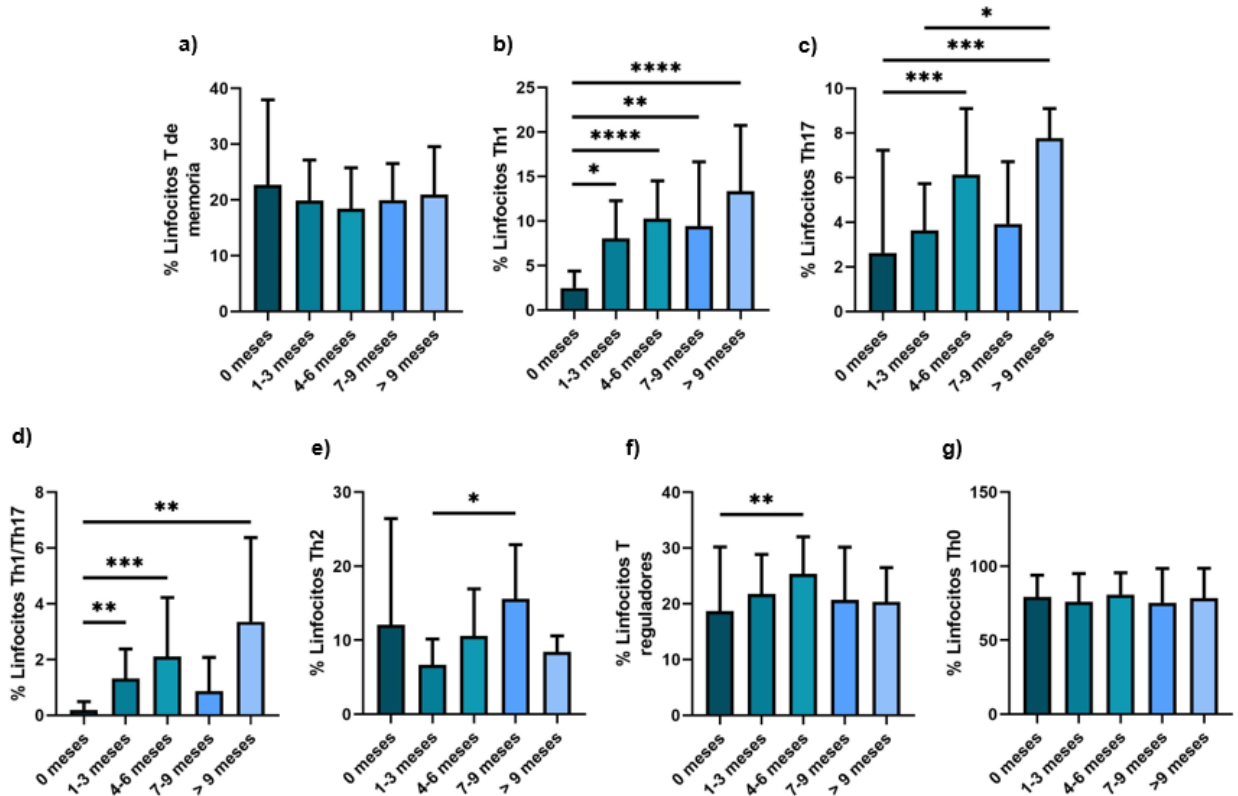
Con la finalidad de realizar un seguimiento en nuestra población infantil ENI, determinamos el porcentaje de células dendríticas y su expresión de CD80 y CD86, porcentaje de linfocitos Th diferenciados y concentración de citocinas en otros cuatro grupos de edad: grupo 1 (1-3 meses), grupo 2 (4-6 meses), grupo 3 (7-9 meses) y grupo 4 (>9 meses), cuya descripción poblacional se muestra en la Tabla Complementaria 1.

Acerca de las subpoblaciones de células dendríticas, observamos que el porcentaje de mDC es similar entre las edades (Figura 18a), mientras que el porcentaje de pDC es mayor entre los 4 y 6 meses de nacidos (Figura 18d). Ahora bien, en mDC, la expresión de CD80 tiende a ser menor conforme madura el neonato y, por el contrario, la expresión de CD86 es semejante entre los grupos de infantes (Figura 18b y 18c respectivamente); en pDC, la expresión de CD80 y CD86 es similar a lo largo del primer año de vida (Figura 18e y 18f).



**Figura 18. Porcentaje de células dendríticas y su expresión relativa de CD80 y CD86 en recién nacidos e infantes ENI.** Muestras de sangre periférica de recién nacidos ( $n=15$ ) e infantes ENI de diferentes meses de edad, 1 a 3 ( $n=21$ ), 4 a 6 ( $n=23$ ), 7 a 9 ( $n=10$ ) y mayores a 9 meses ( $n=6$ ), fueron inmunomarcadas para evaluar el porcentaje de a) células dendríticas mieloides, su expresión relativa de b) CD80 y c) CD86, así como el porcentaje de d) células dendríticas plasmacitoides y su expresión de e) CD80 y f) CD86. Las barras centrales representan la media más la desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con ANOVA y post hoc de Tukey (d) o prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn (a, b, c, e, f),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

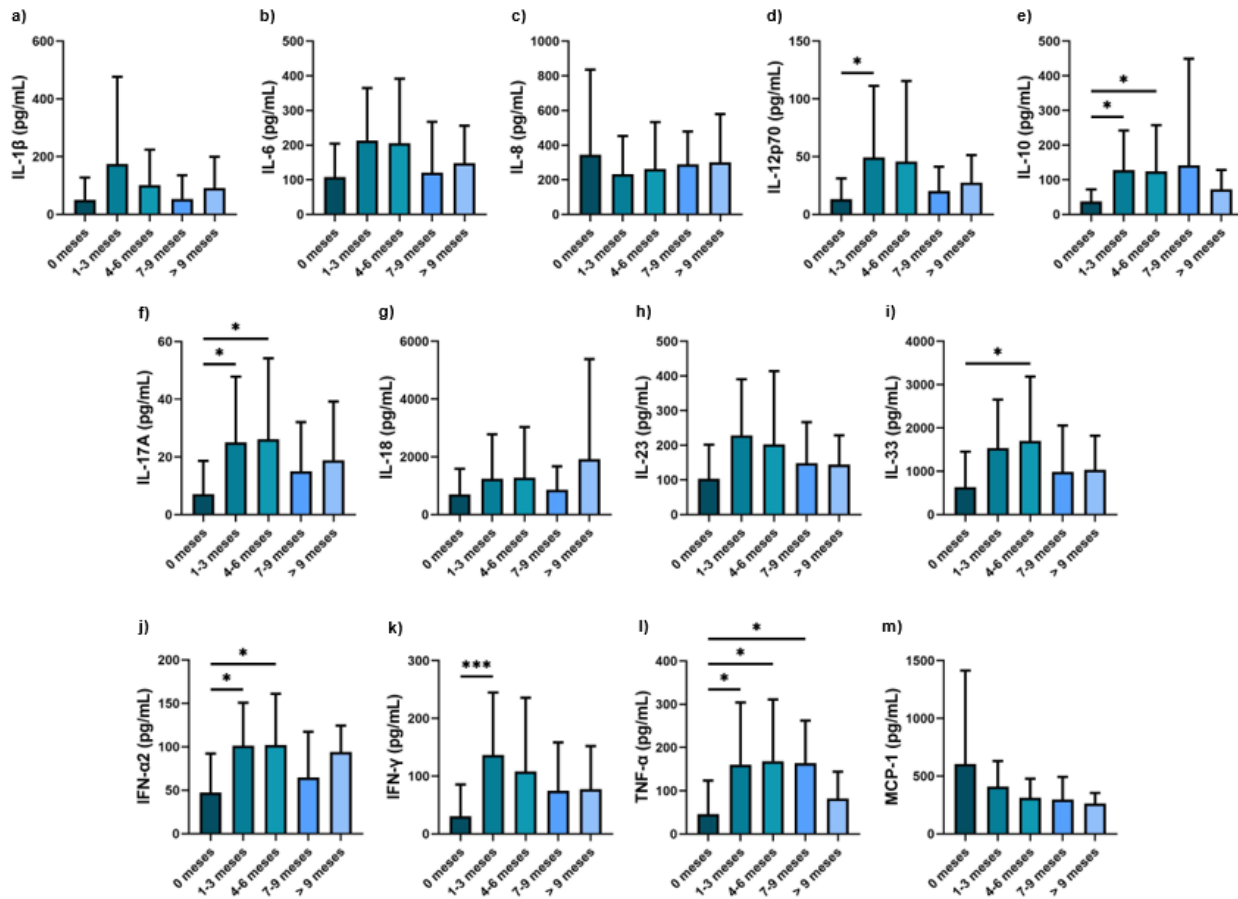
En cuanto a las células T CD4+, el porcentaje de linfocitos T de memoria es comparable entre los grupos de infantes (Figura 19a). Sin embargo, el porcentaje de linfocitos Th1 es significativamente mayor en el grupo de edad mayor a 9 meses respecto al nacimiento ( $p < 0.0001$ ), así como el porcentaje de linfocitos Th17 ( $p = 0.0009$ ) y Th1/Th17 ( $p = 0.0021$ ) (Figura 19b, 19c y 19d respectivamente). Los linfocitos Th2 muestran una tendencia de mayor abundancia entre los 7 y 9 meses de vida, en cambio, las células T reguladoras son significativamente más abundantes en los infantes de 4 a 6 meses de edad en comparación a recién nacidos ( $p = 0.0055$ ) (Figura 19e y 19f).



**Figura 19. Porcentaje de linfocitos T diferenciados y Th0 en recién nacidos e infantes ENI.** Muestras de sangre periférica de recién nacidos (n=15) e infantes ENI de diferentes meses de edad, 1 a 3 (n=21), 4 a 6 (n=23), 7 a 9 (n=10) y mayores a 9 meses (n=6), fueron inmunomarcadas para determinar los porcentajes de las siguientes subpoblaciones de linfocitos: a) linfocitos T de memoria, b) linfocitos Th1, c) linfocitos Th17, d) linfocitos Th1/Th17, e) linfocitos Th2, f) linfocitos T reguladores y g) linfocitos Th0. Las barras centrales representan la media más la desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con ANOVA y post hoc de Tukey (b) o prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn (a, c, d, e, f, g),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

Por otra parte, al evaluar los niveles de las citocinas asociadas al perfil inflamatorio, observamos que la concentración de MCP-1 tiende a ser mayor al nacimiento y disminuye conforme aumenta la edad (Figura 20m), mientras que la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 tiende a ser más abundante desde el primer mes de vida y permanecer así hasta los tres meses de edad (Figura 20a, 20b y 20h respectivamente), además, la concentración de IL-12p70 y de IFN- $\gamma$  es significativamente mayor en este periodo de edad con respecto al grupo de recién nacidos (Figura 20d,  $p = 0.0470$ ; Figura 20k,  $p = 0.0009$ ). Ahora bien, la concentración de IL-18 tiende a ser mayor en el grupo de infantes de cuatro a seis meses de vida (Figura 20g), adicionalmente, las citocinas IL-17A, IL-33, IFN- $\alpha$ 2 y TNF- $\alpha$  son más abundantes en este grupo de

neonatos en comparación con recién nacidos (Figura 20f,  $p = 0.0158$ ; Figura 20i y 20j,  $p = 0.0440$  y  $p = 0.0152$ , respectivamente; Figura 20l,  $p = 0.0132$ ). Respecto a IL-10, exhibe una tendencia de mayor concentración en infantes de entre 7 y 9 meses de edad (Figura 20e).



**Figura 20. Concentraciones plasmáticas de citocinas en recién nacidos e infantes ENI.** En plasma de recién nacidos ( $n=15$ ) e infantes ENI de diferentes meses de edad, 1 a 3 ( $n=21$ ), 4 a 6 ( $n=23$ ), 7 a 9 ( $n=10$ ) y mayores a 9 meses ( $n=6$ ), se cuantificó la concentración de las citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) IL-8, d) IL-12p70, e) IL-10, f) IL-17A, g) IL-18, h) IL-23, i) IL-33, j) IFN- $\alpha$ 2, k) IFN- $\gamma$ , l) TNF- $\alpha$  y m) MCP-1 a través de inmunoensayos múltiples basados en perlas y analizadas mediante citometría de flujo. Las barras centrales representan la media más la desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con prueba Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn,  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.001$  (\*\*).

Estos resultados indicarían que, al nacimiento, la expresión de CD80 y CD86 en mDC y pDC promueve la diferenciación de linfocitos Th0 a linfocitos T reguladores, generando un perfil regulador a costa de uno efector. Posteriormente, a los 4 meses de nacidos, dichas moléculas de coestimulación empiezan a generar linfocitos Th1, luego, a partir de los 7 meses y hasta después de los 9 meses de edad, CD80 y CD86 generan

respuestas efectoras, es decir, los infantes ENI comienzan a generar linfocitos efectores meses después que los neonatos NENI, prefiriendo un ambiente inmunomodulador al nacimiento. Lo anterior, plantea la posibilidad de que la respuesta inmune de los infantes ENI madura conforme ellos se desarrollan, incrementando las respuestas diferenciadas de tipo efector, así como de carácter regulador con el reflejo de las citocinas que acompañan a cada uno de los perfiles.

## 8. DISCUSIÓN

Las mujeres embarazadas infectadas por el VIH poseen una elevada probabilidad de transmitir el virus a su descendencia durante el embarazo, el parto o la lactancia, sin embargo, gracias a la implementación de la terapia antirretroviral, dicha transmisión ha disminuido considerablemente. No obstante, los recién nacidos ENI tienen mayores tasas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas en comparación con recién nacidos NENI (Brennan et al., 2016; Mellqvist et al., 2021; Slogrove et al., 2016), lo que sugiere una disfunción en los componentes de su respuesta inmune innata y adaptativa. En este trabajo, exploramos la asociación de mDC y pDC, así como los marcadores CD80 y CD86, con el grado de diferenciación de los linfocitos Th y con el perfil de citocinas séricas de recién nacidos ENI.

En nuestra población materna, todos los esquemas antirretrovirales constan de una combinación de dos inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos y un inhibidor de otro grupo farmacológico, siendo el tratamiento predominante raltegravir, emtricitabina y tenofovir, seguido del esquema efavirenz, tenofovir y emtricitabina (Tabla 3). Lo anterior, podría estar impactando en la talla y peso de sus recién nacidos que, si bien no muestran diferencias significativas respecto al grupo control (Tabla 4), las mediciones de los neonatos ENI están por debajo de los valores de referencia (WHO, 2006). Se ha asociado el bajo peso y talla con el uso de medicamentos antirretrovirales desde la concepción (Powis et al., 2011; C. E. Ruck & Smolen, 2022), además, está documentado que uno de los principales efectos adversos de los antirretrovirales para tratar la infección por el VIH, es la toxicidad mitocondrial: existe evidencia de recién nacidos e infantes ENI que cursan con disfunción mitocondrial como consecuencia de la exposición intrauterina a medicamentos del grupo de los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos (Brogly et al., 2007), sin embargo, aún se desconoce el impacto de esta toxicidad en la salud y desarrollo de la población ENI y debe ser explorado a profundidad en futuras investigaciones.

De igual manera, la exposición a medicamentos antirretrovirales y al ambiente materno alterado por la infección viral, tiene efecto sobre las células dendríticas de recién nacidos ENI (Velilla et al., 2008). Al respecto, encontramos que el porcentaje de células



dendríticas mieloides y plasmacitoides tiende a ser mayor en los neonatos ENI en comparación con los recién nacidos NENI, además, al comparar estas dos subpoblaciones entre sí, observamos que las mDC predominan sobre las pDC. También, la expresión de las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 de mDC tiende a ser mayor en nuestro grupo ENI con relación al grupo control, así como la expresión de CD80 en pDC; en concordancia con nuestros resultados, Velilla y colaboradores, encontraron una expresión basal incrementada de CD80 y CD86 en mDC en sangre de cordón umbilical de recién nacidos ENI en comparación con neonatos sanos (Velilla et al., 2008).

Si bien se ha documentado que en recién nacidos la expresión basal de dichas moléculas es menor respecto a la expresión en adultos (Gold, Donnelly, Cook, Leclair, & Lewinsohn, 2006), nuestros datos sugieren que el comportamiento de CD80 y CD86 en neonatos ENI se asemeja al de los adultos, siendo los valores más elevados. Estos hallazgos a nivel cuantitativo y cualitativo en las células dendríticas mieloides y plasmacitoides de los recién nacidos ENI, son similares a los efectos de la infección y terapia antirretroviral en pacientes VIH positivo cuyo diagnóstico se realizó tempranamente (Chehimi et al., 2002; Marquez-Coello et al., 2019), por lo que es de suma importancia continuar explorando el efecto de la exposición a antígenos del VIH y a medicamentos antirretrovirales en la funcionalidad de las células dendríticas.

Por otra parte, es conocido que el entorno materno perturbado por el VIH también influye en la respuesta inmune adaptativa del recién nacido, particularmente, en los linfocitos T CD4+ (Kakkar et al., 2014). Al respecto, encontramos que el porcentaje de linfocitos T de memoria tiende a ser mayor en neonatos ENI con relación al grupo control, lo cual se ha atribuido a la exposición a antígenos virales desde la gestación (de Deus et al., 2015). Entre las células de memoria, los porcentajes de linfocitos Th1, Th1/Th17 y Treg tienden a ser menores en nuestra población ENI respecto a los neonatos NENI, coincidiendo con lo reportado en un trabajo previo del equipo de investigación, no obstante, en dicho trabajo también encontraron porcentajes disminuidos de linfocitos Th2 y Th17 (Brito-Perez et al., 2021), mientras que aquí reportamos que tales perfiles tienden a ser mayores en el grupo ENI.

Se ha estudiado que al nacimiento, los bebés tienen un sesgo hacia respuestas de tipo Th2 y Treg (Rudd, 2020), interesantemente, en ambos grupos de recién nacidos encontramos que los linfocitos T de memoria más abundantes son los T reguladores seguidos de los Th2 y, si bien esperábamos encontrar una mayor abundancia de linfocitos Th1 debido a los antígenos virales a los que está expuesto el neonato ENI desde la gestación, se ha documentado que los linfocitos Th2 y Treg podrían ayudar a evitar complicaciones inflamatorias asociadas a enfermedades provocadas por virus (Hartana et al., 2022), además, la mayor tendencia de linfocitos Th17 podría deberse a que la respuesta inmune de estos neonatos busca establecer un equilibrio con las respuestas de tolerancia para responder efectivamente contra infecciones (Dzanibe et al., 2022).

La mayor o menor presencia de linfocitos Th diferenciados en recién nacidos ENI, puede ser el resultado del ambiente de citocinas (Mak et al., 2014), que suele ser preferentemente inflamatorio a consecuencia del propio entorno materno alterado debido a la infección (Borges-Almeida et al., 2011; Dirajlal-Fargo et al., 2019; Prendergast et al., 2017). Al caracterizar el perfil sérico de citocinas en nuestra población ENI, las concentraciones de IL-6, IL-12p70, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-33, IFN- $\alpha$ 2 e IFN- $\gamma$  tienden a ser mayores en comparación con los neonatos NENI, en cambio, la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18 y TNF- $\alpha$  tiende a ser menor. Entre las citocinas evaluadas, destacan las tendencias de reducción de IL-18 y TNF- $\alpha$ , porque son fundamentales para la especialización y supervivencia de linfocitos Th1; por otro lado, resaltan las tendencias de mayor concentración de IL-6 e IL-23, que estimulan la diferenciación y proliferación de linfocitos Th17 (Luckheeram et al., 2012; Mak et al., 2014).

Interesantemente, apreciamos que los linfocitos T más abundantes corresponden a los Th0, lo cual sugiere que estas células no se están diferenciando a perfiles efectores debido a una disfuncionalidad en su proceso de especialización. En torno a lo anterior, Brito y colaboradores evaluaron la capacidad intrínseca de los linfocitos T CD4+ para diferenciarse a linfocitos Th1, encontrando que ésta no se encuentra afectada en recién nacidos ENI (Brito-Perez et al., 2021), por ende, la posible disfuncionalidad podría

encontrarse en los procesos extrínsecos. Pensando en que las células dendríticas mieloides y plasmacitoides son las principales células presentadoras de antígeno que activan y estimulan a linfocitos T CD4+ vírgenes mediante presentación de antígeno, expresión de moléculas de coestimulación y secreción de citocinas (Alberts B, 2002; Jain & Pasare, 2017; Mak et al., 2014), exploramos la asociación entre células dendríticas con el grado de diferenciación de linfocitos T cooperadores y el perfil de citocinas sérico en recién nacidos ENI y NENI.

Al evaluar las variables mencionadas en recién nacidos NENI, encontramos que el porcentaje de células dendríticas mieloides y plasmacitoides, así como su expresión de CD80 en la subpoblación mioide y de CD80 y CD86 en el subconjunto plasmacitoide, se correlacionan inversamente con la concentración de las diferentes citocinas cuantificadas, lo que podría ser consecuencia de que las subpoblaciones de células dendríticas son escasas en neonatos y producen niveles más bajos de citocinas proinflamatorias en comparación con las células dendríticas adultas (Papaioannou, Pasztoi, & Schraml, 2018; Tsafaras, Ntontsi, & Xanthou, 2020), además, las células dendríticas neonatales expresan niveles basales más bajos de CD80 y CD86 con respecto a sus contrapartes adultas (Lau-Kilby et al., 2020).

Estos hallazgos nos sugieren que la coestimulación de estas células puede estar restringida en recién nacidos, aunque no lo suficiente como para afectar la diferenciación de linfocitos T CD4+, pues observamos que correlacionan positivamente con el estado de transición Th1/Th17 y con los perfiles Th2 y Th17. Interesantemente, apreciamos una correlación negativa entre linfocitos T reguladores y la expresión de CD86 en mDC, al respecto, las células T reguladoras están implicadas en la inhibición de la proliferación, activación y secreción de citocinas de células dendríticas en adultos (Orsini et al., 2012), sin embargo, los linfocitos T reguladores neonatales poseen una capacidad reducida para inhibir la función de las células dendríticas (Rueda et al., 2015), por lo que nuestros datos pueden indicar que las células dendríticas mieloides y plasmacitoides de recién nacidos sanos, promueven respuestas efectoras y reguladoras que ayudan al neonato a hacer frente a la exposición antigénica a la que está sometido al nacer.

Por el contrario, en recién nacidos ENI observamos que la expresión de CD80 y CD86 en ambas subpoblaciones de células dendríticas, correlaciona de forma positiva con la concentración de las citocinas evaluadas, lo que podría indicar que las células dendríticas de estos neonatos están más activadas debido a la exposición a antígenos virales e inflamación materna, y por ello tienen niveles basales de CD80 y CD86 aumentados, así como una mayor producción de citocinas proinflamatorias en comparación con recién nacidos sanos (Dirajlal-Fargo et al., 2019; Dzanibe, Jaspan, Zulu, Kiravu, & Gray, 2019).

No obstante, ambas moléculas de coestimulación se correlacionan de forma negativa con el estado de transición Th1/Th17 y con los perfiles Th1, Th2 y Th17, es decir, pese a la mayor activación de las células dendríticas, éstas no logran generar perfiles efectoras de linfocitos T CD4+, más bien prefieren inducir respuestas de regulación, pues apreciamos que la expresión de CD86 en mDC se relaciona positivamente con los linfocitos T reguladores, quienes a su vez poseen una correlación positiva con las citocinas cuantificadas, sugiriendo que la mayor activación de células dendríticas mieloides y plasmacitoides promueve un ambiente regulador a costa de respuestas efectoras.

A propósito de las poblaciones de linfocitos T cooperadores, se ha observado que al nacimiento la diferenciación de linfocitos T CD4+ está sesgada hacia un perfil Th2 que se antepone a linfocitos Th1, induciendo la apoptosis de estos últimos a través del incremento de la concentración de IL-4, cuya finalidad es evitar una respuesta inflamatoria excesiva que sea perjudicial para el neonato (Debock & Flamand, 2014; Rudd, 2020), sin embargo, en nuestra población de recién nacidos ENI observamos que la presencia de células Th1 se relaciona con la presencia de linfocitos Th2, siendo el resultado de la exposición gestacional a antígenos virales maternos, antígenos derivados de otras infecciones maternas y al ambiente inflamatorio uterino que induce la producción de ambos linfocitos para generar respuestas de protección contra patógenos intracelulares y extracelulares (Semmes et al., 2020; Zaghouani, Hoeman, & Adkins, 2009).

Estos resultados plantean la posibilidad de una disfuncionalidad en las células dendríticas de los neonatos ENI ya que, si bien presentan una mayor activación, tienen características fenotípicas y funcionales que difieren de las células dendríticas de neonatos sanos, además, tales diferencias se mantienen durante los primeros meses posteriores al nacimiento, indicando un deterioro en el desarrollo y función de dichas células (Jalbert et al., 2022). Sumado a lo anterior, un aumento de células T reguladoras tiene como consecuencia la disminución de la funcionalidad de linfocitos T diferenciados (Brito-Perez et al., 2021; Jalbert et al., 2019), lo que podría contribuir a un desequilibrio inmunológico en recién nacidos ENI que los hace susceptibles a enfermedades infecciosas a lo largo de su primer año de vida.

Respecto al desarrollo del sistema inmunológico desde el nacimiento y durante los primeros 12 meses de vida, se ha reportado que sus componentes van madurando conforme el neonato se enfrenta a diversos estímulos ambientales (Olin et al., 2018). Las células dendríticas plasmacitoides predominan sobre las mieloides al nacimiento, posteriormente, ambas subpoblaciones tienden a disminuir conforme el infante crece, siendo críticos los primeros tres meses de vida para el desarrollo de estas células, adicionalmente, la expresión de CD80 y CD86 en mDC se asemeja a la de un adulto a la edad de tres meses, mientras que en pDC, se da entre los seis y nueve meses de edad (Georgountzou & Papadopoulos, 2017; Olin et al., 2018; Orsini et al., 2012).

Interesantemente, en infantes ENI observamos que las mDC predominan al nacimiento y se mantienen constantes a lo largo de los primeros 12 meses de nacidos al igual que su expresión de CD86, mientras tanto las pDC tienden a incrementarse conforme crece el neonato, alcanzando un porcentaje máximo en el periodo comprendido de cuatro a seis meses de vida, sin embargo, su expresión de CD80 y CD86 es semejante entre los infantes de diferentes meses de edad. Lo anterior, nos sugiere que la mayor activación de las células dendríticas mieloides se da al nacimiento y se mantiene constante en el transcurso del primer año de vida, difiriendo del desarrollo en infantes sanos; por su parte, las pDC llegan a una maduración cuantitativa y cualitativa similar a la de los adultos, a partir de los cuatro meses de edad.

En cuanto al desarrollo de linfocitos T CD4+, al nacimiento hay un entorno mayormente inmunomodulador a consecuencia de abundantes linfocitos T reguladores necesarios para el desarrollo fetal a lo largo del embarazo; además, los linfocitos Th0 son numerosos al nacer debido a que el neonato no ha entrado en contacto con antígenos ambientales (Brodin & Davis, 2017; Rackaityte & Halkias, 2020). Lo anterior, condiciona a una menor presencia de linfocitos T efectores que se ha asociado con la susceptibilidad de los recién nacidos a adquirir enfermedades infecciosas, no obstante, conforme el neonato crece y se expone a diversos estímulos, los porcentajes de linfocitos Th incrementan, mientras que los de linfocitos Th0 disminuyen (Carr et al., 2016).

Ahora bien, en los recién nacidos e infantes ENI apreciamos que el porcentaje de linfocitos T reguladores permanece constante, es decir, que el ambiente inmunomodulador se mantiene durante su primer año de vida, probablemente para tolerar la predisposición inflamatoria a la que están sometidos desde el embarazo a consecuencia de la infección materna por el VIH y otras infecciones de carácter bacteriano y fúngico (Rackaityte & Halkias, 2020; Semmes et al., 2020; Zaghoulani et al., 2009). Por otro lado, las respuestas efectoras aumentan a la par del desarrollo postnatal, particularmente, los linfocitos Th1 y Th17 tienden a ser más abundantes en infantes mayores a 9 meses de edad, coincidiendo con el desarrollo celular de infantes sanos (Carr et al., 2016; Olin et al., 2018); cabe resaltar que, a partir de los cuatro meses, los linfocitos Th1 se antepone a la presencia de células Th2, lo que nos sugiere que la población ENI exhibe un comportamiento observado al nacimiento en sujetos sanos, meses después de haber nacido.

Cabe destacar que, si bien el porcentaje de linfocitos T efectores aumenta conforme incrementa la edad, los linfocitos Th0 y Treg permanecen abundantes durante los primeros 12 meses posteriores al nacimiento, sugiriendo que la disfuncionalidad en el proceso de diferenciación de estos linfocitos se mantiene en el transcurso del primer año de vida de nuestra población ENI para controlar el efecto inflamatorio derivado de la exposición antigénica.

Lo anterior, no solo puede ser el resultado de la expresión alterada de CD80 y CD86 descrita en células dendríticas mieloides y plasmacitoides, también podría ser producto del ambiente de citocinas. Encontramos que la concentración de IFN- $\gamma$  e IL-12p70 es mayor en neonatos de 1 a 3 meses de vida en comparación con recién nacidos, interesantemente, tal incremento coincide con el aumento en el porcentaje de linfocitos Th1 en infantes de la misma edad, además, apreciamos una tendencia de mayor concentración de IL-18 en infantes mayores a 9 meses y se refleja en abundantes linfocitos Th1 a esta edad; de igual manera, observamos una tendencia de mayor concentración de IL-6 e IL-23 en el periodo comprendido de 1 a 6 meses después del nacimiento, concordando con el aumento de linfocitos Th17.

Estos hallazgos sugieren que al incrementar la concentración de las citocinas involucradas en la diferenciación y proliferación de cada perfil Th, aumentan los porcentajes de los linfocitos T cooperadores correspondientes, coincidiendo con el desarrollo de los componentes del sistema inmunológico adaptativo de recién nacidos e infantes sanos, en quienes se ha reportado un incremento de linfocitos Th1, Th17 y Th2 dependiente del perfil de citocinas (Georgountzou & Papadopoulos, 2017; Rudd, 2020). Cabe mencionar que la producción de citocinas por parte de las células dendríticas, está sujeta a los antígenos ambientales a los que se expone el individuo, y por ello difiere acorde a la edad y nacionalidad (Georgountzou & Papadopoulos, 2017; Olin et al., 2018), por lo que es necesario seguir investigando.

Entre las limitaciones del presente trabajo, se encuentra el uso de sangre de cordón umbilical de recién nacidos NENI y de sangre periférica de neonatos ENI que, si bien se ha descrito que al nacimiento la proporción y funcionalidad de los componentes celulares del sistema inmunológico son comparables entre ambos compartimentos (A. Hansen, Forbes, & Buck, 2005; A. P. Hansen et al., 2022; Li et al., 1999), no se descarta la posibilidad de que esta diferencia influya en los resultados. Sin embargo, por razones éticas no es posible obtener muestras de sangre periférica de recién nacidos e infantes que no presenten un problema de salud, por ello tampoco tuvimos grupos control de diferentes meses de edad para contrastar el seguimiento inmunológico de los infantes ENI. Adicionalmente, el tamaño de muestra de los recién

nacidos NENI es pequeño debido a que nacieron de mujeres que ingresaron al hospital por sospecha de COVID-19, pero que arrojaron un resultado negativo.

Los hallazgos encontrados en este trabajo, pueden ser la base de futuras investigaciones enfocadas en el impacto de la infección materna por VIH y de la terapia antirretroviral en células dendríticas mieloides y plasmacitoides de recién nacidos ENI. Además, podría orientar al estudio de las disfuncionalidades presentes en estas subpoblaciones celulares que repercuten en el proceso de diferenciación de linfocitos T CD4+, cuya consecuencia corresponde a porcentajes disminuidos de células Th que hacen al neonato ENI más susceptible de padecer enfermedades infecciosas.

## **9. CONCLUSIÓN**

Las mDC y pDC de recién nacidos ENI, se relacionan con la presencia de linfocitos T reguladores y con el perfil sérico de citocinas predominantemente inflamatorias; no obstante, pese a la mayor activación de mDC y pDC, éstas no se asocian con perfiles efectoros de linfocitos T cooperadores, lo que nos sugiere que las células dendríticas promueven un ambiente inmunomodulador sobre respuestas efectoras, generando un desequilibrio inmunológico en estos neonatos que podría contribuir a su mayor susceptibilidad de adquirir infecciones de forma más recurrente durante su primer año de vida.



## 10. REFERENCIAS

- Abdi, F., Alimoradi, Z., & Alidost, F. J. F. V. (2019). Pregnancy outcomes and effects of antiretroviral drugs in HIV-positive pregnant women: A systematic review. *Future Virology*, 14(3), 197-210.
- Abu-Raya, B., Kollmann, T. R., Marchant, A., & MacGillivray, D. M. (2016). The Immune System of HIV-Exposed Uninfected Infants. *Front Immunol*, 7, 383. doi:10.3389/fimmu.2016.00383
- Afran, L., Garcia Knight, M., Nduati, E., Urban, B. C., Heyderman, R. S., & Rowland-Jones, S. L. (2014). HIV-exposed uninfected children: a growing population with a vulnerable immune system? *Clin Exp Immunol*, 176(1), 11-22. doi:10.1111/cei.12251
- Alberts B, J. A., Lewis J, et al. (2002). Helper T Cells and Lymphocyte Activation. In *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Arikawa, S., Rollins, N., Newell, M. L., & Becquet, R. (2016). Mortality risk and associated factors in HIV-exposed, uninfected children. *Trop Med Int Health*, 21(6), 720-734. doi:10.1111/tmi.12695
- Baroncelli, S., Galluzzo, C. M., Orlando, S., Mphwere, R., Kavalo, T., Luhanga, R., . . . Giuliano, M. (2022). Immunoglobulin G passive transfer from mothers to infants: total IgG, IgG subclasses and specific antipneumococcal IgG in 6-week Malawian infants exposed or unexposed to HIV. *BMC Infect Dis*, 22(1), 342. doi:10.1186/s12879-022-07335-0
- Borges-Almeida, E., Milanez, H. M., Vilela, M. M., Cunha, F. G., Abramczuk, B. M., Reis-Alves, S. C., . . . Lorand-Metze, I. (2011). The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC Infect Dis*, 11, 38. doi:10.1186/1471-2334-11-38
- Brennan, A. T., Bonawitz, R., Gill, C. J., Thea, D. M., Kleinman, M., Useem, J., . . . Fox, M. P. (2016). A meta-analysis assessing all-cause mortality in HIV-exposed uninfected compared with HIV-unexposed uninfected infants and children. *AIDS*, 30(15), 2351-2360. doi:10.1097/QAD.0000000000001211
- Brito-Perez, Y., Camacho-Pacheco, R. T., Plazola-Camacho, N., Soriano-Becerril, D., Coronado-Zarco, I. A., Arreola-Ramirez, G., . . . Mancilla-Herrera, I. (2021).

- Impaired T helper cell responses in human immunodeficiency virus-exposed uninfected newborns. *Immun Inflamm Dis*, 9(4), 1541-1553. doi:10.1002/iid3.507
- Brodin, P., & Davis, M. M. (2017). Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*, 17(1), 21-29. doi:10.1038/nri.2016.125
- Brogly, S. B., Ylitalo, N., Mofenson, L. M., Oleske, J., Van Dyke, R., Crain, M. J., . . . Seage, G. R., 3rd. (2007). In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS*, 21(8), 929-938. doi:10.1097/QAD.0b013e3280d5a786
- Bunders, M. J., Bekker, V., Scherpbier, H. J., Boer, K., Godfried, M., & Kuijpers, T. W. (2005). Haematological parameters of HIV-1-uninfected infants born to HIV-1-infected mothers. *Acta Paediatr*, 94(11), 1571-1577. doi:10.1080/08035250510042951
- Bunders, M. J., van der Loos, C. M., Klarenbeek, P. L., van Hamme, J. L., Boer, K., Wilde, J. C., . . . Kuijpers, T. W. (2012). Memory CD4(+)/CCR5(+) T cells are abundantly present in the gut of newborn infants to facilitate mother-to-child transmission of HIV-1. *Blood*, 120(22), 4383-4390. doi:10.1182/blood-2012-06-437566
- Bunders, M. J., van Hamme, J. L., Jansen, M. H., Boer, K., Kootstra, N. A., & Kuijpers, T. W. (2014). Fetal exposure to HIV-1 alters chemokine receptor expression by CD4+T cells and increases susceptibility to HIV-1. *Sci Rep*, 4, 6690. doi:10.1038/srep06690
- Camacho-Pacheco, R. T. (2019). *Caracterización del perfil de clases y subclases de anticuerpos en infantes expuestos a VIH no infectados*. (Maestría), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
- Carr, E. J., Dooley, J., Garcia-Perez, J. E., Lagou, V., Lee, J. C., Wouters, C., . . . Liston, A. (2016). The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol*, 17(4), 461-468. doi:10.1038/ni.3371
- Chehimi, J., Campbell, D. E., Azzoni, L., Bacheller, D., Papasavvas, E., Jerandi, G., . . . Montaner, L. J. (2002). Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and

- increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol*, 168(9), 4796-4801. doi:10.4049/jimmunol.168.9.4796
- de Deus, N., Moraleda, C., Serna-Bolea, C., Renom, M., Menendez, C., & Naniche, D. (2015). Impact of elevated maternal HIV viral load at delivery on T-cell populations in HIV exposed uninfected infants in Mozambique. *BMC Infect Dis*, 15, 37. doi:10.1186/s12879-015-0766-6
- Debock, I., & Flamand, V. (2014). Unbalanced Neonatal CD4(+) T-Cell Immunity. *Front Immunol*, 5, 393. doi:10.3389/fimmu.2014.00393
- Dirajlal-Fargo, S., Mussi-Pinhata, M. M., Weinberg, A., Yu, Q., Cohen, R., Harris, D. R., . . . Protocol, N. L. (2019). HIV-exposed-uninfected infants have increased inflammation and monocyte activation. *AIDS*, 33(5), 845-853. doi:10.1097/QAD.0000000000002128
- Dzanibe, S., Jaspán, H. B., Zulu, M. Z., Kiravu, A., & Gray, C. M. (2019). Impact of maternal HIV exposure, feeding status, and microbiome on infant cellular immunity. *J Leukoc Biol*, 105(2), 281-289. doi:10.1002/JLB.MR0318-120R
- Dzanibe, S., Lennard, K., Kiravu, A., Seabrook, M. S. S., Alinde, B., Holmes, S. P., . . . Gray, C. M. (2022). Stereotypic Expansion of T Regulatory and Th17 Cells during Infancy Is Disrupted by HIV Exposure and Gut Epithelial Damage. *J Immunol*, 208(1), 27-37. doi:10.4049/jimmunol.2100503
- Georgountzou, A., & Papadopoulos, N. G. (2017). Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood. *Front Immunol*, 8, 957. doi:10.3389/fimmu.2017.00957
- Gold, M. C., Donnelly, E., Cook, M. S., Leclair, C. M., & Lewinsohn, D. A. (2006). Purified neonatal plasmacytoid dendritic cells overcome intrinsic maturation defect with TLR agonist stimulation. *Pediatr Res*, 60(1), 34-37. doi:10.1203/01.pdr.0000220352.13547.f4
- Hansen, A., Forbes, P., & Buck, R. (2005). Potential substitution of cord blood for infant blood in the neonatal sepsis evaluation. *Biol Neonate*, 88(1), 12-18. doi:10.1159/000083946
- Hansen, A. P., Haischer-Rollo, G. D., Shapiro, J. B., Aden, J. K., Abadie, J. M., & Mu, T. S. (2022). The Novel Use of Umbilical Cord Blood to Obtain Complete Blood

- Counts for Critical Neonatal Assessment. *Cureus*, 14(8), e28009. doi:10.7759/cureus.28009
- Hartana, C. A., Garcia-Broncano, P., Rassadkina, Y., Lian, X., Jiang, C., Einkauf, K. B., . . . Lichterfeld, M. (2022). Immune correlates of HIV-1 reservoir cell decline in early-treated infants. *Cell Rep*, 40(3), 111126. doi:10.1016/j.celrep.2022.111126
- Hilligan, K. L., & Ronchese, F. (2020). Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol*, 17(6), 587-599. doi:10.1038/s41423-020-0465-0
- Jain, A., & Pasare, C. (2017). Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *J Immunol*, 198(10), 3791-3800. doi:10.4049/jimmunol.1602000
- Jalbert, E., Ghosh, T., Smith, C., Amaral, F. R., Mussi-Pinhata, M. M., & Weinberg, A. (2022). Impaired functionality of antigen presenting cells in HIV- exposed uninfected infants in the first six months of life. *Front Immunol*, 13, 960313. doi:10.3389/fimmu.2022.960313
- Jalbert, E., Williamson, K. M., Kroehl, M. E., Johnson, M. J., Cutland, C., Madhi, S. A., . . . Weinberg, A. (2019). HIV-Exposed Uninfected Infants Have Increased Regulatory T Cells That Correlate With Decreased T Cell Function. *Front Immunol*, 10, 595. doi:10.3389/fimmu.2019.00595
- Kadowaki, N. (2007). Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol Int*, 56(3), 193-199. doi:10.2332/allergolint.R-07-146
- Kakkar, F., Lamarre, V., Ducruet, T., Boucher, M., Valois, S., Soudeyns, H., & Lapointe, N. J. B. i. d. (2014). Impact of maternal HIV-1 viremia on lymphocyte subsets among HIV-exposed uninfected infants: protective mechanism or immunodeficiency. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1-9.
- Kuhn, L., Kasonde, P., Sinkala, M., Kankasa, C., Semrau, K., Scott, N., . . . Thea, D. M. J. C. I. D. (2005). Does severity of HIV disease in HIV-infected mothers affect mortality and morbidity among their uninfected infants? *Clinical Infectious Diseases*, 41(11), 1654-1661.
- Lau-Kilby, A. W., Turfkruyer, M., Kehl, M., Yang, L., Buchholz, U. J., Hickey, K., & Malloy, A. M. W. (2020). Type I IFN ineffectively activates neonatal dendritic cells

- limiting respiratory antiviral T-cell responses. *Mucosal Immunol*, 13(2), 371-380. doi:10.1038/s41385-019-0234-5
- Lee, H.-G., Cho, M.-Z., Choi, J.-M. J. E., & Medicine, M. (2020). Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *52*(8), 1255-1263.
- Li, K., Liu, J., Fok, T. F., Yau, F. W., Wong, A., Li, C. K., . . . Yuen, P. M. (1999). Human neonatal blood: stem cell content, kinetics of CD34+ cell decline and ex vivo expansion capacity. *Br J Haematol*, 104(1), 178-185. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01147.x
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135. doi:10.1155/2012/925135
- Mak, T. W., Saunders, M. E., & Jett, B. D. (2014). T Cell Development, Activation and Effector Functions. In *Primer to the Immune Response* (pp. 197-226).
- Marquez-Coello, M., Montes de Oca Arjona, M., Martin-Aspas, A., Guerrero Sanchez, F., Fernandez-Gutierrez Del Alamo, C., & Giron-Gonzalez, J. A. (2019). Antiretroviral therapy partially improves the abnormalities of dendritic cells and lymphoid and myeloid regulatory populations in recently infected HIV patients. *Sci Rep*, 9(1), 11654. doi:10.1038/s41598-019-48185-2
- Mellqvist, H., Saggars, R. T., Elfvin, A., Hentz, E., & Ballot, D. E. J. B. p. (2021). The effects of exposure to HIV in neonates at a referral hospital in South Africa. *BMC Pediatrics*, 21(1), 1-8.
- Miyamoto, M., Pessoa, S. D., Ono, E., Machado, D. M., Salomao, R., Succi, R. C., . . . de Moraes-Pinto, M. I. (2010). Low CD4+ T-cell levels and B-cell apoptosis in vertically HIV-exposed noninfected children and adolescents. *J Trop Pediatr*, 56(6), 427-432. doi:10.1093/tropej/fmq024
- Moncunill, G., Dobano, C., Gonzalez, R., Smolen, K. K., Manaca, M. N., Balcells, R., . . . Mayor, A. (2020). Association of Maternal Factors and HIV Infection With Innate Cytokine Responses of Delivering Mothers and Newborns in Mozambique. *Front Microbiol*, 11, 1452. doi:10.3389/fmicb.2020.01452
- Musimbi, Z. D., Rono, M. K., Otieno, J. R., Kibinge, N., Ochola-Oyier, L. I., de Villiers, E. P., & Nduati, E. W. (2019). Peripheral blood mononuclear cell transcriptomes

- reveal an over-representation of down-regulated genes associated with immunity in HIV-exposed uninfected infants. *Sci Rep*, 9(1), 18124. doi:10.1038/s41598-019-54083-4
- Nduati, E. W., Nkumama, I. N., Gambo, F. K., Muema, D. M., Knight, M. G., Hassan, A. S., . . . Urban, B. C. (2016). HIV-Exposed Uninfected Infants Show Robust Memory B-Cell Responses in Spite of a Delayed Accumulation of Memory B Cells: an Observational Study in the First 2 Years of Life. *Clin Vaccine Immunol*, 23(7), 576-585. doi:10.1128/CVI.00149-16
- Olin, A., Henckel, E., Chen, Y., Lakshmikanth, T., Pou, C., Mikes, J., . . . Brodin, P. (2018). Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell*, 174(5), 1277-1292 e1214. doi:10.1016/j.cell.2018.06.045
- Orsini, G., Legitimo, A., Failli, A., Massei, F., Biver, P., & Consolini, R. (2012). Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *Int Immunol*, 24(6), 347-356. doi:10.1093/intimm/dxs006
- Papaioannou, N. E., Pasztoi, M., & Schraml, B. U. (2018). Understanding the Functional Properties of Neonatal Dendritic Cells: A Doorway to Enhance Vaccine Effectiveness? *Front Immunol*, 9, 3123. doi:10.3389/fimmu.2018.03123
- Park, J. E., Jardine, L., Gottgens, B., Teichmann, S. A., & Haniffa, M. (2020). Prenatal development of human immunity. *Science*, 368(6491), 600-603. doi:10.1126/science.aaz9330
- Powis, K. M., Smeaton, L., Ogwu, A., Lockman, S., Dryden-Peterson, S., van Widenfelt, E., . . . Shapiro, R. L. (2011). Effects of in utero antiretroviral exposure on longitudinal growth of HIV-exposed uninfected infants in Botswana. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 56(2), 131-138. doi:10.1097/QAI.0b013e3181ffa4f5
- Prendergast, A. J., Chasekwa, B., Rukobo, S., Govha, M., Mutasa, K., Ntozini, R., & Humphrey, J. H. (2017). Intestinal Damage and Inflammatory Biomarkers in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Exposed and HIV-Infected Zimbabwean Infants. *J Infect Dis*, 216(6), 651-661. doi:10.1093/infdis/jix367
- Rackaityte, E., & Halkias, J. (2020). Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. *Front Immunol*, 11, 588. doi:10.3389/fimmu.2020.00588

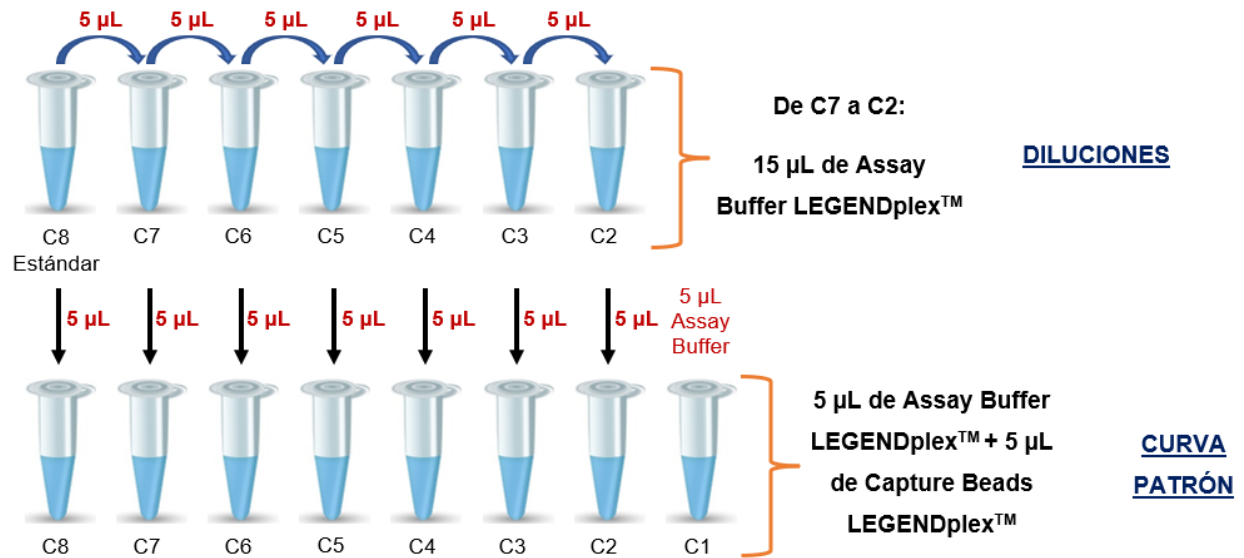
- Reikie, B. A., Adams, R. C. M., Leligdowicz, A., Ho, K., Naidoo, S., Rusk, C. E., . . . Kollmann, T. R. (2014). Altered innate immune development in HIV-exposed uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *66*(3), 245-255. doi:10.1097/QAI.000000000000161
- Ruck, C., Reikie, B. A., Marchant, A., Kollmann, T. R., & Kakkar, F. J. F. i. i. (2016). Linking susceptibility to infectious diseases to immune system abnormalities among HIV-exposed uninfected infants. *Frontiers in Immunology*, *7*, 310.
- Ruck, C. E., & Smolen, K. K. (2022). Effect of maternal HIV infection on infant development and outcomes. *Frontiers in Virology*, *2*. doi:10.3389/fviro.2022.885246
- Rudd, B. D. (2020). Neonatal T Cells: A Reinterpretation. *Annu Rev Immunol*, *38*, 229-247. doi:10.1146/annurev-immunol-091319-083608
- Rueda, C. M., Moreno-Fernandez, M. E., Jackson, C. M., Kallapur, S. G., Jobe, A. H., & Chougnet, C. A. (2015). Neonatal regulatory T cells have reduced capacity to suppress dendritic cell function. *Eur J Immunol*, *45*(9), 2582-2592. doi:10.1002/eji.201445371
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2002). The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res*, *4 Suppl 3*, S127-132. doi:10.1186/ar567
- Schmidt, S. V., Nino-Castro, A. C., & Schultze, J. L. (2012). Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol*, *3*, 274. doi:10.3389/fimmu.2012.00274
- Semmes, E. C., Chen, J. L., Goswami, R., Burt, T. D., Permar, S. R., & Fouda, G. G. (2020). Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. *Front Immunol*, *11*, 595297. doi:10.3389/fimmu.2020.595297
- Sharma, A., Marfatia, Y. S., & Modi, M. (2009). Reproductive tract infections in HIV positive women: A case control study. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*, *30*(1), 16-18. doi:10.4103/0253-7184.55473
- Slogrove, A. L., Goetghebuer, T., Cotton, M. F., Singer, J., & Bettinger, J. A. (2016). Pattern of Infectious Morbidity in HIV-Exposed Uninfected Infants and Children. *Front Immunol*, *7*, 164. doi:10.3389/fimmu.2016.00164

- Slyker, J. A., Lohman-Payne, B., John-Stewart, G. C., Dong, T., Mbori-Ngacha, D., Tapia, K., . . . Blish, C. A. (2012). The impact of HIV-1 infection and exposure on natural killer (NK) cell phenotype in Kenyan infants during the first year of life. *Front Immunol*, 3, 399. doi:10.3389/fimmu.2012.00399
- Stras, S. F., Werner, L., Toothaker, J. M., Olaloye, O. O., Oldham, A. L., McCourt, C. C., . . . Konnikova, L. (2019). Maturation of the Human Intestinal Immune System Occurs Early in Fetal Development. *Dev Cell*, 51(3), 357-373 e355. doi:10.1016/j.devcel.2019.09.008
- Tsafaras, G. P., Ntontsi, P., & Xanthou, G. (2020). Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Front Pediatr*, 8, 5. doi:10.3389/fped.2020.00005
- UNAIDS. (2021). UNAIDS DATA 2021. Retrieved from [https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021\\_unaids\\_data](https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021_unaids_data)
- UNAIDS. (2022). México. Retrieved from <https://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/mexico>
- Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1), 21-30. doi:10.1016/j.inmuno.2011.10.001
- Velilla, P. A., Montoya, C. J., Hoyos, A., Moreno, M. E., Chougnet, C., & Rugeles, M. T. J. C. i. (2008). Effect of intrauterine HIV-1 exposure on the frequency and function of uninfected newborns' dendritic cells. *Clinical Immunology*, 126(3), 243-250.
- WHO. (2006). Child growth standards. Retrieved from <https://www.who.int/tools/child-growth-standards>
- WHO. (2020). HIV/AIDS. Retrieved from [https://www.who.int/health-topics/hiv-aids#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/hiv-aids#tab=tab_1)
- WHO. (2021). Number of pregnant women living with HIV who received antiretrovirals for preventing mother-to-child transmission. Retrieved from <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-pregnant-women-living-with-hiv-who-received-antiretrovirals-for-preventing-mother-to-child-transmission>



- WHO. (2022). Infección por el VIH. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- Ye, Y., Gaugler, B., Mohty, M., & Malard, F. (2020). Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. *Clin Transl Immunology*, 9(5), e1139. doi:10.1002/cti2.1139
- Zaghouani, H., Hoeman, C. M., & Adkins, B. (2009). Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol*, 30(12), 585-591. doi:10.1016/j.it.2009.09.002

## 11. MATERIAL COMPLEMENTARIO



**Figura Complementaria 1. Preparación de curva patrón.** Para cuantificar la concentración de diversas citocinas en plasma de neonatos ENI y NENI, se realizó una curva de referencia paralela al ensayo.

**Tabla Complementaria 1. Características maternas y de los infantes ENI al nacimiento.**

<b>Parámetro</b>	<b>Madres VIH+ (n=75)</b>	<b>Valores de referencia</b>
Edad	28.28 ± 5.17	No aplica
Número de gestas	2.41 ± 1.44	No aplica
Conteo de linfocitos CD4 (célula/μL)	400.44 ± 207.93	(500-1500) célula/μL
Terapia antiretroviral	DRV/TDF/FTC: 10.7% BIC/FTC/TDF: 6.7% RAL/FTC/TDF: 57.3% EFV/TDF/FTC: 12.0% DGT/TDF/FTC: 9.4% DGT/ABC/3TC: 1.3% DRV/DGT/RTV: 1.3% RTV/RAL/DRV: 1.3%	No aplica
<b>Parámetro</b>	<b>Infantes ENI (n=75)</b>	<b>Valores de referencia</b>
Género	Femenino: 44.0% Masculino: 56.0%	No aplica
Talla (cm)	48.23 ± 1.88	(49.1-49.9) cm
Peso (kg)	2.83 ± 0.34	3.2 ± 0.4 kg
Semanas de gestación	37.89 ± 0.89	(38-42) SDG
APGAR	8/9: 93.3% 9/9: 4.0% 9/10: 2.7%	7-10

DRV: darunavir; TDF: tenofovir; FTC: emtricitabina; RAL: raltegravir; BIC: bictegravir; EFV: efavirenz; DGT: dolutegravir; ABC: abacavir; 3TC: lamivudina, RTV: ritonavir, SDG: semanas de gestación. Valores de referencia obtenidos de (WHO, 2006, 2020).