



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Efecto de cefalotina, ampicilina y
eritromicina en el fenotipo y función de
linfocitos T de mujeres en edad reproductiva”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A:
JESSICA BRACAMONTES CHÁVEZ

ASESORA: Dra. Gabriela González Pérez
COASESORA: M. en C. Paola Edith Briseño Lugo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2024



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



UNAM
CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO
DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Efecto de cefalotina, ampicilina y eritromicina en el fenotipo y función de linfocitos T de mujeres en edad reproductiva.

Que presenta la pasante: **Jessica Bracamontes Chávez**

Con número de cuenta: **418061307** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Enero de 2024.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
VOCAL	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
SECRETARIO	M. en C. Rubén Roberto González Fernández	
1er. SUPLENTE	Dra. Alma Herrera Salazar	
2do. SUPLENTE	M. en C. Oscar Rodríguez Espinosa	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

Reconocimiento

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Gabriela González Pérez adscrita al Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer-IER), y forma parte del proyecto 2021-1-12: "Evaluación del efecto del tratamiento con antibióticos en la función de linfocitos T en lactantes prematuros y mujeres en edad reproductiva". Este proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad, y recibió financiamiento del INPer-IER (2021-1-12).

Agradezco el apoyo económico recibido por parte de Becas de Titulación Alto Rendimiento UNAM 2022-2023 para la realización de este trabajo.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por orientarme, darme fuerza y protección en todo este camino. Al Universo por poner en mi camino a personas que me han hecho sentir muy amada y de las que he aprendido un montón. Soy la persona más bendecida al estar rodeada de seres tan maravillosos.

A la Dra. Gaby, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme ser parte de su equipo de trabajo (con el cual me sentía bastante cómoda e integrada). Gracias por compartir sus conocimientos académicos y de la vida. Gracias por su paciencia y apoyo. La admiro mucho como profesional y como persona.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la FES Cuautitlán, para mí era un sueño ser egresada de la máxima casa de estudios y lo logré.

A los sinodales que revisaron este trabajo, en particular, a mi co-asesora, la M. en C. Paola. Gracias a todos por su tiempo y por sus ideas y observaciones compartidas.

A mi familia. Gracias mamá por siempre confiar en mí y en mis sueños; durante toda mi vida te has enfocado en que sea feliz y en el proceso, también me has hecho sentir profundamente amada. Gracias papá por mandarme un mensaje todos los días diciendo lo mucho que me quieres y mandándome la bendición de Dios y de la Virgen. Te amo. Gracias a mis hermanos y a mi hermana por todo su amor. ¡Qué bueno que quisieron ser padres! Gracias a eso conocí a unos seres tan hermosos que siempre que convivimos me hacen sentir muy amada; poder ver crecer a la mayoría es el regalo indirecto más especial de todos. Les amo chiquilles, pronto les veré cumpliendo sus sueños también y seré la tía más orgullosa.

A los mejores amigos que una persona puede pedir. Gracias Ale, Héctor y Jenny. Ustedes son la familia que por muchos años pedí. Gracias por ser y por dejarme ser. Los amo y admiro muchísimo. Gracias Ale por contarme de tus fanfics y de todo lo que te emociona, por compartirme comida, por llegar emocionada a contar un chisme, por compartir noches de escritura conmigo, por abrazarme, por preocuparte por mí cuando yo no lo hacía; gracias por tus constantes demostraciones de amor. Gracias Héctor por cada palabra de aliento y de cariño, por escucharme y leerme, por los pasteles tan ricos de cumpleaños, por tu honestidad y buenos consejos. Amo la forma en la que te entregas a todo aquello que amas. Eres una persona increíble, un maravilloso amigo y un gran científico. Gracias Jenny por encontrarme en esta vida también. Amo la manera en la que conectamos desde el principio y la manera en la que seguimos aprendiendo una de la otra. Gracias por cada abrazo y palabra, porque sé que vienen desde ese corazón tan grande que posees. Nuestra risa al unísono es mi género musical favorito.

A los corazones de kauyumari por ayudarme a comprender desde el amor y proporcionarme lo necesario para encender el fuego de mi corazón.

A Julián y Nori por acompañarme en las madrugadas en las que avanzaba en la tesis. Son los gatitos más lindos y traviosos; y por las noches verlos pelearse era muy divertido. Poder tenerlos cerca al escribir me animaba mucho. Los amo un montón y espero sean los gatos más felices.

Esta sección no podía darse por terminada sin agradecer a Namjoon, Jin, Yoongi, Hobi, Jimin, Tae y Jungkook. Gracias por ser parte de Bangtan. Su música me ha acompañado desde el 2017 y me ha ayudado a superar crisis emocionales y de estrés. Gracias por cada live y por cada episodio de Run BTS, Bon voyage, In the soop y Suchwita. Gracias por hacerme reír, cantar y bailar. Me hacen muy feliz.

Finalmente, gracias Jess. Te amo, te admiro y te honro. Ahora somos el huracán que un viento fuerte jamás podrá tumbar. Por y para ti es este trabajo.

Índice

Índice	7
Índice de figuras	9
Índice de tablas	10
Abreviaturas	11
1. Resumen	12
2. Marco teórico	13
2.1. Mujeres en edad reproductiva	13
2.2. El sistema inmune	14
2.2.1. Activación, diferenciación y memoria de células T	18
2.2.1.1. Desarrollo y activación de células T	18
2.2.1.2. Diferenciación de células T	22
2.2.1.3. Células T de memoria	25
2.2.2. Marcadores de superficie celular	27
2.3. Antibióticos	29
2.3.1. Generalidades	29
2.3.2. Antibióticos prescritos a mujeres embarazadas	34
2.3.3. Efecto de los antibióticos en el sistema inmune	40
2.3.3.1. Efectos del tratamiento con betalactámicos en las células T	40
2.3.3.2. Efectos del tratamiento con macrólidos en las células T	41
2.3.3.3. Efecto de los antibióticos en el sistema inmune de mujeres embarazadas	41
3. Justificación	43
4. Objetivos	44
4.1. Objetivo general	44
4.2. Objetivos específicos	44
5. Hipótesis	44
6. Diseño experimental	45
6.1. Sujetos y condiciones de estudio	45
6.2. Materiales y métodos	45
6.2.1. Preparación de medio de cultivo RPMI-1640	45
6.2.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	45
6.2.3. Conteo de células mediante tinción vital con azul de tripano	46
6.2.4. Cultivo celular en placa	46
6.2.5. Citometría de flujo	47
6.2.6. Uso del programa FlowJo-V10 para analizar los resultados obtenidos en la citometría de flujo	48
6.2.7. Detección de citocinas extracelulares mediante ensayo CBA	48
6.2.8. Análisis estadístico	49
7. Resultados	50
7.1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺	50
7.2. Expresión de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ con CD45RO y CD3	51
7.3. Activación y proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	54
7.4. Expresión de citocinas extracelulares	56

8. Discusión	59
9. Conclusiones	64
10. Referencias	65
Anexos	72
Cálculos	72
Preparación de medio de cultivo RPMI-1640	72
Conteo de células mediante tinción vital con azul de tripano	72
Cultivo celular en placa	72
Antibióticos	73

Índice de figuras

Figura 1.	<i>Visión general del sistema inmune.</i> Modificada de Punt <i>et al.</i> , 2020.	15
Figura 2.	<i>Señales necesarias para la activación de células T.</i> Modificado de Lee <i>et al.</i> , 2020.	20
Figura 3.	<i>Resultados representativos de citometría de flujo de la delimitación de linfocitos T y sus subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺.</i>	50
Figura 4.	<i>Identificación de células T CD4⁺ y CD8⁺.</i>	51
Figura 5.	<i>Resultados representativos de citometría de flujo de la expresión de los marcadores CD3 con CD45RO y CD25 con Ki-67 en la población de células T CD4⁺ y CD8⁺.</i>	52
Figura 6.	<i>Identificación de células T CD4⁺ vírgenes (CD4⁺ CD45RO⁻ CD3⁺) y, células efectoras y de memoria (CD4⁺ CD45RO⁺ CD3⁺).</i>	53
Figura 7.	<i>Identificación de células T CD8⁺ vírgenes (CD8⁺ CD45RO⁻ CD3⁺) y, células efectoras y de memoria (CD8⁺ CD45RO⁺ CD3⁺).</i>	54
Figura 8.	<i>Activación y proliferación en células T CD4⁺.</i>	55
Figura 9.	<i>Activación y proliferación en células T CD8⁺.</i>	56
Figura 10.	<i>Expresión de citocinas extracelulares.</i>	57

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Células inmunes innatas</i>	16
Tabla 2. <i>Desarrollo de los timocitos doble negativo (DN)</i>	19
Tabla 3. <i>Regulación y función de los subconjuntos T cooperadores</i>	23
Tabla 4. <i>Fenotipo y función de los subconjuntos de células T de memoria</i>	27
Tabla 5. <i>Principales tipos de agentes antibacterianos utilizados en terapia sistémica</i>	33
Tabla 6. <i>Patógenos asociados con las complicaciones del embarazo</i>	35

Abreviaturas

APC: Células presentadoras de antígenos (del inglés: *Antigen-Presenting Cells*)

BCR: Receptor de células B (del inglés: *B Cell Receptor*)

CDC: Centros para el control y la prevención de enfermedades (del inglés: *Centers for Disease Control and Prevention*)

CSFs: Factores estimulantes de colonias (del inglés: *Colony-Stimulating Factors*)

CTL: Linfocitos T citotóxicos (del inglés: *Cytotoxic T Lymphocytes*)

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

INPer-IER: Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés: *Major Histocompatibility Complex*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMC: Célula mononuclear de sangre periférica (del inglés: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PC: Parto por cesárea

SLO: Órgano linfoide secundario (del inglés: *Secondary Lymphoid Organ*)

TCR: Receptor de células T (del inglés: *T-Cell Receptor*)

TGF: Factor de crecimiento transformante (del inglés: *Transforming Growth Factor*)

Tfh: Célula T folicular cooperadora (del inglés: *helper*)

Th: Célula T cooperadora (del inglés: *helper*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés: *Tumor Necrosis Factor*)

Treg: Célula T reguladora

1. Resumen

Los antibióticos se prescriben ampliamente a nivel mundial para el tratamiento de infecciones bacterianas, no obstante, con el paso de los años se ha comprobado que muchos de estos fármacos también afectan a las respuestas inmunes de los pacientes. Si bien algunos estudios han explorado el efecto de los antibióticos en el sistema inmune de las mujeres embarazadas, es todavía escasa la investigación que aborda los efectos moduladores en células T tanto de mujeres embarazadas como en mujeres en edad fértil.

El propósito de este trabajo fue identificar el efecto del tratamiento de los principales antibióticos prescritos a mujeres embarazadas en el INPer-IER: Ampicilina, cefalotina y eritromicina; en el fenotipo y función de los linfocitos T (células T) de mujeres en edad reproductiva. Para determinar las características funcionales de activación y proliferación, así como, las características fenotípicas de las células T, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Con la finalidad de presentar mayor información respecto a este tema.

En este estudio piloto participaron 3 mujeres de 26, 29 y 31 años de edad sanas. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que posteriormente fueron estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28. Estas células fueron tratadas con ampicilina (A), cefalotina (C) y eritromicina (E) a distintas concentraciones. Se utilizó un rango de concentraciones que abarcaran las concentraciones máximas séricas de la práctica clínica: 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Obteniendo las siguientes condiciones de estudio: control sin estimular (-), control estimulado (+), A1, A10, A25, A50, C1, C10, C25, C50, E1, E10, E25 y E50. Al control negativo se le añadió únicamente suspensión celular, mientras que en el control positivo, las células agregadas fueron estimuladas con $\alpha\text{-CD3}$ y $\alpha\text{-CD28}$.

Los efectos de los antibióticos en las concentraciones de 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ no resultaron significativos *in vitro*, ni sobre la función ni sobre el fenotipo de las células T de donantes humanos sanos. Los datos obtenidos en este trabajo sobre los efectos de la ampicilina y cefalotina son similares a aquellos estudios en los que se ha informado que al utilizar concentraciones de los betalactámicos que se observan normalmente en la práctica clínica no se presentan efectos supresores significativos en las células T. En otras investigaciones se ha encontrado que las cefalosporinas suprimieron las respuestas proliferativas a partir de concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que, en los macrólidos obtuvimos datos que contrastan con la literatura. Ya que, en varios estudios se han observado efectos supresores a partir de concentraciones mínimas, como es 1 $\mu\text{g/mL}$; aumentando significativamente la supresión funcional conforme aumenta la concentración.

2. Marco teórico

2.1. Mujeres en edad reproductiva

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la etapa reproductiva de la mujer se define entre los 15 y los 44 años de edad (Organización Mundial de la Salud, 2018). Sin embargo, la fertilidad alcanza su punto más alto desde el final de la adolescencia, la cual según la OMS comprende de los 10 a los 19 años (Organización Mundial de la Salud, 2018), hasta el final de los 20 años; es decir que, esta fase comprende desde los 19 hasta los 29 años de edad, y luego comienza a disminuir. La atención primaria para las mujeres en edad reproductiva debe incluir la evaluación rutinaria de los objetivos reproductivos de la mujer y sus intenciones de embarazo (planificación reproductiva) (Callegari et al., 2015).

El Plan de Vida Reproductiva es un protocolo creado en Estados Unidos por los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) que consiste en un conjunto de preguntas para guiar una conversación sobre si una persona podría querer ser padre y cuándo (Tydén et al., 2016). En México se cuenta con el Programa de Planificación Familiar y Anticoncepción, cuyo principal objetivo es fomentar una actitud responsable frente a la reproducción. Para algunos, esto puede consistir en la provisión de un método anticonceptivo adecuado, mientras que para otros puede llevar a la provisión de asesoramiento y atención para optimizar la salud antes del embarazo para mejorar los resultados del parto y nacimiento del neonato (Secretaría de Salud, 2015). Independientemente de la decisión de la persona, es esencial que los proveedores de atención sanitaria traten de apoyar la autonomía y las intenciones de la paciente para que los embarazos sean deseados, planificados y lo más saludables posible (Tydén et al., 2016).

Muchas mujeres que no tienen intención de quedarse embarazadas a corto plazo experimentarán, no obstante, un embarazo no deseado; por lo tanto, los médicos de cabecera deben abordar de forma proactiva los planes anticonceptivos de la mujer y los riesgos de salud previos a la concepción siempre que sea posible en cada visita (Callegari et al., 2015).

Debido a todos los cambios que ocurren en el cuerpo de la mujer durante el embarazo, el periodo preconcepcional se reconoce cada vez más como una "ventana de oportunidad" para mejorar los resultados relacionados con la salud materna, fetal e infantil (De Wolff et al., 2021).

2.2. El sistema inmune

El sistema inmune comprende muchas estructuras y procesos biológicos dentro de un organismo para distinguir lo extraño de lo propio y para reaccionar ante lo no propio (Wik & Skålhegg, 2022). Si bien se hace referencia al “sistema inmune”, es importante comprender que existen dos sistemas de respuesta interconectados: innato y adaptativo (Punt et al., 2020). El reconocimiento de patógenos invasores por parte del sistema inmune innato es crucial para una respuesta inmune adaptativa eficaz, por lo que, si un patógeno concreto evade el sistema inmune innato, la respuesta posterior del sistema adaptativo puede ser muy deficiente (Kim et al., 2019).

Asimismo, el sistema inmune cuenta con una red especializada de órganos. La organización del sistema inmune dentro de estos órganos permite una respuesta inmune regulada capaz de producir rápidamente un gran número de células que pueden detener una infección en expansión. Desde estos reservorios inmunológicos pueden liberarse células y moléculas inmunitarias que penetran en casi cualquier tejido del organismo (McComb et al., 2019). Los órganos linfoides se clasifican en:

- Primarios, que incluyen la médula ósea y el timo; son sitios donde las células inmunitarias se desarrollan a partir de precursores inmaduros (Punt et al., 2020).
- Secundarios, incluidos el bazo, los ganglios linfáticos y los sitios especializados en el intestino y otros tejidos de la mucosa; son zonas donde los linfocitos maduros específicos para un antígeno, primero se encuentran con el antígeno y después comienzan su diferenciación en células efectoras y de memoria (Punt et al., 2020).

Uno de los componentes más importantes del sistema inmune son las citocinas. Consideradas el lenguaje de este sistema, las citocinas cuentan con funciones de inmunoregulación (p.ej. IFN- γ), pro-inflamación (IL-1, TNF- α), anti-inflamación (TGF- β , IL-10), crecimiento (CSFs), diferenciación (IL-4, IL-13) y quimiocinas (CXCL9) (Riedel et al., 2020).

Las primeras líneas de defensa contra los patógenos infecciosos son las barreras físicas y químicas de la piel y las mucosas, que separan el medio externo del interno. Las barreras anatómicas se defienden contra la colonización microbiana mediante una variedad de mecanismos: mecánicos (cilios, flujo de líquido, contracción del músculo liso), químicos (pH, enzimas, péptidos antimicrobianos) y celulares (macrófagos residentes y células dendríticas) (Punt et al., 2020). Por su parte, el antagonismo microbiano por parte de la microbiota (microorganismos comensales), actúa como una barrera biológica. Cada una de estas especies compiten por nutrientes, por lo cual desarrollan estrategias para coexistir y defender su nicho (Levinson et al., 2022).

Otras barreras biológicas primarias son la inmunoglobulina (Ig) A y el sistema del complemento. La IgA secretada por las superficies mucosas se une a bacterias, virus y toxinas, y así evita que se adhieran a la capa epitelial. Mientras que el sistema del complemento, compuesto por más de 20 proteínas, en este contexto se encarga de lisar bacterias y membranas celulares, opsonizar microbios potencialmente patógenos e inducir una respuesta inflamatoria que ayuda a guiar a los leucocitos (granulocitos, monocitos y linfocitos) hacia el sitio de la infección (Punt et al., 2020; Levinson et al., 2022).

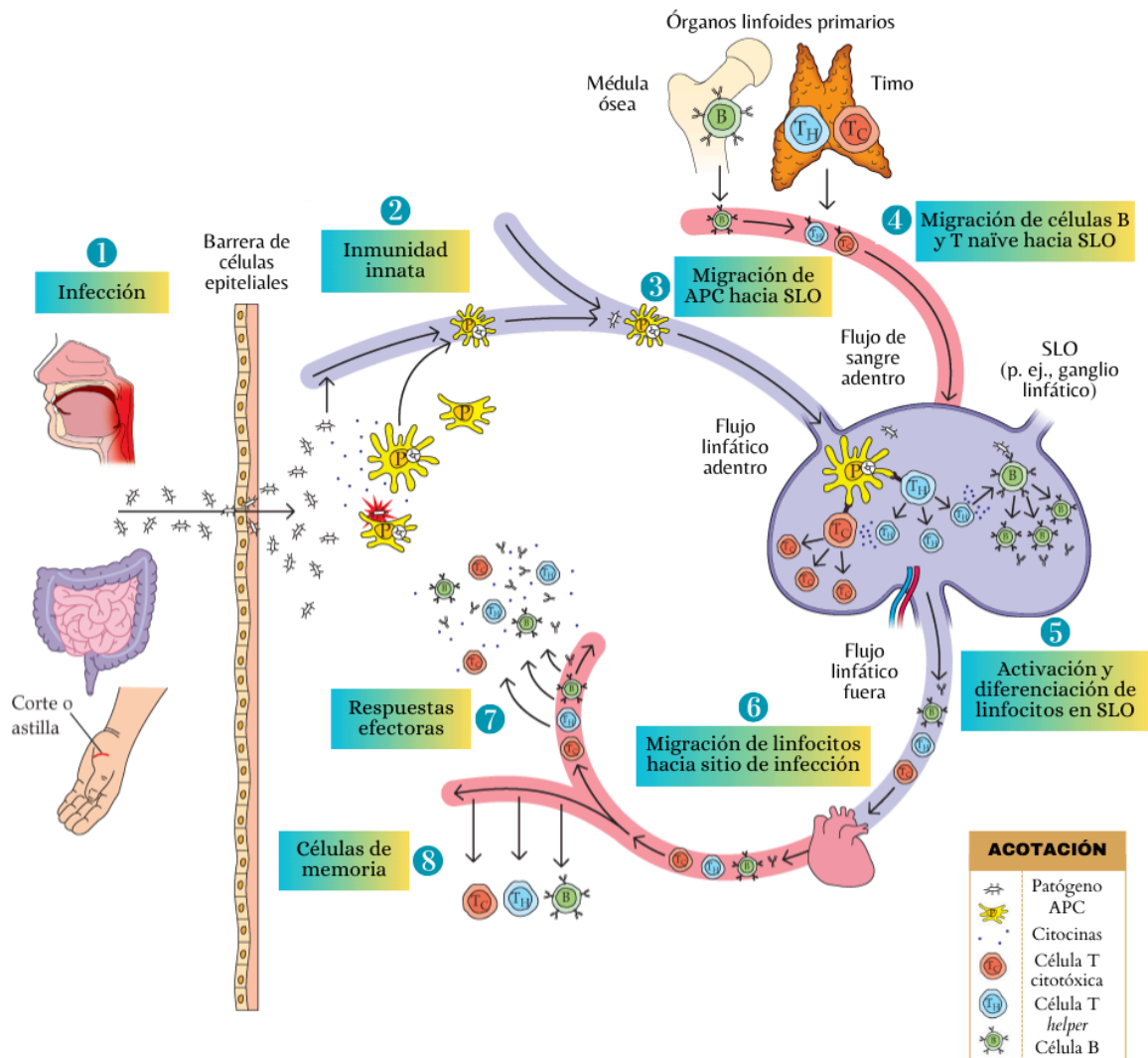


Figura 1. Visión general del sistema inmune. Modificada de Punt et al., 2020
 APC: Células presentadoras de antígenos (del inglés, *antigen-presenting cells*)
 SLO: Órgano linfoide secundario (del inglés, *secondary lymphoid organ*)

La ruptura de las barreras permite a los patógenos entrar en el organismo (Fig. 1), por lo que se requiere la activación del sistema inmune innato para eliminar la infección (Wik & Skálhegg, 2022).

Las respuestas inmunes innatas se producen entre unos minutos y varias horas después de la exposición inicial a patógenos o toxinas, y se considera generalmente como rápida e inespecífica con falta de memoria, lo que permite que la respuesta inmune innata impida la invasión microbiana a través de una variedad de tipos celulares (Kim et al., 2019). Los tipos de células inmunes innatas de respuesta rápida son los granulocitos (células polimorfonucleares: neutrófilos, eosinófilos y basófilos), los mastocitos, los macrófagos y las células dendríticas (Levinson *et al.*, 2022) (Tabla 1).

Tabla 1 <i>Células inmunes innatas</i>			
Célula	Características	Funciones clave	Interacción con inmunidad adaptativa
Macrófago	Fagocitos grandes, localizados en todos los tejidos, expresión del MHC de clase II	Engulle y mata varias clases de microorganismos, elimina desechos, repara tejidos	Poseen receptores IgG de superficie que facilitan la fagocitosis (opsonización), activados por IFN- γ , TNF- α de las células T, APC profesional
Célula dendrítica	Célula centinela con ramas largas; residen en barreras epiteliales y órganos linfoides secundarios; expresión de MHC de clase II	Captación y presentación de antígenos, incluida la presentación cruzada	APC profesional, principal responsable de la activación de las células T vírgenes
Neutrófilo	Leucocito más abundante en la sangre y el primero en responder ante un tejido inflamado o necrótico	Engulle y mata bacterias y hongos, digiere desechos celulares	Atraído hacia los tejidos por las quimiocinas, que aumentan con la IL-17 derivada de las células T
Eosinófilo	El principal contenido de los gránulos de los eosinófilos es de proteína básica; la eotaxina los recluta en el tejido inflamado	Las proteínas granulares son tóxicas para las células; implicado en el asma y las enfermedades alérgicas; protector contra las infecciones invasivas por helmintos	Receptores de IgE de superficie; maduración y supervivencia respaldadas por la IL-5 de las células T
Basófilo	Presente en baja frecuencia en la sangre	Libera histamina, proteasas, quimiocinas y citocinas; contribuye a la enfermedad alérgica y la anafilaxia	Los receptores de IgE contienen moléculas de IgE que buscan antígenos
Mastocito	Distribuido a través de los tejidos alrededor de la vasculatura		

Modificada de Levinson *et al.*, 2022

La respuesta celular del sistema innato también implica receptores codificados en la línea germinal capaces de identificar patrones moleculares comunes asociados a patógenos (Kim et al., 2019). Las células presentadoras de antígenos (APC), como los macrófagos y las células dendríticas, poseen receptores de reconocimiento de patrones que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos característicos de virus y bacterias, así como, patrones moleculares asociados a daños (Kim et al., 2019; Wik & Skálhegg, 2022). Los receptores de reconocimiento de patrones mejor estudiados son los receptores tipo Toll, los cuales reconocen rápidamente moléculas señal, como el lipopolisacárido de membrana externa de las bacterias gramnegativas, e inician la activación de vías antimicrobianas para la eliminación directa de las bacterias (Kim et al., 2019).

Tanto las células dendríticas como los macrófagos suelen denominarse células presentadoras de antígenos debido a su eficaz capacidad para internalizar patógenos y presentar péptidos patógenos en su superficie celular. El término antígeno se refiere a una molécula que puede evocar una respuesta inmunitaria adaptativa específica, y en este caso, el antígeno son los fragmentos de péptidos patógenos. Las células capaces de presentar antígenos pueden subclasificarse como APC profesionales o no profesionales. Las APC profesionales, como los macrófagos, las células dendríticas y las células B, también expresan moléculas coestimuladoras de la superficie celular para activar las células T vírgenes, como CD80 y CD86; mientras que las APC no profesionales, como un fibroblasto, una célula epitelial tímica o una célula endotelial vascular, sólo expresan el complejo principal de histocompatibilidad (MHC)-I en presencia de determinadas citocinas y no expresan moléculas coestimuladoras (McComb et al., 2019).

En muchos casos, el patógeno infeccioso es eliminado por las rápidas acciones de la respuesta inmune innata descritas anteriormente. Sin embargo, en algunos casos se requiere una respuesta más específica. Por esta razón, mientras que algunas células inmunes innatas participan en el ataque directo al patógeno, los macrófagos y las células dendríticas también transportan patógenos y/o restos de patógenos a un ganglio linfático para activar la inmunidad adaptativa (McComb et al., 2019) (Fig.1).

La rama adaptativa de la respuesta inmune evoluciona en tiempo real en respuesta a la infección y se adapta (de ahí el nombre) para reconocer, eliminar y recordar mejor al patógeno invasor. Las respuestas adaptativas implican un sistema complejo e interconectado de células y señales químicas que se unen para finalizar el trabajo iniciado durante la respuesta inmune innata (Punt et al., 2020). La inmunidad adaptativa consiste en linfocitos B y T (células B y T), que reconocen y atacan específicamente a los patógenos invasores (Kim et al., 2019) (Fig.1).

Las células B se activan y se diferencian en células plasmáticas que producen inmunoglobulinas, comúnmente denominadas anticuerpos, tras la interacción entre antígenos solubles que se unen al receptor de células B (BCR). Por otro lado, las células T se activan mediante interacciones célula a célula cuando el receptor de células T (TCR) encuentra antígenos peptídicos que les presentan las APC (Wik & Skålhegg, 2022).

Las APC presentan antígenos a través de las moléculas MHC-I o MHC-II, que interactúan con las dos subpoblaciones principales de células T, las células T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente. Las células T CD8⁺ también se denominan linfocitos T citotóxicos (CTL), mientras que las células T CD4⁺ se designan como células T cooperadoras o *helper* (Th) (Wik & Skålhegg, 2022).

Un atributo particularmente significativo y único de la rama adaptativa de la respuesta inmune es la memoria inmunológica (Punt et al., 2020). Una vez eliminado el patógeno invasor, la mayoría de las células adaptativas mueren y dejan tras de sí subconjuntos de células de memoria (Fig.1). Estas células de memoria ofrecen una respuesta inmune secundaria, la cual es más rápida y eficaz en caso de reinfección, además, estas células pueden sobrevivir de 8 a 15 años en promedio (aunque existen casos reportados de respuestas más longevas) (Pennock et al., 2013; Punt et al., 2020).

Es conveniente recalcar que para casi todas las funciones del sistema inmune adaptativo la respuesta de las células T es fundamental. La respuesta de las células T se puede dividir en tres etapas principales: activación, diferenciación y formación de células de memoria (Pennock et al., 2013).

2.2.1. Activación, diferenciación y memoria de células T

2.2.1.1. Desarrollo y activación de células T

Los linfocitos T son una subclase de leucocitos derivados de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Comienzan a madurar cuando un pequeño número de células precursoras de linfocitos migran al timo. Cuando estas células precursoras llegan al timo, carecen de las moléculas detectables de superficie CD4 y CD8 (CD4⁻CD8⁻), de ahí que se les denomine células doble negativo (DN) (Kim et al., 2019; Punt et al., 2020). Los linfocitos T DN se pueden dividir en cuatro subconjuntos, DN1 a DN4, en función de la presencia o ausencia de otras moléculas de la superficie celular (Tabla 2). Entre estas moléculas se incluyen el c-Kit (CD117), el cual es un receptor del factor de crecimiento de las células madre; CD44, una molécula de adhesión; y CD25, la cadena α del receptor de la interleucina (IL)-2 que promueve la proliferación de las células T activadas (Punt et al., 2020).

Tabla 2 <i>Desarrollo de los timocitos doble negativo (DN)</i>			
Subconjunto	Fenotipo	Ubicación	Descripción de la etapa
DN1	c-Kit (CD117) ⁺⁺ , CD44 ⁺ , CD25 ⁻	De la médula ósea al timo	Migración al timo; no expresan ninguna proteína receptora de células T en su superficie
DN2	c-Kit (CD117) ⁺⁺ , CD44 ⁺ , CD25 ⁺	Corteza subcapsular	Reorganización de las cadenas γ , δ y β de TCR; compromiso al linaje de linfocitos T
DN3	c-Kit (CD117) ⁺ , CD44 ⁻ , CD25 ⁺	Corteza subcapsular	Unión al linaje de los linfocitos T de tipo TCR- $\gamma\delta$ o TCR- $\alpha\beta$; la selección de la cadena β lleva a la etapa DN4
DN4	c-Kit (CD117) ^{bajo/-} , CD44 ⁻ , CD25 ⁻	De la corteza subcapsular a la corteza	Comienza el reordenamiento del <i>locus</i> de la cadena α ; el timocito se convierte en doble positivo (DP)

Modificada de Punt *et al.*, 2020.

Los linfocitos T de tipo TCR $\gamma\delta$ y TCR- $\alpha\beta$ mencionados en la etapa DN3 (Tabla 2) desempeñan funciones importantes en el sistema inmune. Los linfocitos TCR- $\alpha\beta$ son los participantes dominantes en la respuesta adaptativa en órganos linfoides secundarios, mientras que, los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ actúan particularmente en la protección de los tejidos de nuestras barreras anatómicas proporcionando una primera línea de ataque contra los microbios invasores. La elección de convertirse en un linfocito T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ está determinada por la rapidez con la que los genes que codifican cada una de las cuatro cadenas de receptores se reorganizan con éxito. El reordenamiento de los *loci* β , γ , δ comienza durante la etapa DN2. Para que una célula se convierta en T $\alpha\beta$, esta debe generar una cadena de proteína TCR β , un evento que depende de un solo reordenamiento V(D)J en la estructura. En cambio, para convertirse en una célula $\gamma\delta$, un timocito debe generar dos proteínas funcionales que dependen de dos eventos de reorganización separados en la estructura. De ahí que, la probabilidad favorece el evento único y, de hecho, los linfocitos T tienen al menos tres veces más probabilidades de convertirse en linfocitos TCR- $\alpha\beta$ que en linfocitos TCR- $\gamma\delta$ (Punt *et al.*, 2020). Al finalizar la etapa DN4, la población de TCR- $\alpha\beta$ ahora expresa tanto CD4 como CD8 (CD4⁺CD8⁺), y está lista para la segunda etapa del desarrollo de los linfocitos T: la selección. Durante esta nueva etapa se seleccionan a los timocitos que tienen receptores capaces de unirse a las moléculas de MHC propias con baja afinidad y se descartan aquellos que al tener alta afinidad pueden resultar en autotolerancia (Punt *et al.*, 2020).

La selección positiva de los timocitos doble positivos conduce a dos linajes distintos en los que los linfocitos T maduran en timocitos unipositivos que expresan glicoproteínas $CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^+$ (Kim et al., 2019; Punt et al., 2020).

Cada TCR es esencialmente único y es responsable de la especificidad de las células T. La recombinación exitosa de un TCR funcional y la salida del timo dan lugar a una célula T madura de tipo "naïve" (también denominada virgen o ingenua), capaz principalmente de migrar a través de los tejidos linfoides secundarios y la circulación periférica, pero todavía incapaz de producir cualquier tipo de respuesta que pueda proteger contra el desafío infeccioso. Para que una célula T virgen pueda generar una respuesta inmune, requiere ser **activada**. Lo cual implica interacciones coordinadas entre una serie de moléculas de la célula T y una APC (Pennock et al., 2013). Recapitulando, las APCs, como las células dendríticas, son células que portan un péptido antigénico derivado del agente infeccioso, unido de forma no covalente a una molécula MHC de clase I o de clase II (Pennock et al., 2013; Punt et al., 2020).

En la fase inicial de la activación de las células T, los TCR se unen a moléculas CD3 que permiten la transducción de señales descendentes y movilizan a las células T para interactuar con las APCs (Kim et al., 2019). Cada TCR también se asocia con un correceptor CD4 o CD8, dependiendo del tipo de célula T ($CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^+$). Estas dos moléculas se unen al MHC (clase I para CD8 y clase II para CD4), estabilizando aún más la interacción entre la célula T y la APC (Fig. 2) (Pennock et al., 2013). Al mismo tiempo, la interacción TCR-MHC requiere de señales coestimuladoras para inducir una activación adecuada de las células T; esto se conoce como la hipótesis de las dos señales (Kim et al., 2019).

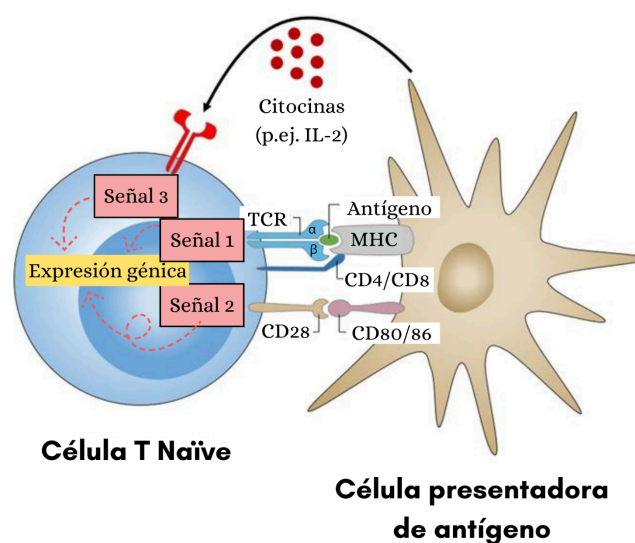


Figura 2. Señales necesarias para la activación de células T. Modificado de Lee et al., 2020.

La primera señal es la activación por el acople de la APC al TCR y la señal 2 se da por el acople de moléculas coestimuladoras (Punt et al., 2020). La coestimulación se produce cuando el CD28 presente en las células T se une a CD80 y CD86 de las APC (Fig. 2) (Pennock et al., 2013; Kim et al., 2019).

En el caso de ausencia de señales coestimuladoras o presencia de señales coinhibidoras, la señalización única a través del TCR induce a un estado de falta de respuesta funcional denominado anergia clonal. Este estado de inactividad de las células T está caracterizado por la ausencia de proliferación celular y de producción de citocinas en respuesta a una estimulación posterior (Punt et al., 2020).

Por otra parte, numerosas líneas de investigación han sugerido que, aunque la interacción de CD28 es una segunda señal necesaria, las células T requieren de una tercera señal para su activación completa (Fig. 2). Los datos indican que las citocinas del medio desempeñan un papel importante en la proliferación (p.ej. IL-2) y en la dirección de la diferenciación de las células T (citocinas polarizantes), siendo así estimuladas a células efectoras apropiadas para el ataque inmunológico al que se dirigen (Pennock et al., 2013; Punt et al., 2020).

La IL-2 es una de las más conocidas citocinas involucradas en la activación de las células T y desempeña un papel clave en la inducción de la proliferación óptima de las células T (Punt et al., 2020). Además, esta citocina puede definirse como una citocina pleiotrópica con diferentes funciones que van desde impulsar la proliferación de células T, apoyar la activación de células natural killer (NK) hasta la inducción de la transcripción de genes proapoptóticos (Zelante et al., 2012). La IL-2 se desempeña de manera autocrina y paracrina, es decir, actúa a través de los propios receptores de la célula que la produce y sobre los receptores de las células próximas a la célula secretora, respectivamente. De esta manera, las IL-2 del medio y las de la célula T activada, estimulan una cascada de señales intracelulares que aumentan la proliferación (Pennock et al., 2013).

Los TCR y las señales coestimuladoras inducen la transcripción de genes tanto para IL-2 como para la cadena α (CD25) del receptor de alta afinidad para IL-2 (IL-2R). Estas señales juntas, también mejoran la estabilidad del ARNm de IL-2. El aumento combinado de la transcripción de IL-2 y la estabilidad mejorada del ARNm de IL-2 da como resultado un incremento de 100 veces en la producción de IL-2 por parte de la célula T activada. La secreción de IL-2 y su posterior unión al IL-2R induce a las células T vírgenes activadas a una proliferación acentuada. De modo que, las tres señales en conjunto conducen a la proliferación de las células T, al inducir colectivamente un programa transcripcional que da lugar a una producción/secreción robusta de IL-2 (Pennock et al., 2013; Punt et al., 2020).

Las citocinas polarizantes, por otro lado, son las responsables de guiar a una célula Th, hacia uno de sus varios diferentes destinos efectoros (Punt et al., 2020). Las células T CD4⁺ pueden agruparse en varios subconjuntos e incluyen a las células Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, así como a las células T foliculares cooperadoras o *helper* (Tfh) y las células T reguladoras (Tregs) (Wik & Skálhegg, 2022).

2.2.1.2. Diferenciación de células T

La función de los linfocitos T varía en función de la subclase de células T, entre las que se incluyen: las células Th, las células Treg, las células T de memoria y las CTL (Kim et al., 2019). En lo que concierne a las células T de memoria, nos enfocaremos en sus funciones y subclasificaciones en la siguiente sección. Existen otros subconjuntos de células T menos prominentes, aunque no necesariamente menos importantes, como son las células T $\gamma\delta$ y las células T NK (Punt et al., 2020).

Una amplia generalización segrega la función de ayuda a las células T CD4⁺ y la función citotóxica a las células T CD8⁺ (Pennock et al., 2013). Las células T CD4⁺ activadas adquieren la capacidad de segregar factores que mejoran la activación y proliferación de otras células inmunes. Por otro lado, las células T CD8⁺ tienen la capacidad de reconocer el péptido unido al MHC de clase I, el cual se expresa en casi todas las células del cuerpo excepto eritrocitos; de ahí que, las CTL están perfectamente preparadas para limpiar el cuerpo de las células que han sido infectadas internamente con el patógeno que causó su activación (Punt et al., 2020). Es importante señalar que, aunque estas son las funciones canónicas de las células T CD4⁺ y CD8⁺, recientemente también se ha puesto de manifiesto que el subconjunto CD4⁺ de células T puede ser citotóxico por sí mismo. Estas células T CD4⁺ citotóxicas pueden inducir la muerte celular mediante la interacción con péptidos presentados en el MHC-II, de forma similar al mecanismo utilizado por los CTL CD8⁺ (Wik & Skálhegg, 2022).

Las respuestas de las células T CD4⁺ colaboradoras apoyan a la respuesta inmune mediante la generación de citocinas y quimiocinas que activan a las células vecinas para que realicen funciones específicas (citocinas) o recluten nuevos subconjuntos de células inmunes en los lugares donde se encuentran los patógenos (quimiocinas) (Pennock et al., 2013). En concreto, cabe mencionar que las células T CD4⁺ participan indirectamente en la eliminación de la infección modulando la actividad de otras células inmunes, como macrófagos, neutrófilos, células B y CTL (Wik & Skálhegg, 2022). Respecto a su desarrollo, las células T vírgenes conservan su especificidad mediante la expresión de su TCR único, pero siguen sin comprometerse con su destino cooperador hasta que la activación de su TCR va acompañada de la integración de señales moleculares aguas abajo de sus receptores de citocinas (señal 3 de activación) (Pennock et al., 2013).

La interacción entre los patógenos y los PRR de las células del sistema inmune innato dan lugar a la producción de diversas citocinas inflamatorias. De ahí que, en respuesta al entorno específico de citocinas, las células T estimuladas por antígenos se programarán genéticamente en una variedad de subconjuntos potenciales que poseen mecanismos efectores apropiados para eliminar al patógeno (Wik & Skålhegg, 2022).

Tabla 3 <i>Regulación y función de los subconjuntos T cooperadores</i>				
Subconjunto	Citocinas polarizantes	Regulador transcripcional maestro	Citocinas efectoras	Funciones efectoras
Th1	IL-12 IFN- γ	T-Bet	IFN- γ TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> ● Combate a patógenos intracelulares al activar a macrófagos y aumentar sus propiedades fagocíticas y de presentación de antígenos
Th2	IL-4	GATA-3	IL-4 IL-5 IL-13	<ul style="list-style-type: none"> ● Elimina parásitos al activar a eosinófilos, mastocitos y basófilos ● Promueve que las células B produzcan isoformas IgE e IgA, que circulan hacia las superficies mucosas y neutralizan futuras amenazas de encuentro parasitario
Th9	IL-4 TGF- β	PU.1	IL-9 IL-4 IL-13	<ul style="list-style-type: none"> ● Protege contra patógenos extracelulares e interviene en la respuesta inmune antitumoral ● Permite la activación y expansión de los mastocitos
Th17	IL-6 + TGF- β , IL-21, IL-23	ROR γ t	IL-17A IL-17F IL-22	<ul style="list-style-type: none"> ● Combate la invasión fúngica y bacteriana en las superficies de las mucosas ● Activa fuertemente a neutrófilos
Th22	IL-6 TNF- α	AHR	IL-22	<ul style="list-style-type: none"> ● Combate los patógenos extracelulares, principalmente en la piel
Tfh	IL-6 IL-21	Bcl-6	IL-21 IL-4	<ul style="list-style-type: none"> ● Favorece el desarrollo del centro germinal de las células B y promueve la generación robusta de anticuerpos de alta afinidad
Treg	IL-2 TGF- β	FoxP3	IL-10 TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> ● Mantiene la tolerancia a los autoantígenos, suprime las enfermedades autoinmunes e inhibe la respuesta inmune de otras células

(Pennock et al., 2013; Kim et al., 2019; Punt et al., 2020)

Las respuestas de las células T colaboradoras se clasifican en subconjuntos Th, entre los principales se incluyen a las células Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, así como a las células Tfh y células Treg (Pennock et al., 2013).

Los subconjuntos de células T CD4⁺ se definen por la expresión diferenciada de moléculas de superficie y por la producción endógena de citocinas, que son impulsadas por la presencia de citocinas extracelulares y la activación de factores de transcripción clave (Wik & Skålhegg, 2022) (Tabla 3).

Por otro lado, las células T vírgenes se diferencian en CTL al reconocer sus antígenos en presencia de las citocinas IFN- α/β e IL-12 y se programan, al igual que las células CD4⁺ Th1, mediante el factor de transcripción T-bet; aunque, su diferenciación también se ve favorecida por el factor de transcripción eomesodermina (EOMES) (Pennock et al., 2013). Los CTL se especializan en eliminar activamente las células que contienen el antígeno específico, como virus, células cancerosas y otras células anormales con funciones celulares patológicas (Kim et al., 2019). Los CTL generan grandes cantidades de IFN- γ y TNF- α (Pennock et al., 2013), estas citocinas aceleran aún más la respuesta inmune innata y adaptativa contra los patógenos intracelulares (Mitrücker et al., 2014). Asimismo, los CTL producen grandes cantidades de vesículas secretoras que, cuando se liberan en estrecho contacto con otras células, lisan directamente a las células vecinas (Pennock et al., 2013). La actividad citolítica se desempeña en primer lugar mediante el reconocimiento de las células que presentan antígeno en forma de péptido/MHC de clase I en su superficie, por las CTL; recordando en este punto que la mayoría de las células expresan MHC-I, excepto los eritrocitos. La unión con el TCR posteriormente dirige las vesículas líticas a la región de interacción TCR-MHC. Las citotoxinas diseminadas en la sinapsis entre las células (perforinas), crean poros en la célula diana que permiten la entrada de proteasas, incluida la granzima B, que inducen la apoptosis (Pennock et al., 2013; Kim et al., 2019; Wik & Skålhegg, 2022). De este modo, las células T CD8⁺ que reconocen antígenos asociados a tumores pueden lisan células cancerosas tras un encuentro competente (Pennock et al., 2013).

Es importante señalar que cuando cualquiera de estos procesos de diferenciación tiene lugar de forma desregulada, ya sea inflexible o excesivamente robusta, puede dar pie a enfermedades inmunológicas (Pennock et al., 2013). Mientras que las células Th1 y Th17 están implicadas en la autoinmunidad y, las Th2 y Th9 en las respuestas inmunes alérgicas, las células Th22 parecen estar implicadas tanto en la autoinmunidad como en la alergia. Las células Th9, además, se han implicado recientemente en la inmunidad tumoral y en la promoción de la tolerancia a los órganos trasplantados (Pennock et al., 2013; Wik & Skålhegg, 2022).

Las respuestas citotóxicas y Th1 tienen consecuencias letales cuando la respuesta natural del huésped, o la intervención terapéutica, van demasiado lejos y provocan un bolo masivo de citocinas inflamatorias (es decir, una tormenta de citocinas), lo que lleva al huésped a un shock pirogénico (Pennock et al., 2013). Las actividades de los subconjuntos de células T están equilibradas en parte por una subpoblación única de células CD4⁺, las Treg (Wik & Skálhegg, 2022) (Tabla 3).

Las células Treg son vitales para la homeostasis inmune y la autotolerancia, amortiguan la inflamación y previenen el desarrollo de enfermedades autoinmunes; pero si presentan un exceso de actividad, también pueden estar implicadas en la persistencia de células oncogénicas (Pennock et al., 2013; Wik & Skálhegg, 2022).

2.2.1.3. Células T de memoria

Las células T atraviesan varios procesos, en primer lugar son activadas, después pasan por un proceso de expansión (proliferación) y por la generación de células efectoras, luego, por una contracción del número de células y, finalmente, inician el "pool" (reserva) de células de memoria. Tras eliminar al patógeno, alrededor del 90-95% de las células sufren apoptosis durante la contracción y el 5-10% restante se diferencia en células T de memoria (Ratajczak et al., 2018; Punt et al., 2020). A continuación, las células T de memoria forman distintos subconjuntos: células T de memoria central (Tcm), células T de memoria efectoras (Tem), células T de memoria residentes en el tejido (Trm), células T reguladoras (mTreg) y células T de memoria madre (Tscm) (Ratajczak et al., 2018). Esta reserva de células de memoria poseen fenotipos y funciones adaptados para responder a la reinfección (Pennock et al., 2013).

Independientemente de su fenotipo específico, el conjunto de células T de memoria difiere de las células vírgenes en tres parámetros importantes (Pennock et al., 2013):

- La frecuencia de células que permanecen como reserva es superior a la frecuencia precursora de células vírgenes que estaban presentes antes del primer encuentro con el patógeno. La reserva de células T de memoria antígeno-específicas permite que el cuerpo se encuentre más vigilado en caso de reinfección (Pennock et al., 2013).
- Las células de memoria tienen la capacidad de acceder tanto a los tejidos SLO como a los periféricos, incluso en condiciones de homeostasis. A diferencia de la respuesta primaria, en la que los patrones de tráfico de las células T vírgenes las obligan a esperar en el SLO hasta que el antígeno y/o las APC les presenten el antígeno días después de la infección inicial, la presencia de células de memoria *in situ* permite su respuesta inmediata al reencuentro con un patógeno (Pennock et

al., 2013).

Esto contribuye a reducir drásticamente el tiempo de respuesta secundaria. Un aspecto interesante de la respuesta inmediata de las células de memoria es que su producción de quimiocinas y citocinas efectoras sirve para atraer a muchas células inmunes innatas como efectoras. Así, mientras que la calidad y cantidad de la activación inmune innata facilita la respuesta adaptativa primaria, en la respuesta secundaria es la respuesta adaptativa la que facilita el reclutamiento y la activación de las células innatas (Pennock et al., 2013).

- Las células de memoria son más sensibles a la estimulación del antígeno a través de su TCR y son algo menos dependientes de las moléculas coestimuladoras para permitir su respuesta productiva. Como resultado, las células de memoria son capaces de efectuar una respuesta inmune a la presentación de cantidades mínimas de antígeno durante las primeras horas de la reinfección (Pennock et al., 2013).

En conjunto, las funciones de las células T de memoria producen una respuesta *in situ* a la reinfección en una fracción del tiempo que tarda la respuesta primaria (la respuesta de las células T suele alcanzar su punto máximo entre 7 y 15 días después de la estimulación inicial con el antígeno); además de una respuesta más robusta y, por lo tanto, más efectiva que una respuesta primaria (Pennock et al., 2013; Punt et al., 2020).

Los distintos tipos de células T de memoria difieren entre sí, en ubicación, fenotipo y función (Punt et al., 2020). Actualmente, cada subconjunto se puede definir fenotípicamente por la expresión diferenciada de marcadores (moléculas de superficie) (Tabla 4). Dentro de los principales marcadores utilizados con este fin, se encuentran:

- CD45RO: Isoforma de CD45 cuya expresión permite identificar a las células T efectoras y de memoria humanas (excepto Tscm) (Punt et al., 2020).
- CCR7 y CD62L (L-selectina): Regulan la orientación o retorno a los órganos linfoides secundarios (SLOs); mientras que CCR7 es un receptor de quimiocinas, CD62L es una molécula de adhesión celular. Ambos marcadores se expresan mayormente en células T vírgenes, de memoria central y de memoria madre (Punt et al., 2020).
- CD44: Marcador de activación importante. Su nivel de expresión aumenta en respuesta a las señales de activación mediadas por TCR por lo que permite distinguir a las células T efectoras y de memoria de sus homólogas ingenuas (Punt et al., 2020).

Tabla 4 <i>Fenotipo y función de los subconjuntos de células T de memoria</i>				
Subconjunto	Ubicación	Fenotipo	Respuesta efectora	Función
Tcm	Tejidos linfoides secundarios	CD45RO ⁺ , CCR7 ⁺ , CD62L ⁺ , CD44 ⁺	IL-2, IL-4, IFN- γ y TNF	<ul style="list-style-type: none"> ● Potencial robusto de proliferación tras el reencuentro con el antígeno.
Tem	Tejidos periféricos no linfoides (p.ej., pulmones, hígado)	CD45RO ⁺ , CCR7 ⁻ , CD62L ⁻ , CD44 ⁺	IL-4, IL-5, IFN- γ y granzima B	<ul style="list-style-type: none"> ● Capaces de recircular entre la sangre y los tejidos. ● Respuesta temprana a la reinfección. ● Propiedades citotóxicas.
Trm	Múltiples tejidos, en particular, tubo digestivo, mucosa genital femenina, pulmones, piel y cerebro	CD45RO ⁺ , CCR7 ^{lo} , CD62L ^{lo} , CD44 ⁺	IFN γ e IL-17	<ul style="list-style-type: none"> ● Primera línea de defensa contra los agentes patógenos. ● Participan en la respuesta inmune directa y son mediadores de la migración de otras células a los tejidos re-infectados.
mTreg	Tejidos periféricos no linfoides	CD45RO ⁺ , CCR7 ⁻ , CD62L ^{lo} , CD44 ⁺	IL-10	<ul style="list-style-type: none"> ● Reducen la inflamación tisular sin empeorar la eliminación de patógenos. ● Evitan que estos tejidos resulten dañados en la infección secundaria. <p>(Khantakova et al., 2022)</p>
Tscm	Tejidos linfoides secundarios	CD45RO ⁻ , CCR7 ⁺ , CD62L ⁺ , CD44 ^{lo}	–	<ul style="list-style-type: none"> ● Rápida diferenciación en células T efectoras . ● Gran potencial de regeneración <p>(Wang et al., 2021)</p>

^{+/-}: indican el nivel de expresión (^{alto/nulo}) (dado por la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo); ^{lo}: bajos niveles de expresión.

(Ratajczak et al., 2018)

2.2.2. Marcadores de superficie celular

Los marcadores de superficie celular son proteínas o carbohidratos que se expresan en la superficie de las células, unidas a la membrana celular y que a menudo actúan, convenientemente, como marcadores de tipos celulares específicos. Existen múltiples métodos para determinar los marcadores de superficie celular presentes en las células de una población (Bradley, 2020).

Estos métodos incluyen la citometría de flujo, técnica que permite detectar múltiples marcadores de superficie celular en una célula al hacer pasar células individuales a través de un láser altamente focalizado (Bradley, 2020). Los marcadores de superficie celular permiten, entonces, distinguir ampliamente a los subconjuntos de células T vírgenes, efectoras y a los diversos tipos de células T de memoria (Punt et al., 2020).

Algunos de los principales marcadores utilizados para identificar las células T en sus subconjuntos son:

- CD3, CD4 y CD8: CD3 es una molécula de membrana presente en las células T, por lo que está presente en todas las etapas del desarrollo de las células T y permite distinguir las de otros tipos celulares. Por otro lado, los marcadores CD4 y CD8 identifican las subpoblaciones T cooperadoras y T citotóxicas, respectivamente (Barrero et al., 2001)
- CD45RO y CD45RA: CD45RA y CD45RO son isoformas del antígeno CD45. CD45RA es la isoforma larga y se expresa en las células T vírgenes. Mientras que CD45RO es la isoforma más corta y se expresa en las células T de memoria (Seattle Children's Hospital, 2023).
- CD25: CD25 es la cadena alfa del receptor trimérico de IL-2 y se considera el marcador de activación celular más destacado. Se considera de expresión tardía, debido a que se incrementa a las 24 horas de la estimulación del complejo TCR/CD3 y permanece elevada durante unos días (Bajnok et al., 2017).
- Ki-67: Ki-67 es una proteína nuclear asociada al ciclo celular (no específica de células T). La cuantificación de Ki-67 es actualmente uno de los métodos más utilizados para evaluar la proliferación de células T debido a su expresión durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y fase M) y a su ausencia en células quiescentes (G0) (Di Rosa et al., 2021).

El hecho de poder diferenciar los subconjuntos celulares resulta crucial para comprender la respuesta y el perfil inmune de las células T de mujeres en edad reproductiva al ser tratadas con cefalotina, ampicilina y eritromicina.

2.3. Antibióticos

2.3.1. Generalidades

Un antibiótico es una sustancia antimicrobiana, cuyo origen puede ser natural (producida por microorganismos), semisintético o sintético. Los antibióticos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento e incluso de destruir bacterias (Mohr, 2016).

Desde hace miles de años, los efectos terapéuticos de los microorganismos, como hongos, levadura de cerveza y mohos, son conocidos por su valor en el tratamiento de heridas infectadas. Aunque los practicantes no eran capaces de explicar el fenómeno del efecto, los utilizaban para aplicaciones médicas. También los compuestos bioactivos de las plantas se utilizaron médicamente (Mohr, 2016). En 1546, el erudito italiano Girolamo Fracastoro propuso partículas transmisibles e imperceptibles similares a semillas (*seminaria morbi*) como agentes causales del brote de ciertas enfermedades. No obstante, tuvieron que pasar varios siglos para demostrar que las bacterias son un ejemplo de tales "partículas". Entretanto, el médico húngaro Ignaz Semmelweis, reconoció la importancia de la higiene en los hospitales; este médico sugirió e impuso el lavado de manos con soluciones de cal clorada antes de las exploraciones a las pacientes ginecológicas, con lo cual salvó varias vidas de la fiebre puerperal. Mientras que, el cirujano escocés Sir Joseph Lister trataba las heridas de cirugía con soluciones de fenol (ácido carbólico) para evitar infecciones. Introduciendo ambos de esa manera, a mediados del siglo XIX, la antisepsia (Zaffiri et al., 2012; Nicolaou & Rigol, 2017). Posteriormente, en la segunda mitad del siglo XIX, el químico y bacteriólogo Louis Pasteur contribuyó fundamentalmente a nuestra comprensión de las causas subyacentes de las enfermedades infecciosas mediante sus estudios experimentales con bacterias que culminaron en su teoría germinal de la enfermedad; según la cual los contagios se deben a la capacidad de los microorganismos para transmitirse de una persona a otra a través del aire o del contacto físico. Finalmente, las aportaciones posteriores del médico alemán Robert Koch también resultaron transformadoras. Sus descubrimientos, incluidos los llamados cuatro "postulados de Koch" que establecen una relación causal entre los microbios y las enfermedades, impulsaron la bacteriología hacia su era moderna (Nicolaou & Rigol, 2017).

Los antibióticos han repercutido no sólo en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, sino también en la sociedad, al modificar la morbilidad y la mortalidad. Se estima que la disponibilidad generalizada de antibióticos ha añadido 30 años a la esperanza de vida humana en los países desarrollados (Zaffiri et al., 2012; Singh et al., 2017).

La primera década del siglo XX fue testigo de la aparición del primer agente antimicrobiano fabricado por el hombre, la arsfenamina (Salvarsan). A partir de 1906, Ehrlich y su grupo empezaron a sintetizar y probar compuestos derivados del ácido arsanílico (atoxilo) contra cepas bacterianas. En 1909, Ehrlich y su ayudante Sahachirō Hata descubrieron que el compuesto 606 era eficaz contra las cepas bacterianas de *Spirochaetes* y contra el protozoo *Trypanosoma*, hallazgos que condujeron a ensayos clínicos y, finalmente, a la comercialización del fármaco para el tratamiento de la sífilis y la tripanosomiasis (Nicolaou & Rigol, 2017). Continuando el trabajo de Ehrlich sobre el efecto del colorante en los microorganismos, se introdujo al mercado el primer antibiótico sulfa: Prontosil; el cual, fue ampliamente conocido en esa época por curar al hijo del en ese período presidente de los Estados Unidos, quien estaba afectado por una infección séptica de garganta por estreptococos (Zaffiri et al., 2012).

Años después, el concepto de tratamiento antimicrobiano se vio revolucionado por los trabajos de Alexander Fleming y su famoso descubrimiento. Fleming después de llegar de vacaciones a su laboratorio y encontrar contaminación por hongos (*Penicillium notatum*, ahora *Penicillium chrysogenum*) en colonias de *Staphylococcus aureus*, llegó a la conclusión de que el hongo debía de excretar una sustancia que mataba a las bacterias, y le dio el nombre de penicilina en marzo de 1929. A pesar de que Fleming intentó desde el principio colaborar con varios investigadores en un esfuerzo por aislar y purificar la sustancia desconocida, fue hasta 1939 que el patólogo Howard Walter Florey y los bioquímicos Ernst Boris Chain y Norman Heatley, empezaron a trabajar en el aislamiento de la misteriosa sustancia, que la estructura de la penicilina se descifró. En ese mismo año, Norman Heatley, mejoró el proceso de purificación y fue posible la producción a gran escala de penicilina (Nicolaou & Rigol, 2017).

Desde el descubrimiento de la penicilina, se han descubierto y desarrollado varios antibióticos muy eficaces para su uso clínico en el tratamiento de infecciones bacterianas. Muchos de estos antibióticos tienen un amplio espectro de actividad, mientras que otros son eficaces para el tratamiento de infecciones causadas sólo por bacterias Gram-positivas (Singh et al., 2017).

Las principales clasificaciones de antibióticos utilizados actualmente en la clínica (Tabla 5) se resumen brevemente a continuación.

1. **β-lactámicos**: Los principales antibióticos betalactámicos están representados por cuatro clases: penicilina, cefalosporina, carbapenem y monobactámicos. A excepción de los monobactámicos (que no contienen un segundo anillo), estos antibióticos constan de un sistema de anillos bicíclicos fusionados, siendo uno de ellos un anillo betalactámico (Singh et al., 2017).

Este anillo beta-lactámico inhibe la carboxipeptidasa bacteriana D-alanil-D-alanina, a menudo denominada DD-transpeptidasa o funcionalmente parafraseada como proteína de unión a la penicilina (PBP). La inhibición de la DD-transpeptidasa impide la síntesis de la pared celular durante la proliferación bacteriana por fisión binaria. La sustancia principal, la penicilina, es eficaz contra las bacterias Gram-positivas, como las especies de *Streptococcus* y *Clostridium perfringens*, pero también contra los gérmenes Gram-negativos, como las especies de *Neisseria* y *Spirochaete* (Franz et al., 2022). Muchas bacterias, como *Escherichia coli*, por ejemplo, son capaces de producir betalactamasas. Estas enzimas destruyen el anillo β -lactámico y, por lo tanto, hacen ineficaz el antibiótico. Hoy en día, los antibióticos betalactámicos suelen administrarse en combinación con inhibidores de las β -lactamasas (p.ej. ácido clavulánico) para conservar su efecto antimicrobiano (Mohr, 2016).

2. Glucopéptidos: Los glucopéptidos, como la vancomicina y la teicoplanina, se unen al dipéptido terminal, D-alanina-D-alanina, del lípido II, un precursor de la cadena de peptidoglicano de la pared celular bacteriana, impidiendo así la síntesis de la pared celular de bacterias exclusivamente Gram-positivas (Singh et al., 2017). Hoy en día, la vancomicina y la teicoplanina se utilizan para tratar infecciones bacterianas graves por bacterias Gram-positivas resistentes a otros antibióticos como los betalactámicos y las infecciones por *Staphylococcus aureus* susceptibles a la meticilina, así como resistentes a la misma (Mohr, 2016; Singh et al., 2017). Sirven como antibióticos de reserva en el tratamiento de infecciones graves por estafilococos resistentes a la oxacilina y enterococos resistentes a la ampicilina, así como contra la enterocolitis causada por *Clostridium difficile* productor de toxinas (Mohr, 2016).
3. Macrólidos: Los antibióticos macrólidos se unen al ARNr 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano e inhiben la translocasa, de ahí que interfieran en la síntesis de proteínas (Mohr, 2016; Singh et al., 2017). El espectro de los macrólidos incluye cocos Gram-positivos (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) y bacilos, así como, bacterias Gram-negativas como *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*, *Bordetella pertussis*, *Spirochaete*, *Haemophilus influenzae* y micoplasmas sin pared celular (Mohr, 2016). Hay más de 14 miembros de la clase de los macrólidos en uso clínico y tres miembros clave de la familia, la eritromicina, la claritromicina y la azitromicina, desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio (Singh et al., 2017). Además, se utilizan con frecuencia como opción de tratamiento alternativo para los pacientes que sufren alergia a los antibióticos betalactámicos (Franz et al., 2022).

4. Oxazolidinonas: Las oxazolidinonas son la clase más reciente de agentes antibacterianos sintéticos representados por el linezolid, la primera oxazolidinona aprobada por la FDA en 2000; un segundo miembro, el tedizolid, fue aprobado en 2014. El linezolid es un inhibidor de la síntesis de proteínas debido a su unión al ARNr 23S de la subunidad ribosomal 50S (Singh et al., 2017). El linezolid es activo contra todas las bacterias Gram-positivas, tanto aerobios como anaerobios, así como contra los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) y los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) (Mohr, 2016). Actúa principalmente como bacteriostático y está indicado como antibiótico de reserva para el tratamiento de las infecciones graves por Gram-positivos (Singh et al., 2017).
5. Tetraciclinas: Las tetraciclinas son inhibidores de la síntesis proteica bacteriana debido a su unión al ARNr 16S de la subunidad ribosomal 30S y al bloqueo de la entrada del aminoacil ARNt en el sitio A del ribosoma (Mohr, 2016; Singh et al., 2017). Su mecanismo de acción permite la actividad contra una amplia gama de patógenos, como bacterias Gram-positivas, bacterias intracelulares Gram-negativas como *Chlamydia* o *Rickettsia* y parásitos protozoarios (Mohr, 2016; Franz et al., 2022). Se utilizan con frecuencia para tratar infecciones en pacientes alérgicos a los antibióticos betalactámicos y a los macrólidos (Franz et al., 2022).
6. Fluoroquinolonas: Se introdujeron como quinolonas de segunda generación en la década de 1980 y mostraron una mayor potencia y espectro antibacteriano (Singh et al., 2017). Las fluoroquinolonas son bactericidas y actúan como inhibidores de la topoisomerasa bacteriana II (ADN girasa) y IV. Al inhibir la desespiralización del ADN, la relajación del superenrollamiento y la separación del ADN tras la replicación del mismo, interfieren en la síntesis del ADN (Franz et al., 2022). Esta clase de antibióticos se convirtió en un elemento importante para el tratamiento de las infecciones por bacterias Gram-positivas aerobias y anaerobias, sin pared celular y Gram-negativas, incluidas las principales cepas como *Pseudomonas aeruginosa* (Singh et al., 2017; Franz et al., 2022).
7. Lipopéptidos: Estos antibióticos se ven representados por la daptomicina, cuyo uso clínico se aprobó desde el 2003 (Taylor & Palmer, 2016). La daptomicina es un agente potente y rápidamente bactericida para bacterias Gram-positivas. El mecanismo de acción consiste en provocar la despolarización y formación de agujeros en la membrana celular, lo que conduce a la fuga de iones y a la alteración/ruptura de la membrana y a la muerte bacteriana. Es un antibiótico de gran éxito para el tratamiento de las infecciones nosocomiales por bacterias Gram-positivas, incluidas las cepas de SARM y ERV (Singh et al., 2017).

Tabla 5*Principales tipos de agentes antibacterianos utilizados en terapia sistémica*

Grupo de antibiótico	Ejemplos	Diana	Vía inhibida	Espectro
β -lactámicos	Ampicilina, cefalotina	Varios PBPs	Síntesis de pared celular	Amplio espectro ^a
Glucopéptidos	Vancomicina, teicoplanina	Lípido II	Síntesis de pared celular	Gram-positivos
Macrólidos	Eritromicina, azitromicina	RNAr, subunidad 50s	Síntesis de proteínas	Gram-positivos ^b
Oxazolidinonas	Linezolida, tedizolida	RNAr, subunidad 50s	Síntesis de proteínas	Gram-positivos
Tetraciclinas	Doxiciclina, tigeciclina	RNAr, subunidad 30s	Síntesis de proteínas	Amplio espectro
Fluoroquinolonas	Levofloxacinó, moxifloxacinó	Girasa, Topoisomerasa IV	Síntesis de DNA	Amplio espectro
Lipopéptidos	Daptomicina	Membranas	Integridad de la membrana	Gram-positivos

^a Amplio espectro se refiere a que son eficaces contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; algunos miembros del grupo pueden tener un espectro más estrecho.

^b Algunos macrólidos son eficaces en el tratamiento contra Gram-negativos fastidiosos.

En los últimos años, a través de diversos mecanismos y tal vez como resultado de su uso indiscriminado, muchos grupos bacterianos están mostrando resistencia a estos antibióticos (Zinner, 2007). En algunos casos, las bacterias no sólo son resistentes a una clase de antibióticos, sino a varias clases simultáneamente, lo que limita considerablemente las opciones de tratamiento (Singh et al., 2017). Las bacterias pueden desarrollar resistencia como resultado de mutaciones espontáneas, o por transposición/transducción de material genético como los plásmidos (Zinner, 2007). Los mecanismos de resistencia pueden incluir la modificación de la diana para alterar la unión al fármaco, la producción de mecanismos alternativos para realizar la función de la diana, la producción de enzimas que inactivan al fármaco, la reducción de la entrada del fármaco y la expresión de bombas de expulsión para eliminar los fármacos del interior de las células bacterianas (Zinner, 2007; Singh et al., 2017).

2.3.2. Antibióticos prescritos a mujeres embarazadas

Los antibióticos se encuentran entre los fármacos más utilizados durante el embarazo y representan aproximadamente el 80% de todos los medicamentos que se prescriben. Varios estudios han descrito los patrones de uso de antibióticos en el embarazo e informan de que entre una de cada cuatro y una de cada cinco mujeres recibirán al menos un antibiótico en este período (Lamont et al., 2014; Bookstaver et al., 2015). Durante el embarazo las mujeres son más vulnerables a ciertas infecciones como resultado de adaptaciones fisiológicas e inmunológicas compensatorias. Las distintas infecciones maternas bacterianas, víricas, parasitarias o micóticas pueden producirse y causar complicaciones en cualquier fase del embarazo (Kumar et al., 2022). La candidiasis vulvovaginal y las infecciones del tracto urinario (ITU) son más frecuentes y, junto con las infecciones del tracto respiratorio superior y las infecciones de transmisión sexual (ITS), representan alrededor del 72% de todas las infecciones tratadas en el embarazo (Lamont et al., 2014). En la Tabla 6 se describen los principales patógenos asociados con las infecciones durante el embarazo.

El uso de cualquier medicación durante el embarazo es una decisión de riesgo frente a beneficio, sin embargo, las infecciones no tratadas como las ITU o las ITS se asocian a un riesgo fetal significativo que incluye el aborto espontáneo, la prematuridad y el bajo peso al nacer (Bookstaver et al., 2015). Los antibióticos betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) constituyen alrededor del 80% de las prescripciones durante el embarazo, y los macrólidos son la siguiente clase de antibiótico más frecuente (Lamont et al., 2014). Los antibióticos prescritos a las pacientes embarazadas del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer-IER) se reportan en la base de datos de la institución. Los antibióticos más frecuentemente utilizados de cada clase incluyen a la ampicilina, cefalotina y eritromicina (INPer, 2022).

A continuación se especifican los usos comunes de los grupos de las penicilinas, cefalosporinas y macrólidos durante el embarazo:

- **Penicilinas:** Se utilizan ampliamente contra cepas de estreptococos gram-positivos, estafilococos, enterococos y meningococos, y se emplean en el tratamiento de la sífilis, la gonorrea y la meningitis (Lamont et al., 2014). En el caso de las ITU, dado que el 80-90% de las ITU son por *Escherichia coli*, se suele administrar ampicilina (Amir et al., 2020). Aunque las penicilinas pueden atravesar la placenta y alcanzar niveles significativos en la sangre fetal y el líquido amniótico, no hay datos de estudios en animales o humanos que indiquen que las dosis terapéuticas sean teratogénicas por lo que se consideran tratamiento de primera línea en el embarazo (Lamont et al., 2014).

Tabla 6 Patógenos asociados con las complicaciones del embarazo		
Patógeno	Respuesta inmune asociada a la infección	Complicaciones en el embarazo
Bacterias		
<i>Listeria monocytogenes</i>	IFN- γ , IL-1 β , IL-10	Transmisión vertical, enfermedad congénita, abortos, mortinatos, muerte fetal
<i>Brucella</i> spp	IL-6, IL-8, MCP-1	Abortos espontáneos, nacimiento prematuro, corioamnionitis
<i>Chlamydia trachomatis</i>	IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ	RPM, nacimiento prematuro, infección ocular fetal
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1	RPM, nacimiento prematuro, bajo peso al nacer
<i>Treponema pallidum</i>	IL-2, IFN- γ , TNF- α	Transmisión vertical, mortinatos, pérdida del embarazo, bajo peso al nacer
<i>Streptococcus</i> grupo B y <i>S. pneumoniae</i>	IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF- α	Transmisión vertical (rara), transmisión vertical durante el parto, nacimiento prematuro, sepsis neonatal
Infecciones vaginales		
<i>Escherichia coli</i>	IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ	RPM, nacimiento prematuro, mortinatos
<i>Gardnerella vaginalis</i>	IL-1 β , IL-6, TNF- α	Transmisión vertical (sin evidencias), RPM, bajo peso al nacer, nacimiento prematuro
<i>Trichomonas vaginalis</i> *	IL-1 β , IL-6, IL-8	RPM, nacimiento prematuro, bajo peso al nacer
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		
<i>Mycoplasma hominis</i>		
<i>Candida albicans</i> ; <i>C. parapsilosis</i> **	IL-1 β , IL-8	Bajo peso al nacer, RPM, candidiasis fetal

IFN: Interferón; IL: Interleucina; MCP: Proteína quimioatrayente de monocitos; TNF: Factor de necrosis tumoral; RPM: Ruptura prematura de membranas; *: Protozoo; **: Hongo dimórfico, los demás microorganismos de esta sección causan vaginosis bacteriana.

Tabla modificada de Kumar *et al.* (2022)

- Cefalosporinas: Estos antibióticos se utilizan para tratar diversas infecciones, como infecciones urinarias, neumonía, otitis y sinusitis e infecciones bacterianas graves. Aunque las cefalosporinas atraviesen la placenta no hay pruebas de que sean teratogénicas en animales o en humanos, por lo que pueden considerarse generalmente seguras para el tratamiento durante el embarazo (Lamont et al., 2014).
- Macrólidos: Se utilizan para tratar una amplia gama de infecciones bacterianas en el embarazo, incluidas las infecciones grampositivas de las vías respiratorias superiores e inferiores, infecciones de tejidos blandos, rotura prematura de membranas antes del parto, úlcera péptica relacionada con *Helicobacter pylori* y la infección por *Chlamydia*. La eritromicina también se utiliza como alternativa en pacientes alérgicos a la penicilina. Al igual que los anteriores grupos, los macrólidos atraviesan libremente la placenta y se consideran seguros (Lamont et al., 2014).

A pesar del uso frecuente de antibióticos, existen relativamente pocos estudios sobre la seguridad de los antibióticos en el embarazo. Esto se debe principalmente a los costos y a consideraciones éticas; en consecuencia, gran parte de los conocimientos deben extrapolarse de estudios en animales y de informes de casos anecdóticos y estudios de casos y controles basados en el recuerdo materno (Lamont et al., 2014; Bookstaver et al, 2015). Asimismo, dentro de las clasificaciones de riesgo de medicamentos durante el embarazo, la de mayor difusión internacional es la que la FDA (de EUA) puso en marcha desde 1979. Este sistema se fundamenta en categorías (A, B, C, D y X), basándose cada letra en el riesgo que supone el fármaco para el feto y en la naturaleza de las pruebas que respaldan esa evaluación del riesgo (Lamont et al., 2014).

Acto seguido se describirán las categorías:

- Categoría A: Estudios controlados no demuestran riesgo para el feto.
- Categoría B: Estudios en animales han demostrado efectos adversos pero los estudios en humanos no muestran riesgo alguno.
- Categoría C: Estudios en animales han demostrado un efecto adverso y no existen estudios controlados en humanos.
- Categoría D: Existen pruebas positivas de riesgo fetal humano de estudios de investigación.
- Categoría X: Estudios en animales o humanos han demostrado anomalías fetales y/o existe evidencia positiva de riesgo fetal humano basados en datos de reacciones adversas procedentes de la experiencia en investigación o comercialización. El fármaco está contraindicado.

Debido a que la mayoría de los fármacos utilizados durante el embarazo entran dentro de la categoría C, este sistema es generalmente inútil, de ahí que la FDA desde el 2015 haya comenzado a cambiar estas categorías por descripciones narrativas del tipo de riesgo que conlleva emplear algunos fármacos durante el embarazo y de esta forma dar lugar a una mejor comprensión del riesgo fetal y materno (Body & Christie, 2016).

De acuerdo con distintos estudios, el embarazo presenta varios desafíos para tomar decisiones sobre cómo abordar, prevenir y tratar las enfermedades infecciosas (Mor & Cardenas, 2010), ya que, además de la seguridad materna y fetal, los cambios fisiológicos durante el embarazo pueden provocar cambios farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos) y repercutir en la terapia antibiótica (Bookstaver et al., 2015). Los cambios fisiológicos que pueden alterar la farmacocinética se detallan a continuación:

- **Absorción:** Debido a que las náuseas y los vómitos al principio del embarazo pueden disminuir la cantidad de fármaco disponible para su absorción tras la administración oral, los medicamentos orales deben administrarse cuando las náuseas son mínimas. La producción de ácido gástrico disminuye durante el embarazo, mientras que aumenta la secreción de moco, lo que conduce a un aumento del pH gástrico. Estos cambios pueden aumentar la ionización de los ácidos débiles (p. ej., ampicilina) y reducir su absorción, y las bases débiles (p. ej., macrólidos) se difundirán más fácilmente, ya que estarán principalmente unidas. Además, la motilidad intestinal más lenta (relacionada al aumento de la progesterona) y la disminución de la secreción ácida gástrica en el embarazo podrían alterar la absorción de fármacos y la biodisponibilidad oral. Por otro lado, el aumento del gasto cardíaco y del flujo sanguíneo intestinal puede permitir una mayor absorción de fármacos en general. En conjunto, no existen pruebas confirmatorias que validen alguna de estas hipótesis (Feghali et al., 2015).
- **Distribución:** El aumento del agua corporal total, del volumen sanguíneo y del volumen plasmático contribuyen a aumentar el volumen de distribución de fármacos hidrofílicos, lo que dará lugar a concentraciones plasmáticas más bajas (Bookstaver et al., 2015; Feghali et al., 2015). Además, la grasa corporal materna aumenta, lo que incrementa el volumen de distribución de los fármacos lipofílicos (Feghali et al., 2015). También, la disminución de la albúmina y de la alfa-1-glicoproteína ácida, y las alteraciones del pH del plasma materno; se espera que provoquen una disminución de unión a proteínas y un aumento de las concentraciones del fármaco no unido (Bookstaver et al., 2015; Feghali et al., 2015).

Los fármacos de pequeño peso molecular y lipofílicos atraviesan fácilmente la placenta, por lo que, el feto y el líquido amniótico pueden actuar como compartimentos adicionales, dando lugar a una mayor acumulación de fármacos y a un aumento aparente del volumen de distribución de determinados fármacos (Feghali et al., 2015)

- **Metabolismo:** El metabolismo hepático de los fármacos incluye reacciones de fase I (oxidación, reducción o hidrólisis) que introducen elementos más polares o reactivos en las moléculas del fármaco, seguidas en muchos casos de reacciones de fase II (conjugación) con ácido glucurónico, sulfato u otros elementos que favorecen la excreción en la orina o la bilis. Las reacciones oxidativas de fase I son llevadas a cabo predominantemente por la familia de enzimas del citocromo P450 (CYP) que difieren en su especificidad de sustrato (Feghali et al., 2015). Existen cambios conocidos en las enzimas hepáticas durante el embarazo, como son el aumento de la actividad de CYP3A4 (50-100%), CYP2A6 (54%), CYP2D6 (50%) y CYP2C9 (20%); y la disminución gradual de la actividad de CYP1A2 y CYP2C19 con el avance de la gestación (Feghali et al., 2015; Avram, 2020). La actividad de las enzimas de fase II, incluidas las uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferasa (UGT), también se altera durante el embarazo, con un aumento del 200% en la actividad de la UGT1A4 durante el primer y segundo trimestres, y un aumento del 300% durante el tercer trimestre (Feghali et al., 2015). Los cambios en el metabolismo de los fármacos durante el embarazo pueden tener implicaciones para la dosificación de los mismos a considerar por el médico que prescribe, sin embargo, al existir controversia en los datos actuales en cuanto a si estos cambios conducen a alteraciones clínicamente significativas en el metabolismo del fármaco y en las concentraciones séricas posteriores, generalmente no se realizan estos ajustes (Bookstaver et al., 2015).
- **Excreción:** La excreción renal de fármacos depende de la tasa de filtración glomerular (TFG), la secreción tubular y la reabsorción (Feghali et al., 2015). Durante el embarazo el flujo sanguíneo renal aumenta en un 50%, posiblemente debido a la vasodilatación de las arteriolas aferentes y eferentes como resultado del aumento de progesterona (Bookstaver et al., 2015). Esto a su vez genera un aumento en la TFG. En el primer trimestre la TFG es un 50% mayor y continúa aumentando hasta la última semana de embarazo. Si un fármaco se excreta únicamente por filtración glomerular, se espera que su eliminación renal sea paralela a los cambios en la TFG durante el embarazo (Feghali et al., 2015).

Ante la ausencia de datos específicos de riesgo de la mayoría de los fármacos, la monitorización estrecha de la paciente es el paso más lógico para optimizar la terapia farmacológica en pacientes embarazadas.

Además del uso de los antibióticos durante el embarazo, el uso sistemático de estos en el parto por cesárea (PC) es fundamental para reducir el riesgo de infecciones. El PC es el factor más importante asociado a la infección posparto y conlleva un riesgo de infección entre 5 y 20 veces mayor que el parto vaginal. Tras un PC, la mortalidad y morbilidad maternas pueden deberse a una serie de infecciones, como son endometritis, infección urinaria e infección del sitio quirúrgico, que si son profundas y no superficiales, aumentan la estancia hospitalaria de la paciente (Lamont et al., 2010). Los antibióticos profilácticos para la cesárea son de amplio espectro (p.ej. azitromicina) y se administran tras el pinzamiento del cordón para la seguridad del neonato, aunque hay pruebas que sugieren que los antibióticos de rango estrecho administrados antes de la incisión son más eficaces sin perjudicar la salud neonatal (Lamont et al., 2014). Así pues, la decisión de qué antibiótico utilizar y en qué momento, dependerá de la sensibilidad de la paciente a determinados antibióticos, la experiencia del médico, los acontecimientos adversos, la prevalencia de organismos patógenos según estudios epidemiológicos previos (si se dispone de ellos), la disponibilidad y los costes en los distintos escenarios (Williams et al., 2021).

2.3.3. Efecto de los antibióticos en el sistema inmune

Los antibióticos se prescriben ampliamente a nivel mundial para el tratamiento de infecciones bacterianas, sin embargo, con el paso de los años se ha comprobado que muchos de estos fármacos también afectan a las respuestas inmunitarias de los pacientes. Aunque se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que regulan estas diversas interacciones inmunomoduladoras, estudios recientes apoyan dos modelos principales (Oh et al., 2018): 1) Los antibióticos pueden alterar la función inmunitaria interactuando directamente con dianas humanas; y/o 2) pueden afectar indirectamente a las respuestas inmunitarias a través de la alteración de la composición de la microbiota humana.

Los principales antibióticos prescritos a mujeres embarazadas en el INPer-IER: cefalotina, ampicilina y eritromicina; pertenecientes a los grupos de antibióticos betalactámicos y macrólidos, respectivamente, se caracterizan por dos propiedades, la acción inmunomoduladora y la antiinflamatoria (Zarogoulidis et al., 2011; Aminov, 2013; Mor & Cohen, 2013; Owlia et al., 2021). En este contexto, se ha demostrado que los antibióticos betalactámicos y los macrólidos, interfieren en el metabolismo y las funciones efectoras de las células T (Franz et al., 2022).

2.3.3.1. Efectos del tratamiento con betalactámicos en las células T

Respecto al efecto en las células T CD4⁺, se ha demostrado que la penicilina G tiene propiedades antiinflamatorias al reducir la expresión de los genes GATA3, T-bet (TBX21), IFNG e IL17A en las células T (Franz et al., 2022). GATA3 y T-bet son factores de transcripción que se encargan de guiar el desarrollo del linaje de las células T vírgenes a células cooperadoras de tipo 2 (Th2) y tipo 1 (Th1), respectivamente (Wan, 2014; NIH, 2022). A su vez, el gen T-bet controla la expresión del gen de la citocina Th1 representativa, el interferón gamma (IFNG), que desempeña un papel fundamental en las respuestas antimicrobianas, antivirales y antitumorales al activar a las células inmunitarias efectoras: macrófagos, células dendríticas, células B, células Th1, células Treg, células T CD8⁺ (Alspach et al., 2018) y mejorar la presentación de antígenos (Wan, 2014; LifeMap Sciences, 2022). Por otro lado, la proteína codificada del gen IL17A es una citocina proinflamatoria producida por células T activadas y promueve la inflamación induciendo diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, reclutando neutrófilos, aumentando la producción de anticuerpos y activando a las células T (Iwakura et al., 2008).

En comparación con los linfocitos T CD4⁺, se sabe relativamente poco sobre si los antibióticos influyen en la función mitocondrial y/o el metabolismo de los CTL y cómo lo hacen. Se ha demostrado que los antibióticos betalactámicos suprimen la generación y la proliferación de los CTL específicos de virus de forma dependiente de la dosis. En cuanto a la función efectora de los linfocitos T CD8⁺, se demostró que la penicilina acelera la lisis de las células blanco llevada a cabo por los CTL (Franz et al., 2022).

2.3.3.2. Efectos del tratamiento con macrólidos en las células T

Las propiedades inmunomoduladoras de los macrólidos fueron descritas por primera vez en 1987 por Kudoh y sus colegas en un estudio de panbronquiolitis difusa (Pollok & Chalmers, 2021). Este descubrimiento imprevisto ha dado lugar a nuevas investigaciones sobre el uso de macrólidos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Los macrólidos aumentan la apoptosis de las células T al favorecer la regulación a la baja de la proteína antiapoptótica Bcl-xl (Pollok & Chalmers, 2021; Franz et al., 2022). Además, se ha informado que las células T CD4⁺ muestran una supresión de la producción de citocinas efectoras Th1 (IL-2, IFN- γ) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-6) de forma dependiente de la dosis en presencia de macrólidos (Zimmerman et al, 2018; Franz et al., 2022). Los macrólidos también ejercen efectos inmunomoduladores sobre otras células del sistema inmune, como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos (Franz et al., 2022).

2.3.3.3. Efecto de los antibióticos en el sistema inmune de mujeres embarazadas

Es apropiado referirse al embarazo como una condición inmunológica única que se encuentra modulada, mas no suprimida. Durante el embarazo el sistema inmunitario materno se caracteriza por una red reforzada de reconocimiento, comunicación, tráfico y reparación; que es capaz de dar la alarma, si es necesario, para mantener el bienestar de la madre y del feto. Así mismo, por parte del feto se encuentra un sistema inmune activo en desarrollo que modificará la forma de responder de la madre al entorno, aportando a la singularidad del sistema inmunitario en el embarazo (Mor & Cardenas, 2010).

Durante el embarazo existe una modulación del sistema inmunitario que da lugar a respuestas inmunológicas diferenciales en función no sólo de los microorganismos, sino de las etapas del embarazo. Durante el primer trimestre, en el cual suceden distintos cambios para que el cuerpo se adapte a la presencia del feto, se requiere una fuerte respuesta inflamatoria. En el segundo y comienzo del tercer trimestre, la madre, la placenta y el feto son simbióticos, y la característica inmunológica predominante es la inducción de un estado antiinflamatorio. Finalmente, al momento del parto se requiere de un entorno proinflamatorio que promueva la contracción del útero, la expulsión del bebé y el rechazo de la placenta (Mor & Cardenas, 2010).

El tratamiento antibiótico es capaz de afectar a la inmunidad cuidadosamente coordinada durante el embarazo. Los hallazgos de los siguientes estudios destacan la importancia de incluir parámetros inmunológicos al estudiar los efectos en la madre de la medicación utilizada durante la gestación (Mor & Cardenas, 2010).

En primer lugar, se ha comprobado que un microbioma sano es importante para mantener un embarazo normal y, por lo tanto, se ha sugerido que se podrían estar utilizando demasiados antibióticos durante el embarazo. Ya que, los antibióticos provocan una perturbación inmediata del ecosistema, seguida de una recuperación incompleta del microbioma intestinal; con posibles consecuencias metabólicas y/o inmunitarias en la paciente (Kuperman & Kore, 2016; Benner et al., 2021). Una inmunidad desregulada puede causar complicaciones en el embarazo, como preeclampsia y parto prematuro, con consecuencias a largo plazo en el desarrollo de la descendencia. Así, los cambios de la inmunidad materna mediados por antibióticos pueden afectar a la salud neonatal (Benner et al., 2021).

Los efectos sobre la inmunidad materna no se han estudiado ampliamente, sin embargo, varios estudios han demostrado que la inmunidad de la descendencia se ve afectada por la modulación microbiana prenatal (Kuperman & Kore, 2016; Nyangahu et al., 2018; Benner et al., 2021; Cheng et al., 2020).

En un estudio efectuado en ratones, se identificaron cuatro rasgos inmunológicos que disminuyeron tras el tratamiento antibiótico: la población de células Th17 y células B CD5+ esplénicas y de células T CD4⁺ en los ganglios linfáticos mesentéricos, además de la disminución en la expresión de ARNm de ROR γ T en la placenta. La producción de IL-6 se vio significativamente afectada a la baja por el tratamiento antibiótico y se observó una tendencia hacia una mayor producción de IL-22. Además, se detectó un aumento de las poblaciones de células Th2 en las placentas tras el tratamiento antibiótico (Benner et al., 2021). Partiendo de la premisa de que la inmunidad gestacional depende de un equilibrio de citocinas mediado por Th1/Th2 estrechamente regulado, Benner *et al.* (2021), consideraron que el aumento de células Th2 se trata de una reacción protectora para evitar una posible carga proinflamatoria tras modificaciones externas durante la gestación (Benner et al., 2021).

Otro estudio con ratones encontró que la ceftriaxona podría reducir la respuesta inmune del organismo de las madres tratadas a los patógenos, a consecuencia de la disminución significativa del índice esplénico (volumen del bazo); sin embargo, esta reducción de la respuesta inmune podría ser modesta debido a las alteraciones no significativas de las citocinas (Cheng et al., 2020). Por otra parte, Nyangahu *et al.* (2018) informaron de que la administración oral de vancomicina durante el embarazo y la lactancia podría alterar la inmunidad materna al observar niveles significativamente más altos de IgG e IgM totales en la leche materna (Nyangahu et al., 2018).

1. Justificación

A nivel mundial, la intervención más común para tratar con infecciones maternas en el periparto es mediante la profilaxis o tratamiento con antibióticos (Bonet et al., 2015).

La administración de antibióticos en mujeres embarazadas debe ser una decisión donde el beneficio supere los riesgos potenciales. Puesto que un número significativo de infecciones virales y bacterianas no tratadas tienen un efecto dual, es decir, tanto en la madre como en el feto o neonato; es necesario llevar un control desde que se presentan los primeros signos y síntomas de una enfermedad. En el INPer-IER los principales antibióticos utilizados para tratar infecciones en las mujeres embarazadas son ampicilina, cefalotina y eritromicina.

El período del embarazo se considera una etapa muy vulnerable tanto para la madre como para el producto; es una etapa única en la que se producen varios cambios fisiológicos e inmunológicos en la madre para garantizar el desarrollo óptimo de un nuevo ser humano. No obstante, es también la etapa con la tasa más alta de abuso de antibióticos (Cardetti et al., 2020). Los antibióticos representan casi el 80% de todos los medicamentos recetados durante este período. Asimismo, se estima que a una de cuatro mujeres se le prescribirá un antibiótico durante el periparto (Bookstaver et al., 2015).

La exposición a los antibióticos durante el embarazo se ha asociado con efectos en el recién nacido a corto plazo, como son, anomalías congénitas. Y a largo plazo, mediante cambios en el microbioma intestinal, asma y obesidad (Bookstaver et al., 2015). En ratones, el tratamiento con antibióticos durante el embarazo puede provocar defectos en la respuesta inmune adaptativa en los recién nacidos (Gonzalez-Perez et al., 2016; Nyangahu et al., 2018). Además, en un estudio realizado a una población de casi un millón de recién nacidos daneses, el uso de antibióticos durante el embarazo se correlacionó con un mayor riesgo de que la progenie sea propensa a las infecciones en la infancia (Pronovost & Hsiao, 2019).

Es de importancia en salud pública el identificar las repercusiones que tienen estos tratamientos con antibióticos en el sistema inmune de las mujeres en edad reproductiva con la finalidad de prevenir afectaciones en la funcionalidad de la respuesta inmune adaptativa del futuro neonato.

2. Objetivos

4.1. Objetivo general

Identificar el efecto del tratamiento con los antibióticos: cefalotina, ampicilina y eritromicina; en el fenotipo y función de los linfocitos T de mujeres en edad reproductiva mediante citometría de flujo.

4.2. Objetivos específicos

- Purificar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mujeres en edad reproductiva y activar los linfocitos T en ausencia o presencia de antibióticos.
- Distinguir el fenotipo de los linfocitos T al ser tratados en ausencia o presencia de antibióticos mediante la expresión de marcadores de linaje, activación y diferenciación.
- Evaluar la proliferación celular de los linfocitos T tratados en ausencia o presencia de antibióticos mediante la expresión del marcador Ki-67.

3. Hipótesis

Si los linfocitos T de mujeres en edad reproductiva se tratan con antibióticos betalactámicos y macrólidos, se verán cambios en su capacidad de activación, proliferación y posterior generación de células efectoras.

4. Diseño experimental

6.1. Sujetos y condiciones de estudio

Estudio piloto del proyecto 2021-1-12 en el que se incluyeron mujeres mayores de 18 años y en edad reproductiva, sin embarazo, sin enfermedades autoinmunes ni crónicas (hipertensión arterial, diabetes) y sin consumo de antibióticos en los últimos 30 días. Se obtuvo sangre periférica de mujeres pertenecientes a proyectos de investigación en el INPer-IER, con 26, 29 y 31 años de edad ($n = 3$), previo consentimiento informado.

Se analizó el efecto del tratamiento con antibióticos en las células T de mujeres en edad reproductiva. Las condiciones de estudio fueron las siguientes: control sin estimular (-), control estimulado (+), A1, A10, A25, A50, C1, C10, C25, C50, E1, E10, E25 y E50. Al control negativo se le añadió únicamente suspensión celular, mientras que en el control positivo, las células fueron estimuladas con α -CD3 y α -CD28. Los grupos A1, A10, A25 y A50 hacen referencia al uso del antibiótico ampicilina a concentraciones 1, 10, 25 y 50 μ g/mL. Las concentraciones son las mismas para C (cefalotina) y E (eritromicina).

Los parámetros por analizar son la presencia de las subpoblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺, células T vírgenes y memoria CD4⁺ y CD8⁺, así como la activación y proliferación de CD4⁺ y CD8⁺. Mediante el uso de los anticuerpos CD4 y CD8, CD3 y CD45RO, y CD25 y Ki67, respectivamente.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Preparación de medio de cultivo RPMI-1640

La preparación del medio de cultivo se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar. El medio RPMI-1640 se suplementó añadiendo la cantidad correspondiente (ver anexos) de suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 1X y β -mercaptoetanol 50 μ M. Finalmente se etiquetó y almacenó a 4°C en el refrigerador para su posterior uso.

6.2.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se obtuvo sangre periférica de mujeres en edad reproductiva al puncionar la vena cefálica utilizando la técnica estándar con el sistema al vacío (EDTA como anticoagulante). Después, se pasaron 5 mL de la muestra obtenida a un tubo cónico de 15 mL. Tomando en cuenta la proporción 1:1 con el volumen de sangre, se agregaron 5 mL con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) al tubo cónico. La sangre y el DPBS se homogenizan por inversión (sangre diluida).

En otro tubo cónico de 15 mL se agregaron 5 mL del reactivo Ficoll™. Posteriormente, se añadieron lentamente y a ritmo constante los 10 mL de sangre diluida. Obteniéndose dos capas, una inferior que corresponde a Ficoll™ y otra superior, de la sangre diluida. Este tubo se centrifuga con las siguientes condiciones: 20 minutos, 2500 rpm, 21°C, aceleración = 9 y desaceleración = 0. Con la finalidad de mantener las capas finales sin alteraciones.

Al salir los tubos de la centrífuga, se observaron y verificaron las capas obtenidas. Estas capas son plasma, PBMC, Ficoll, granulocitos y eritrocitos.

Para obtener la capa de PBMCs intacta, se utilizó una pipeta de 1000 µL para recuperarla. Lo que se iba tomando se colocaba en un tubo Falcon de 50 mL. Al terminar, con DPBS se llevó a un volumen total de 50 mL. Homogeneizamos la mezcla PBMCs con DPBS y centrifugamos durante 5 minutos, a 1500 rpm y 21°C. Esto con la finalidad de lavarlas. Luego, descartamos el sobrenadante y se añadió 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado, con el cual se suspendieron las células.

6.2.3. Conteo de células mediante tinción vital con azul de tripano

Se tomaron 5 µL de células en suspensión con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado y se agregaron a un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente, se añadieron 45 µL de reactivo azul de tripano, cuya función es delimitar a las células vivas de las muertas, siendo que las primeras excluyen el colorante azul. Después, se homogeneizó suavemente.

Con la micropipeta de 10 µL se tomó ese volumen del microtubo y se agregaron las células por capilaridad a la cámara de Neubauer. Con ayuda del microscopio se observaron los 4 cuadrantes periféricos (de las esquinas) a 10x y se enfocaron a 40x para empezar con el conteo celular. Se contaron todas las células circulares (no amorfas) y refringentes dentro del área, incluyendo las que se observaron sobre las líneas dobles que rodean cada cuadrante (se tomaron en cuenta únicamente los que se encontraran sobre dos líneas perpendiculares entre sí).

Al terminar, se registraron las células contadas en cada cuadrante y se realizó la suma total, para posteriormente obtener el promedio de células/ cuadrante (\bar{x}). Se obtuvieron y registraron las células/mL de cada sujeto de estudio (ver anexos).

6.2.4. Cultivo celular en placa

Se delimitaron los pozos que se iban a considerar tanto para las condiciones problema como para las de control (positivo y negativo).

En primer lugar, en un microtubo de 1.5 mL se agregó la cantidad correspondiente de los anticuerpos α -CD3 y α -CD28, y del reactivo DPBS (ver anexos) para un total de 50 μ L de solución por pozo. Después de agregar la solución con anticuerpos y DPBS a los pozos necesarios, se incubó la placa por 3 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiraron los 50 μ L de la solución de los pozos. Después de obtener la cantidad de células/mL utilizando el protocolo de conteo celular, se llevó la concentración de la suspensión celular a 1×10^6 células/mL agregando más volumen del medio RPMI-1640 suplementado.

Más adelante, se añadieron 200 μ L de suspensión celular 1×10^6 células/mL a los pozos a los que anteriormente se adhirieron los anticuerpos y a los de control negativo. Luego, agregamos antibiótico con concentraciones 1, 10, 25 y 50 μ g/mL (ver anexos) en los pozos problema. La placa se incubó durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂.

6.2.5. Citometría de flujo

Después de los 3 días de incubación, de cada pozo se tomaron 50 μ L del sobrenadante y se agregaron a microtubos para su posterior uso en el análisis de citocinas. Los tubos se etiquetaron con la respectiva condición de cultivo, fecha e iniciales propias; y se almacenaron a 4°C en el refrigerador.

El medio restante de cada pozo se resuspendió a ritmo constante y sin formar burbujas. Añadimos 200 μ L de medio de cada pozo a tubos para citometría previamente etiquetados con las diferentes condiciones de cultivo, adicionando un tubo sin teñir (+).

Para asegurarnos de tomar todas las células de los pozos se realizaron dos lavados. Para el primer lavado se agregaron 200 μ L de DPBS a cada pozo y se raspó suavemente el fondo en distintas direcciones con la punta de la micropipeta de 1000 μ L, teniendo especial cuidado de no doblarla. Después, se resuspendió por todos lados del pozo hasta que se consideró necesario. Tomamos los 200 μ L del pozo y se añaden al tubo para citometría correspondiente. Para el segundo lavado repetimos las mismas indicaciones. Cada uno de los tubos se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y 21°C. Se descartó casi todo el sobrenadante y se resuspendió suavemente.

Posteriormente, se agregaron 100 μ L del cóctel de anticuerpos CD8-FITC, CD45RO-PE, CD3-PerCP, CD4-PECy7, CD45-APC, CD25-Pacific Blue y Ki67-PE/Dazzle a cada tubo (excepto el sin teñir); y se incubaron a 30 minutos a temperatura ambiente cubiertos con papel aluminio (para no permitir que traspasara la luz. Al terminar el tiempo de incubación, se agregó 1 mL de FACS Lysing (fijador) a todos los tubos, sin excepciones.

Después, se incubaron durante 10 minutos cubiertos con papel aluminio y se realizaron dos lavados con 2 mL cada uno con Buffer FACS. Al terminar los lavados, los tubos se almacenaron en el refrigerador para ser leídos al día siguiente con el citómetro de flujo FACSAria III.

6.2.6. Uso del programa FlowJo-V10 para analizar los resultados obtenidos en la citometría de flujo

Una vez leídas las muestras en el citómetro FACSAria III, mediante el programa FlowJo-V10 se analizaron los resultados. Se inició añadiendo las muestras a analizar mediante la opción correspondiente. A continuación, para delimitar las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ de los linfocitos T, se trabajó sobre el tubo autofluorescente (AF), es decir, con el tubo sin teñir. En primer lugar, se aplicaron los marcadores FSC (tamaño) y SSC (complejidad interna) para delimitar a los linfocitos. Luego, para delimitar los linfocitos con mayor especificidad se utilizaron los marcadores CD45, el cual es una proteína tirosina fosfatasa ligada a receptores que se expresa en todos los leucocitos, y SSC-A, correlacionado con la granularidad celular. Después, con los marcadores CD3 y CD45 se delimitaron a los linfocitos T. Posteriormente, con los marcadores CD4 y CD8 se distinguieron las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. Con cada subpoblación se trabajó utilizando los pares de marcadores CD45RO y CD3, y Ki-67 con CD25. Todos los datos obtenidos por el programa se guardaron para su posterior análisis estadístico.

6.2.7. Detección de citocinas extracelulares mediante ensayo CBA

Para la detección de las citocinas 1L-1 β , IL-6, IL-10, IL12p70 y TNF α se utilizó el kit comercial BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines 551811, siguiendo un protocolo optimizado y validado por el laboratorio del Dr. Ismael Mancilla Herrera del Departamento de Infectología e Inmunología del INPer-IER.

Se prepararon los microtubos necesarios, siendo un total de 52 tubos. Se etiquetaron 10 tubos para la curva estándar a 10 puntos (C1 a C10), mientras que 42 de estos tubos incluían las condiciones de las distintas experimentaciones y se les denominó “tubos de muestra”. A los 42 tubos de muestra se les agregaron 10 μ L de su muestra correspondiente y 10 μ L del diluyente para el ensayo. Para los 10 tubos de curva se siguió el protocolo de preparación de estándares del manual del kit CBA.

Se reconstituyó el vial liofilizado Human Inflammatory Cytokine Standards con 2 mL del diluyente incluido en el kit. Se homogeneizó suavemente, evitando la formación de burbujas y espuma y se dejó reposar 15 min antes de su uso. Se adicionaron 300 μ L de diluyente (base proteica tamponada incluida en el kit) a cada tubo ya etiquetado.

Se tomaron 300 uL del estándar y se realizaron diluciones seriadas 1:2. La concentración más alta de la curva fue 5000 pg/mL y como blanco se utilizó diluyente (0 pg/mL).

Se reconstituyó cada vial de perlas citométricas con el diluyente y volumen indicado en la etiqueta de cada vial. Se preparó una mezcla en la que se incorporaron 6 perlas diferentes para medir las citocinas 1L-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e IL-12p70. A los 52 tubos se les agregó 20 μ L de la solución de perlas y 20 μ L del agente de detección. Se incubaron protegidas de la luz durante tres horas a temperatura ambiente.

Posterior a las tres horas de incubación se agregó a cada uno de los 52 tubos, 500 μ L de buffer de lavado y se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se aspiró con cuidado y se desechó. Finalmente se agregaron 75 μ L de buffer de lavado y se resuspendió.

Los tubos se almacenaron en el refrigerador para ser leídos al día siguiente con el citómetro FACSAria III, posteriormente, se analizaron los archivos de datos utilizando el software correspondiente.

6.2.8. Análisis estadístico

Los datos son presentados como la media \pm la desviación estándar de manera gráfica, para lo cual, se realizó un análisis estadístico descriptivo de los resultados proporcionados por FlowJo-V10 y posteriormente los datos se graficaron con el programa GraphPad Prism versión 9.5.1. Los resultados de los grupos de cada parámetro por analizar se examinaron utilizando el Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía con una posterior prueba de Tukey para comparaciones múltiples de medias con el programa GraphPad Prism. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

5. Resultados

En el momento del estudio, la edad media de las participantes era de 29 años (n=3). Esta edad se encuentra dentro del rango de la etapa reproductiva de la mujer (15 a 44 años) y además, en el rango en el que la fertilidad alcanza su punto más alto (19 a 29 años) (Organización Mundial de la Salud, 2018). Los resultados de experimentación y el análisis estadístico se presentan en las Figuras 4, 6-10. Mientras que, en las Figuras 3 y 5 se muestran resultados representativos de citometría de flujo.

7.1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺

Para presentar los resultados relacionados a la concentración de células T CD4⁺ y CD8⁺, las células se trabajaron con marcadores para obtener una mayor especificidad en las subpoblaciones (Fig. 3). Se observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que de T CD8⁺ en las condiciones de estudio. Al comparar entre sí los resultados de las condiciones de estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (p>0.9999) (Fig. 4).

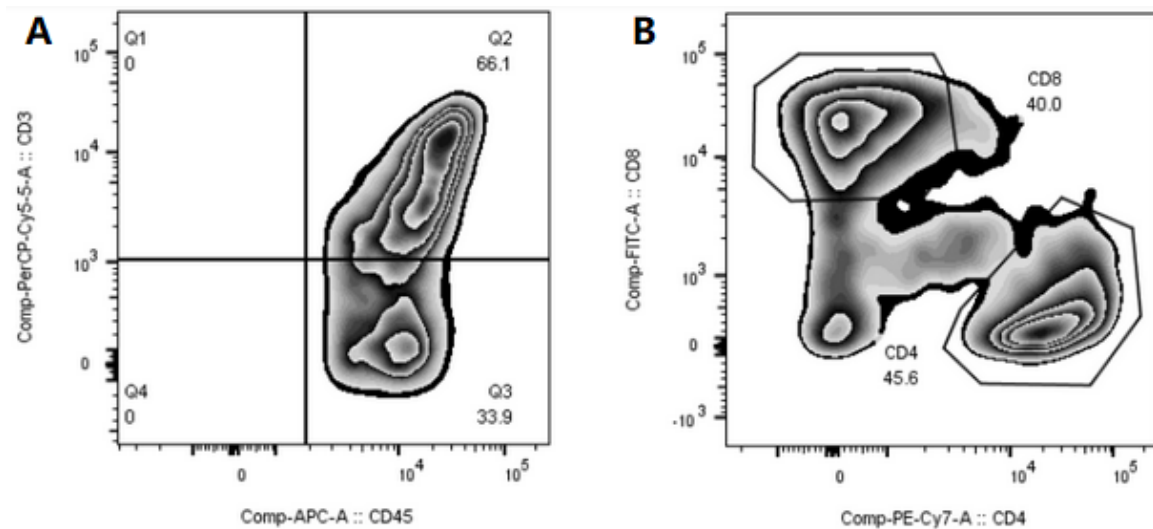


Figura 3. Resultados representativos de citometría de flujo de la delimitación de linfocitos T y sus subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺. **(A)** Mediante el uso de los marcadores CD3 y CD45, se acotaron específicamente a los linfocitos T, cuyo fenotipo es CD3⁺ CD45⁺ (Q2). **(B)** La población de células Q2 se trabajó con los marcadores CD8 y CD4, para definir a las subpoblaciones T CD8⁺ y T CD4⁺, respectivamente.

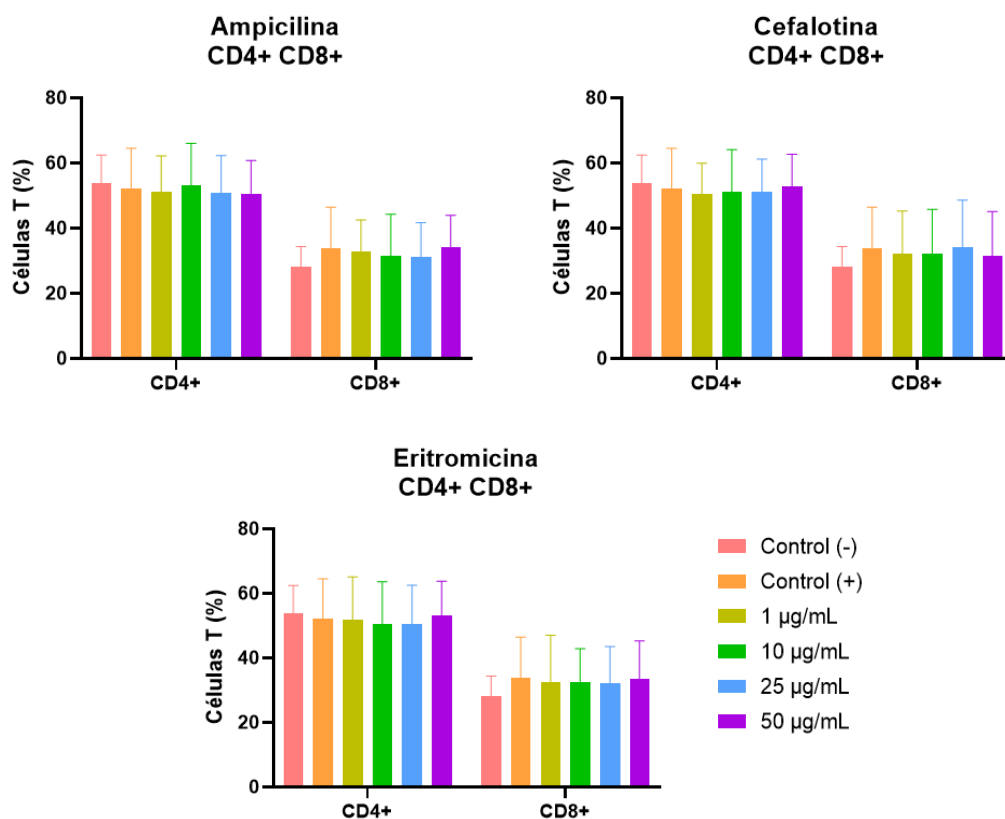


Figura 4. Identificación de células T CD4⁺ y CD8⁺ mediante los marcadores CD4 y CD8 respectivamente, en presencia de los antibióticos ampicilina, cefalotina y eritromicina en concentraciones 1, 10, 25 y 50 µg/mL (n = 3). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de los antibióticos (p>0.9999).

7.2. Expresión de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con CD45RO y CD3

Se estudió la expresión de los marcadores CD45RO y CD3 en las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ para identificar el porcentaje de células T vírgenes presentes, así como de células T efectoras y de memoria (Fig.5). Las células T vírgenes exhiben un fenotipo CD4⁺/CD8⁺ CD3⁺ CD45RO⁻. En el caso de las células T CD4⁺ se observaron en un 34 a 38%, en promedio, mientras que en la subpoblación CD8⁺ se encontraron en un 61 a 72% (Fig. 6-7).

Por otro lado, tanto las células T efectoras como las de memoria muestran un fenotipo CD4⁺/CD8⁺ CD3⁺ CD45RO⁺. Se contempló un mayor porcentaje de células T CD4⁺ con estas características que de T CD8⁺ en las condiciones de estudio. En promedio, alrededor del 62 al 66% de células T tienen un fenotipo CD4⁺ CD3⁺ CD45RO⁺ y, un 28 a 38% aproximadamente, un fenotipo CD8⁺ CD3⁺ CD45RO⁺ (Fig. 6-7).

Al comparar entre sí los resultados de las condiciones de estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.9999$).

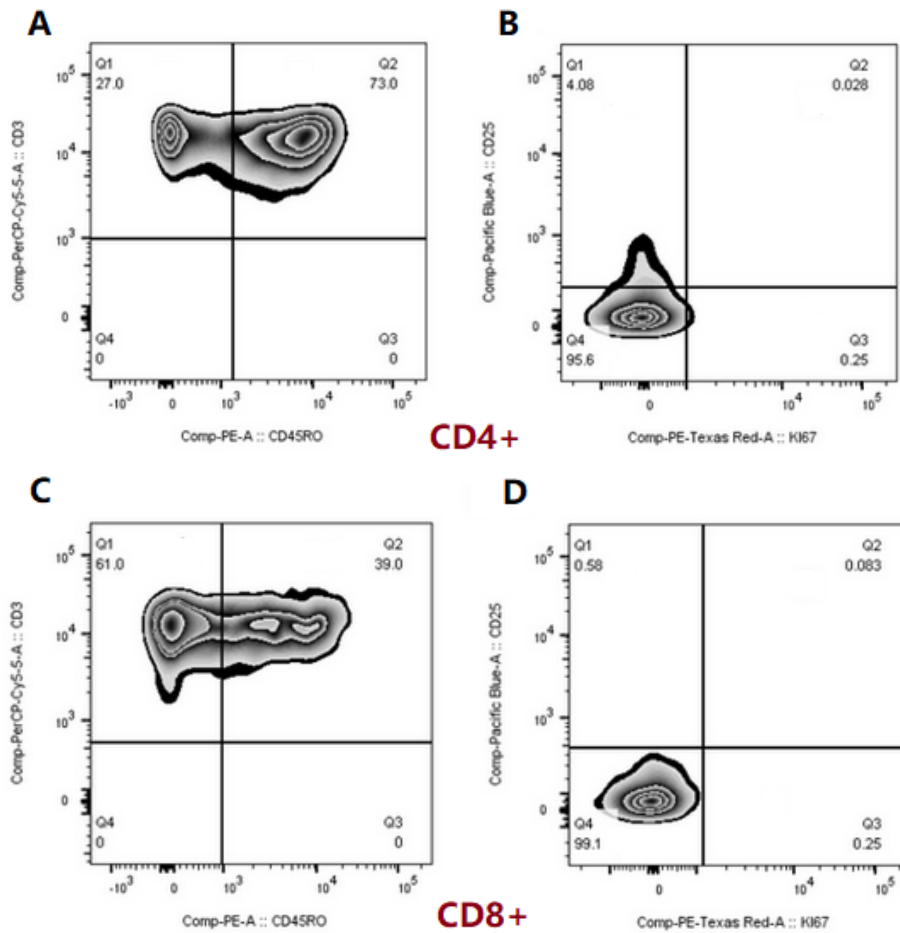


Figura 5. Resultados representativos de citometría de flujo de la expresión de los marcadores CD3 con CD45RO y CD25 con Ki-67 en la población de células T CD4⁺ y CD8⁺. **(A, C)** Alrededor del 27% de las células T CD4⁺ y 61% de las células T CD8⁺ tienen el fenotipo CD3⁺ CD45RO⁻, mientras que el 73% y 39%, respectivamente, tienen un fenotipo CD3⁺ CD45RO⁺. **(B, D)** Tanto las células T CD4⁺ como T CD8⁺ presentan mayormente un fenotipo CD25⁻ Ki-67⁻, con una proporción del 95.6% y 99.1%, en el orden dado.

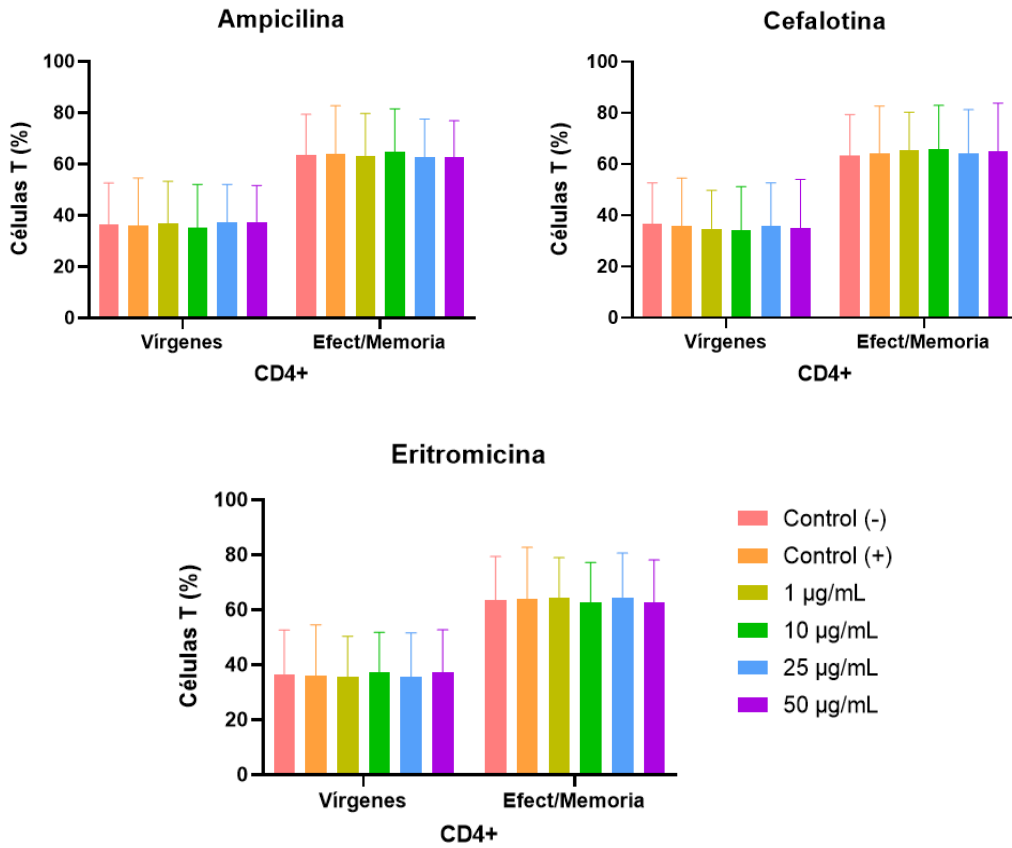


Figura 6. Identificación de células T CD4⁺ vírgenes (CD4⁺ CD45RO⁻ CD3⁺) y, células efectoras y de memoria (CD4⁺ CD45RO⁺ CD3⁺), en presencia de los antibióticos ampicilina, cefalotina y eritromicina en concentraciones 1, 10, 25 y 50 µg/mL (n = 3). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de los antibióticos (p>0.9999).

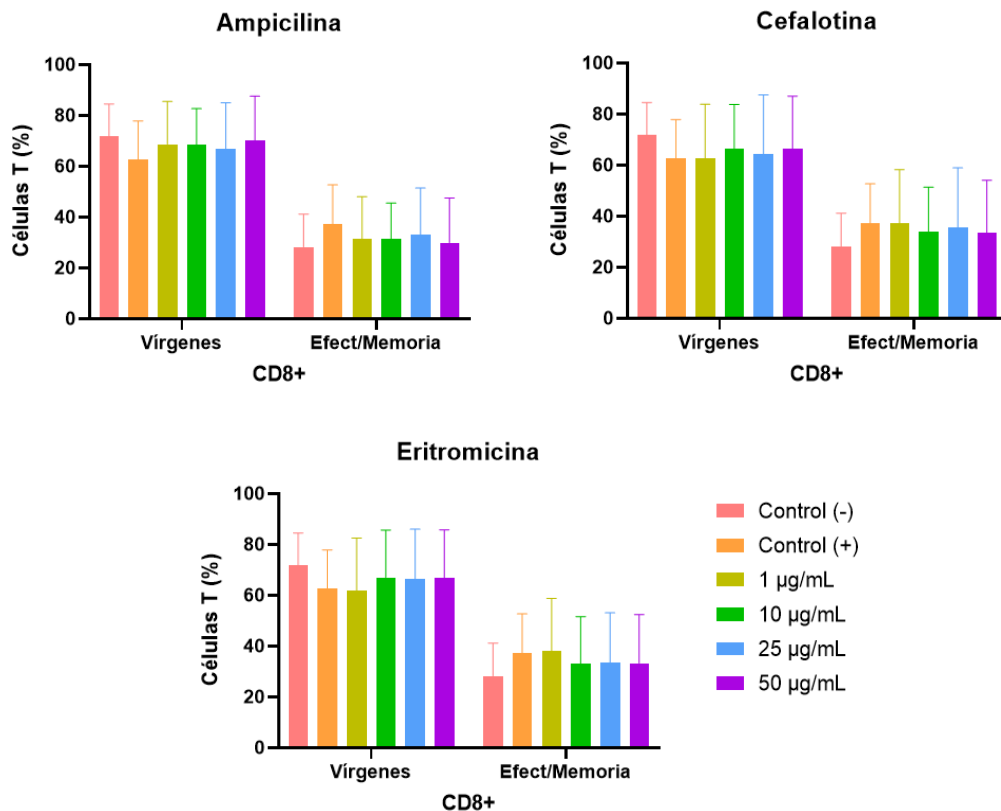


Figura 7. Identificación de células T CD8⁺ vírgenes (CD8⁺ CD45RO⁻ CD3⁺) y células efectoras y de memoria (CD8⁺ CD45RO⁺ CD3⁺), en presencia de los antibióticos ampicilina, cefalotina y eritromicina en concentraciones 1, 10, 25 y 50 µg/mL (n = 3). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de los antibióticos (p>0.9999).

7.3. Activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Los marcadores CD25 y Ki-67 permiten distinguir a células activadas y/o proliferando de aquellas que se encuentran en un estado de reposo (Fig. 5). En las figuras 8 y 9 se presentan los resultados de los distintos fenotipos según la subpoblación de células T (CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente), tales fenotipos son:

- Células T en estado de reposo: CD4⁺/CD8⁺ CD25⁻ Ki-67⁻
- Células T activadas sin proliferar: CD4⁺/CD8⁺ CD25⁺ Ki-67⁻
- Células T activadas y proliferando: CD4⁺/CD8⁺ CD25⁺ Ki-67⁺
- Células T sin activarse y proliferando: CD4⁺/CD8⁺ CD25⁻ Ki-67⁺

Ambas subpoblaciones de células T presentan mayormente un fenotipo CD4⁺/CD8⁺ CD25⁻ Ki-67⁻, con una proporción del 64-95% y 58-97%, en el orden dado. Así como un fenotipo CD4⁺/CD8⁺ CD25⁺ Ki-67⁻, presente en las células T CD4⁺ en un 3 al 33% en promedio (Fig. 8) y en las células T CD8⁺ del 2 al 40% (Fig. 9).

No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de los antibióticos. Con valores de p que varían desde 0.9496 a 0.9959 en la subpoblación de células T CD4⁺ (Fig. 8) y 0.7474 a 0.9767 para T CD8⁺ (Fig. 9).

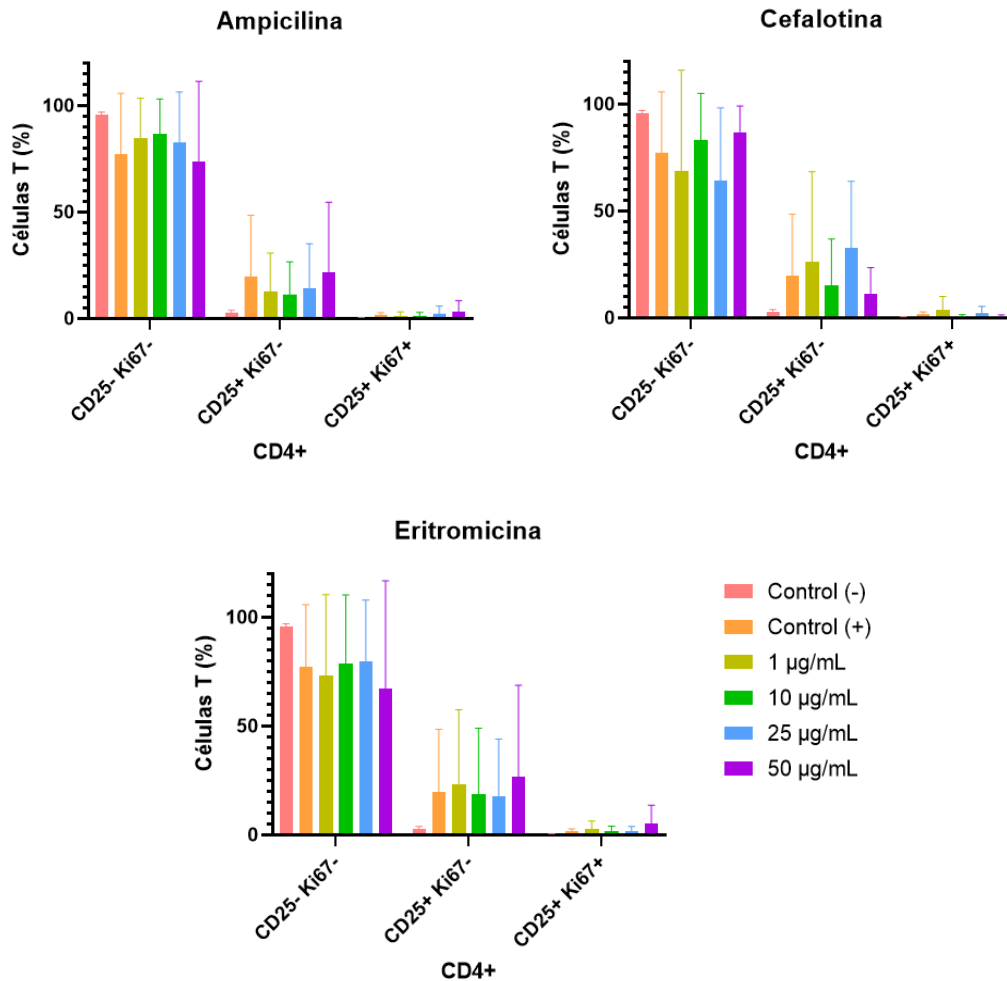


Figura 8. Activación y proliferación en células T CD4⁺. Se observan células T CD4⁺ en reposo (CD4⁺ CD25⁻ Ki-67⁻), células activadas sin proliferar (CD4⁺ CD25⁺ Ki-67⁻) y células activadas proliferando (CD4⁺ CD25⁺ Ki-67⁺), en presencia de los antibióticos ampicilina, cefalotina y eritromicina en concentraciones 1, 10, 25 y 50 µg/mL (n = 3). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de los antibióticos (p>0.94).

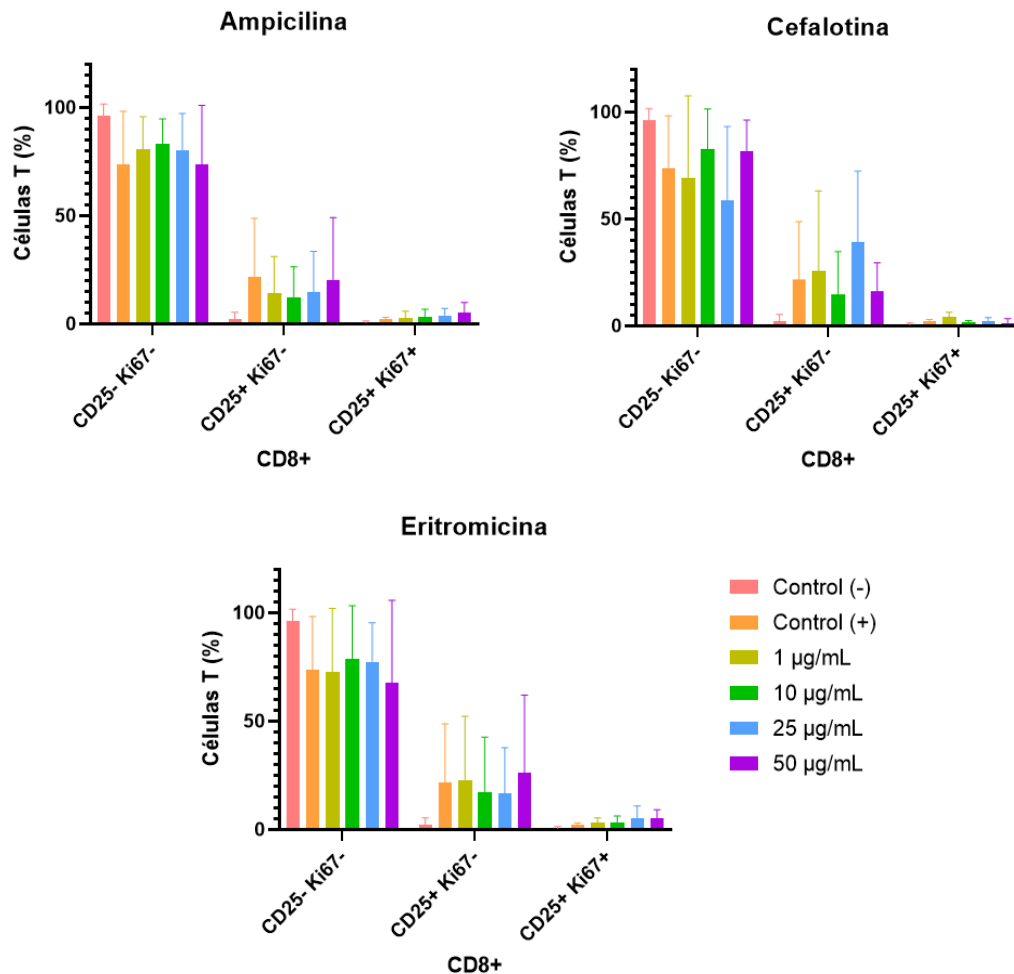


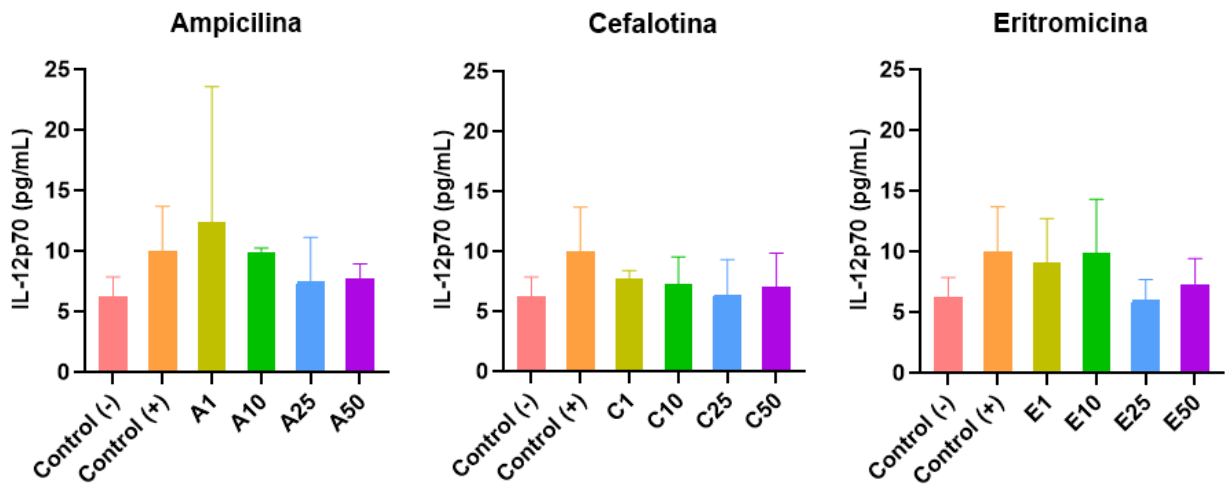
Figura 9. Activación y proliferación en células T CD8⁺. Se observan células T CD8⁺ en reposo (CD8⁺ CD25⁻ Ki-67⁻), células activadas sin proliferar (CD8⁺ CD25⁺ Ki-67⁻) y células activadas proliferando (CD8⁺ CD25⁺ Ki-67⁺), en presencia de los antibióticos ampicilina, cefalotina y eritromicina en concentraciones 1, 10, 25 y 50 µg/mL (n = 3). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de los antibióticos (p>0.74).

7.4. Expresión de citocinas extracelulares

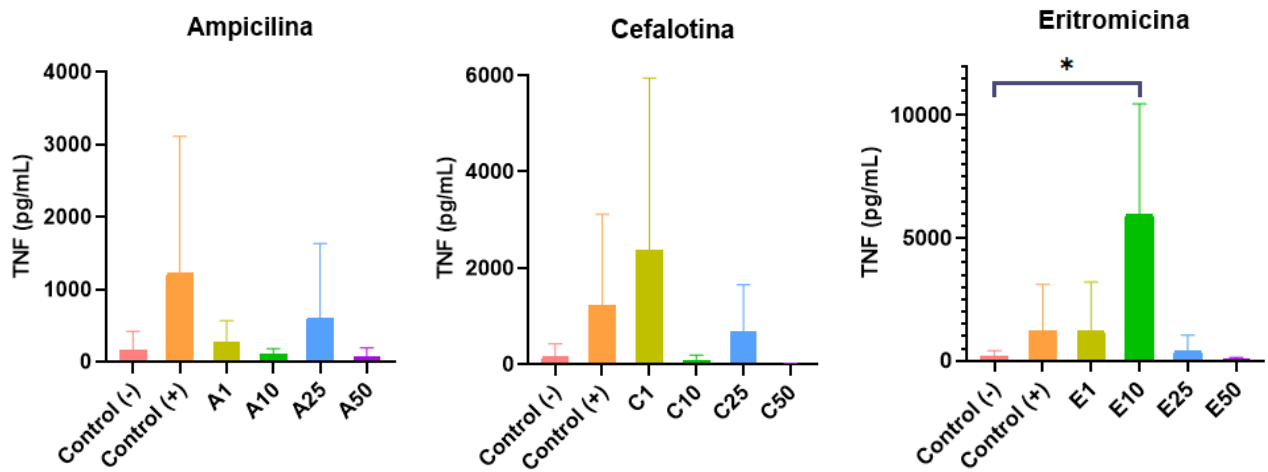
Se examinó el efecto de los antibióticos ampicilina, cefalotina y eritromicina en concentraciones de 1 a 50 µg/mL sobre la producción de las citocinas IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 y TNF en células T estimuladas con α-CD3 y α-CD28.

Como se muestra en la Fig. 10 no se observaron diferencias significativas en la secreción de citocinas entre las células T activadas tratadas con y sin antibióticos. Sin embargo, es importante mencionar que se encontró una p<0.05 al realizar la prueba ANOVA de una vía debido a que la eritromicina a 10 µg/mL incrementó significativamente la producción de TNF y de IL-1β en comparación con el control negativo (sin estimular).

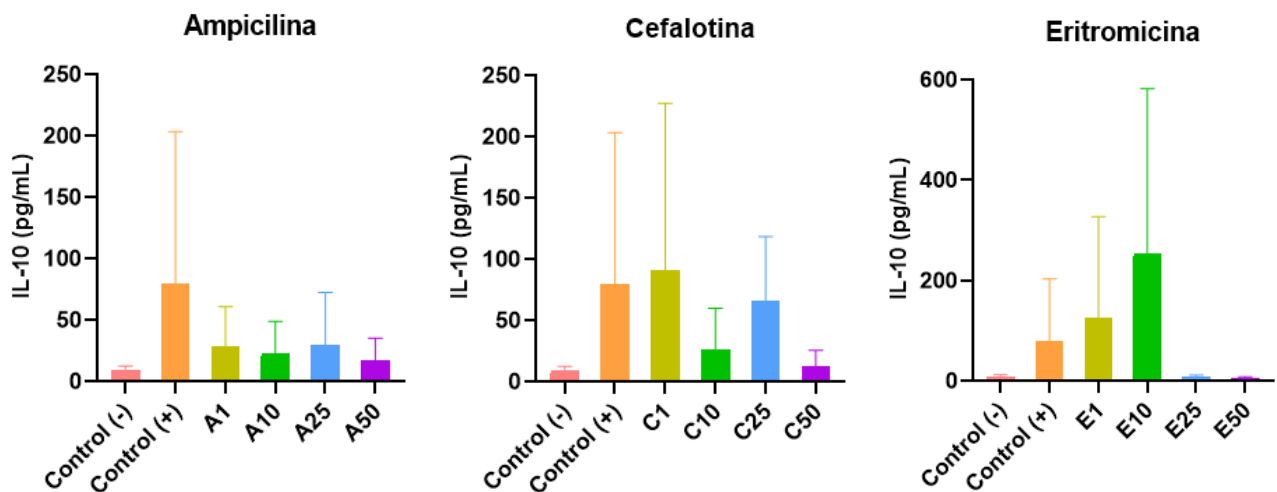
A. Expresión de IL-12p70 (IL-12)



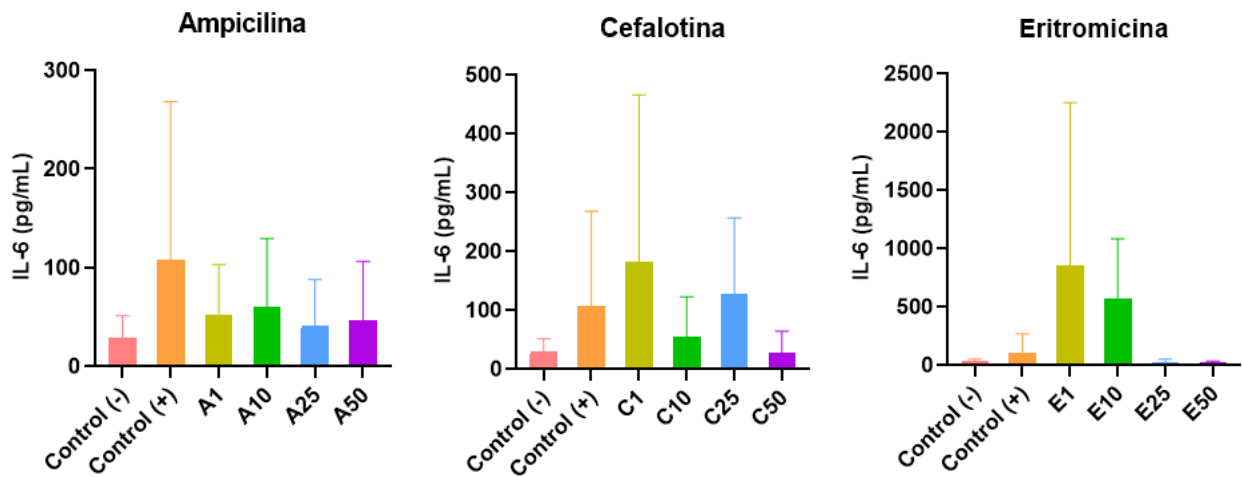
B. Expresión de TNF



C. Expresión de IL-10



D. Expresión de IL-6



E. Expresión de IL-1 β

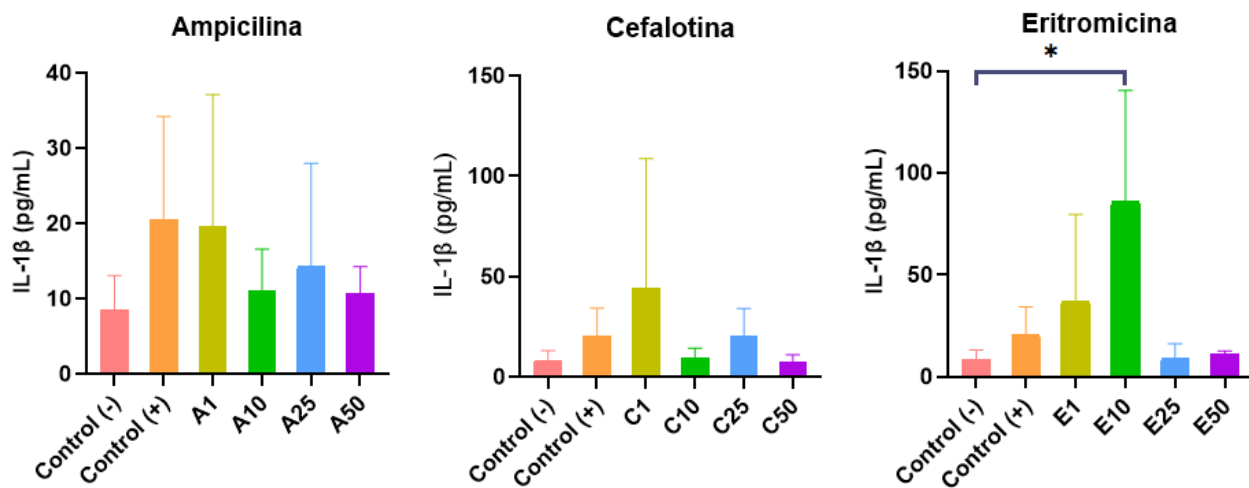


Figura 10. Expresión de citocinas extracelulares. Se analizó el efecto de la ampicilina, cefalotina y eritromicina en dosis de 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ en la concentración de (A) IL-12, (B) TNF, (C) IL-10, (D) IL-6 y (E) IL-1 β ($n = 3$). Se observó una $p < 0.05$ en (B) y (E) en el caso de la eritromicina al realizar la prueba ANOVA de una vía, sin embargo, en las pruebas *post hoc* no se encontraron diferencias significativas en comparación con las células estimuladas no expuestas a antibiótico [control (+)]. En los antibióticos ampicilina y cefalotina no se encontraron diferencias significativas.

8. Discusión

Diversos factores presentes durante la activación de las células T pueden modular las funciones proliferativas y efectoras, y por ende, al fenotipo recíproco. Entre estos factores se incluyen diferentes patógenos, antígenos, factores fisiológicos y agentes antibacterianos. Estos últimos desempeñan papeles muy importantes en la práctica clínica y son el objeto del presente estudio.

En este estudio se utilizó un sistema *in vitro* que produce células T activadas al estimularse las PBMC con anti-CD3/CD28 durante 72 horas, así mismo se agregó antibiótico con concentraciones 1, 10, 25 y 50 µg/mL en los pozos requeridos. Posterior al tiempo de cultivo, las características de las células se analizaron por citometría de flujo utilizando los marcadores CD4, CD8, CD3, CD45RO, CD25 y Ki67; los cuales permitieron definir las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, la expresión de linfocitos T vírgenes, efectores y de memoria. Así como, la activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Además, se analizó si estos antibióticos tienen efectos moduladores sobre las citocinas IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 y TNF; ya que, como se ha afirmado antes, las citocinas producidas en respuesta a una infección tendrán un marcado efecto sobre la diferenciación y la función efectora de las células T, y por lo tanto, sobre la naturaleza de las respuestas inmunes posteriores (Morikawa et al., 2002; Williams et al., 2005).

La producción de estas citocinas no está restringida a determinados subconjuntos de células T, sino que se producen en varios leucocitos. En particular, estudiamos el comportamiento del subconjunto Th1 mediante la producción de una de sus citocinas efectoras (TNF) y de una de sus citocinas polarizantes (IL-12) (Pennock et al., 2013), así como, el comportamiento de las células Th2, mediante la secreción de la IL-6 (Pennock et al., 2013). Además, analizamos la respuesta del entorno mediante la IL-1β cuya función proinflamatoria es crucial para las respuestas de defensa del hospedero frente a infecciones y lesiones (López-Castejon & Brough, 2011) y la IL-10, que es una potente citocina antiinflamatoria (Iyer & Cheng, 2012).

Las principales observaciones de este estudio son las siguientes: Los antibióticos a concentraciones de 1, 10, 25 y 50 µg/mL no ejercieron ningún efecto apreciable *in vitro*, ni sobre la función ni sobre el fenotipo de las células T de donantes humanos sanos.

Las concentraciones máximas séricas de los antibióticos empleados en este trabajo de investigación son de 3-10 µg/mL (ampicilina) y 20-50 µg/mL (cefalotina), en el caso de los betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009); y de 1.5-10 µg/mL para el macrólido eritromicina (Cobos-Trigueros et al., 2009).

Estos son los rangos de concentración que se observan normalmente en la práctica clínica, de ahí que, en el diseño de este estudio se decidiera analizar el efecto supresor en células T *in vitro* con estas dosis.

En el estudio de Huegin *et al.* (1986) se obtuvieron resultados similares a los de este trabajo al emplear antibióticos betalactámicos. Se observaron efectos supresores muy amplios cuando se añadió a los cultivos 1 mM (~550 µg/mL) de ceftazidima y al utilizar una concentración 1/3 mM (~180 µg/mL) se redujo la incorporación de [3H]-timidina, la cual es una medida de proliferación celular, hasta aproximadamente el 50% de los valores de control a las 72 horas. Pero, no se encontraron diferencias significativas en presencia de una concentración de ceftazidima de 1/9 mM (~60 µg/mL). Así mismo, Rouveix *et al.*, (1987) al utilizar cefalotina a una concentración de 50 µg/mL, obtuvieron resultados insignificantes a las 72 h. No obstante, al mantener la misma concentración y aumentar el tiempo de exposición a 96 h, la respuesta proliferativa de los linfocitos T se redujo significativamente ($p < 0.001$). Por su parte, la cefalotina a 100 µg/mL causó un descenso significativo de la proliferación celular, en comparación con los cultivos celulares de control a las 72 h ($P < 0.01$) y 96 h ($P < 0.001$) de cultivo.

En otro estudio, se observó que la penicilina G a 120 µg/mL ejerce un papel inmunomodulador en las células T al afectar a la expresión de diferentes genes de citocinas y por ende, a sus funciones efectoras. En particular, las células tratadas con penicilina G expresaron niveles reducidos de los genes IFN- γ e IL-17A en comparación con las células control (Owlia *et al.*, 2021). El IFN- γ actúa directamente sobre las células T CD4+ activadas permitiendo la diferenciación al subconjunto Th1 (Punt *et al.*, 2020); y es producido en grandes cantidades por las células T CD8+ activadas (Pennock *et al.*, 2013). Por otra parte, la IL-17A es secretada por las células Th17, concediendo que se lleven a cabo las funciones efectoras necesarias (Punt *et al.*, 2020).

Es lógico pensar que las dosis comúnmente empleadas en la clínica no ejerzan un efecto supresor en las células T y sí, las dosis que excedan la concentración máxima sérica. Sin embargo, Manzella & Clark (1983) reportaron de una disminución significativa de la captación de timidina tritiada por moxalactam y cefuroxima a concentraciones de 25 a 200 µg/ml. En otro estudio llevado a cabo por Chaperon & Sanders (1978) encontraron que la cefalexina, la cefradina, la cefalotina, la cefapirina y la rifampicina suprimieron las respuestas proliferativas de los linfocitos a partir de concentraciones de 25 µg/ml ($P < 0,01$).

La mayoría de los informes donde se presentaron pruebas de los efectos antiproliferativos de los antibióticos betalactámicos en las células eucariotas se establecen en los años 1973 a 1990 (Neftel *et al.*, 1989).

Independientemente de los parámetros analizados, los investigadores encontraron que los efectos de los betalactámicos dependieron claramente de la dosis (Neftel et al., 1989). Por tal motivo, se decidió analizar en este trabajo las concentraciones utilizadas en la práctica clínica y confirmar o descartar estos datos.

El comportamiento observado de los macrólidos es muy diferente en este trabajo a lo revisado en la literatura. Keicho *et al.* (1993) encontraron que la eritromicina posee la capacidad de suprimir la respuesta proliferativa de las células T *in vitro* de forma dependiente de la dosis. La incorporación de [3H] timidina se redujo en un 10-20% a 1 µg/mL ($p < 0.01$) y en un 40-60% a 100 µg/mL ($p < 0.001$). Wu *et al.* (2007) trabajaron con concentraciones de eritromicina de 3 µg/mL a 100 µg/mL y encontraron, de manera similar, que la eritromicina puede inhibir la proliferación de células T de un modo notable y dependiente de la concentración. En comparación con las células control, los índices de inhibición (%) aumentan de 22.23 a 38.67 con 3 y 100 µg/mL, respectivamente.

El efecto supresor de la azitromicina fue estudiado por Lin *et al.* (2016). Y en sus resultados también observaron que la azitromicina suprimió la proliferación de células T CD4+, en un 15% a 10 µg/mL ($p = 0.008$) y en un 28% a 50 µg/mL ($p = 0.010$).

Aparte del efecto antibacteriano de los macrólidos, desde hace décadas se ha confirmado que tienen un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio. El estudio pionero que distinguió entre los efectos antimicrobianos y los efectos inmunomoduladores de los macrólidos, se realizó en adultos con panbronquiolitis difusa en los que el tratamiento con eritromicina mejoró drásticamente la supervivencia independientemente de la colonización bacteriana (Zimmerman et al, 2018). Se ha informado en distintos estudios que las células T CD4+ muestran una supresión de la producción de citocinas efectoras Th1 y Th2 de forma dependiente de la dosis en presencia de macrólidos (Zimmerman et al, 2018; Franz et al., 2022). Estas alteraciones en la función de las células T se observan desde concentraciones mínimas, como es 1 µg/mL; aumentando significativamente la supresión conforme aumenta la concentración.

Morikawa et. al. (2002), examinaron los efectos de los macrólidos: claritromicina, midecamicina acetato y josamicina sobre la producción de citocinas TNF, IL-6 e IL-10 a concentraciones de 1.6 a 40 µg/mL. En sus resultados reportaron que la secreción de TNF- α fue notablemente inhibida en todas las concentraciones y por todos los fármacos utilizados. Mientras que la secreción de IL-6 sólo fue suprimida significativamente a una concentración de 40 µg/ml por los macrólidos examinados.

Por otro lado, el efecto de los tres macrólidos sobre la secreción de IL-10 fue el menos potente y no se observaron diferencias significativas. De igual forma, en el estudio llevado por Sugiyama et. al. (2007) observaron que la claritromicina (10 µg/mL) inhibió significativamente la producción de IL-6 en comparación con el control. Aunque, la azitromicina (10 µg/mL) aumentó significativamente la producción de IL-10 en comparación con el control, no hubo diferencias estadísticas significativas por parte de ambos macrólidos en la producción de IL-12p40 y TNF-α. Por último, Lin et al. (2016) examinaron el efecto supresor de la azitromicina en la producción de citocinas y encontraron que a una concentración de 10 µg/mL la secreción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF-α se inhibió considerablemente ($p < 0.05$); por otro lado, en su estudio la azitromicina no afectó a la secreción de IL-1β.

Entonces, ¿por qué en este estudio no se observó un efecto supresor en las células tratadas con eritromicina en comparación con las células control? Esto tiene que ver principalmente con el hecho de que la mayoría de las células T CD4⁺ y CD8⁺ se encontraron en un estado de reposo y, menos del 5% de las células estaban activadas y proliferando. Al estimular a las células con anti-CD3/CD28 se esperaba que las células T proliferaran ampliamente *in vitro*. Hay que hacer notar que, por lo general, las células T humanas deben incubarse con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3-5 días para detectar picos de proliferación y activación. Así que, para obtener los efectos máximos es necesario replantear las condiciones de tiempo de incubación y encontrar el mejor tiempo. Además de que debe considerarse realizar una revisión del diseño para llegar a una adecuada estandarización de los procesos.

Las principales limitaciones de este trabajo son el tamaño relativamente pequeño de la muestra, el uso de un solo punto de tiempo de cultivo (72 horas) y no haber realizado algún ensayo de viabilidad celular al tiempo de analizar los resultados por citometría de flujo. Considero conveniente aumentar el tamaño de la muestra, de tal forma que sea lo suficientemente grande para poder garantizar que es una muestra representativa. Mientras que, como se puede observar en los resultados ya mencionados del estudio de Rouveix et al. (1987), la respuesta celular puede cambiar significativamente al aumentar el tiempo de cultivo de 72 a 96 horas. Por lo que, es importante tomar en consideración examinar los resultados en más de un punto temporal. Finalmente, los ensayos de viabilidad celular nos permitirán confirmar que las células muertas permanecieron excluidas del análisis citométrico y nos garantizarán unos datos más precisos (Labclinics, 2017).

En último término, recomiendo que en próximas investigaciones de este tema se evalúe la expresión de marcadores y de genes de algunas citocinas extracelulares, así como de factores de transcripción. Estos datos ayudarán a definir, por la expresión diferenciada de moléculas, a los subconjuntos de células T CD4⁺ y a las células CD8⁺ (Wik & Skålhegg, 2022)

A pesar de los resultados no concluyentes, distintos estudios han demostrado que los antibióticos betalactámicos y macrólidos, tienen efectos moduladores sobre la activación y proliferación de las células T de manera dependiente de la dosis. Estos antibióticos pueden afectar a respuestas inmunitarias específicas y esto es algo que debe tenerse en cuenta en la práctica clínica. Especialmente durante el tratamiento de pacientes con una función inmunitaria comprometida, como son, pacientes inmunodeficientes, pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos, y, sobre todo, en pacientes mujeres embarazadas, así como, en planificación reproductiva (Rouveix et al., 1987; Williams et al., 2005).

Incluso un tratamiento corto con antibióticos altera las comunidades bacterianas de los huéspedes humanos y a veces pueden tener un efecto residual duradero en el microbioma, con posibles consecuencias metabólicas o inmunitarias. Y, en el caso específico del embarazo, un microbioma sano es importante para mantener un embarazo normal (Kuperman & Kore, 2016). Gómez de Agüero *et al.* (2016) demostraron que la microbiota materna durante el embarazo determina el desarrollo inmunitario postnatal temprano.

Para concluir, la indicación del uso de antimicrobianos en el embarazo debe someterse siempre a una evaluación de la relación riesgo/beneficio. La elección del antimicrobiano utilizado para cualquier infección dada debe ser la más segura con eficacia probada. De la misma forma, la dosis y la duración deben ser las mínimas necesarias para un tratamiento eficaz (Lamont et al., 2014).

9. Conclusiones

Los resultados de este trabajo no pudieron confirmar el papel inmunomodulador de la ampicilina, cefalotina y eritromicina, al no afectar el tratamiento con antibióticos en sus distintas concentraciones a la función y fenotipo de las células (linfocitos) T de mujeres en edad reproductiva. No se observaron diferencias significativas en las células T activadas y/o proliferando al ser tratadas con o sin antibióticos. Además, en la ausencia y presencia de antibióticos en la expresión de los marcadores de linaje tampoco se observaron diferencias significativas. Los datos sugieren que las dosis empleadas normalmente en la práctica clínica de ampicilina, cefalotina y eritromicina no afectan significativamente la respuesta de las células T. No obstante, debido a las limitaciones de este estudio, para corroborar esta información es necesario extender el análisis en el tamaño de muestra, así como evaluar el efecto de los tratamientos a dosis más altas y en tiempos de incubación más prolongados.

10. Referencias

1. Alspach, E., Lussier, D. M., & Schreiber, R. D. (2018). Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(3), a028480. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028480>
2. Aminov, R. I. (2013). Biotic acts of antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00241>
3. Amir, M., Brown, J. A., Rager, S. L., Sanidad, K. Z., Ananthanarayanan, A., & Zeng, M. Y. (2020). Maternal Microbiome and Infections in Pregnancy. *Microorganisms*, 8(12), 1996. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121996>
4. Avram, M. J. (2020). Pharmacokinetic studies in pregnancy. *Seminars in Perinatology*, 44(3), 151227. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151227>
5. Bajnok, A., Ivanova, M., Rigó, J., & Toldi, G. (2017). The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. *Mediators of Inflammation*, 2017, 8045161. <https://doi.org/10.1155/2017/8045161>
6. Barrero, S., Cuéllar, A., Rueda, N. S., Cardozo, C., & González, J. M. (2001). Determinación de valores de linfocitos T CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ por citometría de flujo en donantes de sangre, adultos de Bogotá. *Acta Médica Colombiana*, 26(6), 280–285. <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/06-2001-05.htm>
7. Benner, M., Lopez-Rincon, A., Thijssen, S., Garssen, J., Ferwerda, G., Joosten, I., van der Molen, R. G., & Hogenkamp, A. (2021). Antibiotic Intervention Affects Maternal Immunity During Gestation in Mice. *Frontiers in Immunology*, 12, 685742. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.685742>
8. Body, C., & Christie, J. A. (2016). Gastrointestinal Diseases in Pregnancy. *Gastroenterology Clinics of North America*, 45(2), 267–283. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.02.005>
9. Bonet, M., Oladapo, O. T., Khan, D. N., Mathai, M., & Gülmezoglu, A. M. (2015). New WHO guidance on prevention and treatment of maternal peripartum infections. *The Lancet Global Health*, 3(11), e667–e668. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(15\)00213-2](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(15)00213-2)
10. Bookstaver, P. B., Bland, C. M., Griffin, B., Stover, K. R., Eiland, L. S., & McLaughlin, M. (2015). A Review of Antibiotic Use in Pregnancy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(11), 1052–1062. <https://doi.org/10.1002/phar.1649>

11. Bradley, Z. (2020, February 14). *Technologies for Measuring Cell Surface Markers*. Cofactor Genomics. <https://cofactorgenomics.com/wk-9-2020-cell-surface-markers/>
12. Bramham, K., Parnell, B., Nelson-Piercy, C., Seed, P. T., Poston, L., & Chappell, L. C. (2014). Chronic hypertension and pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, *348*(apr15 7), g2301–g2301. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2301>
13. Callegari, L. S., Ma, E. W., & Schwarz, E. B. (2015). Preconception Care and Reproductive Planning in Primary Care. *Medical Clinics of North America*, *99*(3), 663–682. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.01.014>
14. Cardetti, M., Rodríguez, S., & Sola, A. (2020). Uso (y abuso) de antibióticos en la medicina perinatal. *Anales de Pediatría*, *93*(3), 207.e1–207.e7. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.06.010>
15. Chaperon, E. A., & Sanders, W. E. (1978). Suppression of lymphocyte responses by cephalosporins. *Infection and Immunity*, *19*(2), 378–384. <https://doi.org/10.1128/iai.19.2.378-384.1978>
16. CHENG, R., GUO, J., ZHANG, Y., CHENG, G., QIAN, W., WAN, C., LI, M., MAROTTA, F., SHEN, X., & HE, F. (2020). Impacts of ceftriaxone exposure during pregnancy on maternal gut and placental microbiota and its influence on maternal and offspring immunity in mice. *Experimental Animals*, *70*(2), 203–217. <https://doi.org/10.1538/expanim.20-0114>
17. Cobos-Trigueros, N., Ateka, O., Pitart, C., & Vila, J. (2009). Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *27*(7), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.002>
18. De Wolff, M. G., Johansen, M., Rom, A. L., Midtgaard, J., Tabor, A., & Hegaard, H. K. (2021). Degree of pregnancy planning and recommended pregnancy planning behavior among women with and without chronic medical conditions – A large hospital-based cross-sectional study. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *100*(6). <https://doi.org/10.1111/aogs.14069>
19. Di Rosa, F., Cossarizza, A., & Hayday, A. C. (2021). To Ki or Not to Ki: Re-Evaluating the Use and Potentials of Ki-67 for T Cell Analysis. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653974>
20. Feghali, M., Venkataramanan, R., & Caritis, S. (2015). Pharmacokinetics of drugs in pregnancy. *Seminars in Perinatology*, *39*(7), 512–519. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2015.08.003>
21. Franz, T., Negele, J., Bruno, P., Böttcher, M., Mitchell-Flack, M., Reemts, L., Krone, A., Mougiakakos, D., Müller, A. J., Zautner, A. E., & Kahlfuss, S. (2022). Pleiotropic effects of antibiotics on T cell metabolism and T cell-mediated immunity. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 975436. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.975436>

22. Gonzalez-Perez, G., Hicks, A. L., Tekieli, T. M., Radens, C. M., Williams, B. L., & Lamou  -Smith, E. S. N. (2016). Maternal Antibiotic Treatment Impacts Development of the Neonatal Intestinal Microbiome and Antiviral Immunity. *The Journal of Immunology*, 196(9), 3768–3779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502322>
23. Gomez de Aguerro, M., Ganal-Vonarburg, S. C., Fuhrer, T., Rupp, S., Uchimura, Y., Li, H., Steinert, A., Heikenwalder, M., Hapfelmeier, S., Sauer, U., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2016). The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science*, 351(6279), 1296–1302. <https://doi.org/10.1126/science.aad2571>
24. Huegin, A. W., Cerny, A., Zinkernagel, R. M., & Neffel, K. A. (1986). Suppressive effects of B-lactam-antibiotics on in vitro generation of cytotoxic T-cells. *International Journal of Immunopharmacology*, 8(7), 723–729. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(86\)90008-1](https://doi.org/10.1016/0192-0561(86)90008-1)
25. INPer. (2022). *INTRANET INPer*. Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de Los Reyes” INTRANET. <https://www.inper.mx/intranet/>
26. Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., & Ishigame, H. (2008). The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Reviews*, 226(1), 57–79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2008.00699.x>
27. Keicho, N., Kudoh, S., Yotsumoto, H., & Akagawa, K. S. (1993). Antilymphocytic activity of erythromycin distinct from that of FK506 or cyclosporin A. *The Journal of Antibiotics*, 46(9), 1406–1413. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1406>
28. Khantakova, J. N., Bulygin, A. S., & Sennikov, S. V. (2022). The Regulatory-T-Cell Memory Phenotype: What We Know. *Cells*, 11(10), 1687. <https://doi.org/10.3390/cells11101687>
29. Kim, J.-K., Shin, Y. J., Ha, L. J., Kim, D.-H., & Kim, D.-H. (2019). Unraveling the Mechanobiology of the Immune System. *Advanced Healthcare Materials*, 8(4), e1801332. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801332>
30. Kumar, M., Saadaoui, M., & Al Khodor, S. (2022). Infections and Pregnancy: Effects on Maternal and Child Health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873253>
31. Kuperman, A. A., & Koren, O. (2016). Antibiotic use during pregnancy: how bad is it? *BMC Medicine*, 14. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0636-0>
32. Labclinics. (2017). *GUIA FIXABLE VIABILITY DYES (FVD): células vivas y muertas*. Labclinics. <https://www.labclinics.com/2017/03/07/guia-fixable-viability-dyes-celula-muerta-viva-citometria/>
33. Lamont, H. F., Blogg, H. J., & Lamont, R. F. (2014). Safety of antimicrobial treatment during pregnancy: a current review of resistance, immunomodulation and

- teratogenicity. *Expert Opinion on Drug Safety*, 13(12), 1569–1581. <https://doi.org/10.1517/14740338.2014.939580>
34. Lamont, R., Sobel, J., Kusanovic, J., Vaisbuch, E., Mazaki-Tovi, S., Kim, S., Uldbjerg, N., & Romero, R. (2010). Current debate on the use of antibiotic prophylaxis for caesarean section. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 118(2), 193–201. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02729.x>
35. Lee, H.-G., Cho, M.-Z., & Choi, J.-M. (2020). Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(8), 1255–1263. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00486-7>
36. Levinson, W., Chin-Hong, P., Joyce, E. A., Nussbaum, J., & Schwartz, B. (2022). *Microbiología médica e inmunología. Una guía acerca de las enfermedades infecciosas*, 17e. AccessMedicina. <https://accessmedicina.mhmedical.com/Book.aspx?bookid=3219>
37. LifeMap Sciences. (2023, January 10). *IFNG Gene - GeneCards | IFNG Protein | IFNG Antibody*. [Www.genecards.org](https://www.genecards.org). <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNG>
38. Lin, S.-J., Kuo, M.-L., Hsiao, H.-S., & Lee, P.-T. (2016). Azithromycin modulates immune response of human monocyte-derived dendritic cells and CD4+ T cells. *International Immunopharmacology*, 40, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.09.012>
39. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
40. Manzella, J. P., & Clark, J. K. (1983). Effects of moxalactam and cefuroxime on mitogen-stimulated human mononuclear leukocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(3), 360–363. <https://doi.org/10.1128/AAC.23.3.360>
41. McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F. (2019). Introduction to the Immune System. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2024, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_1
42. Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
43. Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398, 237–272. https://doi.org/10.1007/82_2016_499
44. Mor, F., & Cohen, I. R. (2013). Beta-lactam antibiotics modulate T-cell functions and gene expression via covalent binding to cellular albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), 2981–2986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215722110>

45. Mor, G., & Cardenas, I. (2010). The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>
46. Morikawa, K., Zhang, J., Nonaka, M., & Morikawa, S. (2002). Modulatory effect of macrolide antibiotics on the Th1- and Th2-type cytokine production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(1), 53–59. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00457-5](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00457-5)
47. Neftel, K.A., Huynh, U.D., Hübscher, U. (1989). Effect of Beta-Lactam Antibiotics on Eukaryotic DNA Replication: Possible Impact on the Host-Parasite Relationship. In: Gillissen, G., Opferkuch, W., Peters, G., Pulverer, G. (eds). *The Influence of Antibiotics on the Host-Parasite Relationship III*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73653-7_37
48. Nicolaou, K. C., & Rigol, S. (2017). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*, 71(2), 153–184. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>
49. NIH. (2022, December 4). *TBX21 T-box transcription factor 21 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. NIH. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/30009>
50. Nyangahu, D. D., Lennard, K. S., Brown, B. P., Darby, M. G., Wendoh, J. M., Havyarimana, E., Smith, P., Butcher, J., Stintzi, A., Mulder, N., Horsnell, W., & Jaspán, H. B. (2018). Disruption of maternal gut microbiota during gestation alters offspring microbiota and immunity. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0511-7>
51. Oh, J., Patel, J., Park, H. B., & Crawford, J. M. (2018). β -Lactam Biotransformations Activate Innate Immunity. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(13), 7173–7179. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00241>
52. Organización Mundial de la Salud. (2018, September 25). *Salud de la mujer*. www.who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/women-s-health>
53. Owlia, S., Shams, A., Asl, A., & Owlia, M. (2021). Effects of crystalline penicillin G sodium on human T-cells differentiation. *Journal of Research in Medical Sciences*, 26(1), 19. https://doi.org/10.4103/jrms.jrms_833_19
54. Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., Cheney, E. E., Tamburini, B. A., & Kedl, R. M. (2013). T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*, 37(4), 273–283. <https://doi.org/10.1152/advan.00066.2013>
55. Pronovost, G. N., & Hsiao, E. Y. (2019). Perinatal Interactions between the Microbiome, Immunity, and Neurodevelopment. *Immunity*, 50(1), 18–36. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.016>
56. Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Owen, J. A. (2020). *KUBY. Inmunología, 8e*. AccessMedicina. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2951>

57. Ratajczak, W., Niedźwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Deptuła, B., & Deptuła, W. (2018). Immunological Memory Cells. *Central European Journal of Immunology*, 43(2), 194–203. <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.77390>
58. Riedel, S., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., Sakanari, J. A., Hotez, P., & Mejia, R. (2020). *Microbiología médica*. AccessMedicina. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2955>
59. Rouveix, B., Groult, F., & Levacher, M. (1987). Beta-lactam antibiotics and human lymphocyte function: The in vitro effect on blastogenesis, lymphokine production and suppressor cell functions. *International Journal of Immunopharmacology*, 9(5), 567–575. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(87\)90124-x](https://doi.org/10.1016/0192-0561(87)90124-x)
60. Seattle Children's Hospital. (2023). *T Cells CD45 RA and RO*. Seattle Children's. <https://seattlechildrenslab.testcatalog.org/show/Lymphocyte-Subset-analysis-1>
61. Secretaría de Salud. (2015, September 9). *Programa de Planificación Familiar y Anticoncepción*. CNEGSR. Secretaría de Salud. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/programa-de-planificacion-familiar-y-anticoncepcion-cnegsr>
62. Singh, S. B., Young, K., & Silver, L. L. (2017). What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.003>
63. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
64. Sugiyama, K., Shirai, R., Mukae, H., Ishimoto, H., Nagata, T., Sakamoto, N., Ishii, H., Nakayama, S., Yanagihara, K., Mizuta, Y., & Kohno, S. (2007). Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 147(3), 540–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03299.x>
65. Taylor, S. D., & Palmer, M. (2016). The action mechanism of daptomycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(24), 6253–6268. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.052>
66. Tydén, T., Verbiest, S., Van Achterberg, T., Larsson, M., & Stern, J. (2016). Using the Reproductive Life Plan in contraceptive counselling. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121(4), 299–303. <https://doi.org/10.1080/03009734.2016.1210267>
67. Wan, Y. Y. (2014). GATA3: A master of many trades in immune regulation. *Trends in Immunology*, 35(6), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.002>
68. Wang, Y., Qiu, F., Xu, Y., Hou, X., Zhang, Z., Huang, L., Wang, H., Xing, H., & Wu, S. (2021). Stem cell-like memory T cells: The generation and application. *Journal of Leukocyte Biology*, 110(6), 1209–1223. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MR0321-145R>

69. Wik, J. A., & Skålhegg, B. S. (2022). T Cell Metabolism in Infection. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840610>
70. Williams, A. C., Galley, H. F., Watt, A. M., & Webster, N. R. (2005). Differential effects of three antibiotics on T helper cell cytokine expression. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 502–506. <https://doi.org/10.1093/jac/dki251>
71. Williams, M. J., Carvalho Ribeiro do Valle, C., & Gyte, G. M. (2021). Different classes of antibiotics given to women routinely for preventing infection at caesarean section. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd008726.pub3>
72. Wu, L., Zhang, W., Tian, L., Bao, K., Li, P., & Lin, J. (2007). Immunomodulatory effects of erythromycin and its derivatives on human T-lymphocyte in vitro. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 29(3-4), 587–596. <https://doi.org/10.1080/08923970701692841>
73. Zaffiri, L., Gardner, J., & Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, 25(2), 67–77. <https://doi.org/10.3109/08941939.2012.664099>
74. Zarogoulidis, P., Papanas, N., Kioumis, I., Chatzaki, E., Maltezos, E., & Zarogoulidis, K. (2011). Macrolides: from in vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties to clinical practice in respiratory diseases. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 68(5), 479–503. <https://doi.org/10.1007/s00228-011-1161-x>
75. Zelante, T., Fric, J., Wong, A. Y. W., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2012). Interleukin-2 Production by Dendritic Cells and its Immuno-Regulatory Functions. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00161>
76. Zimmermann, P., Ziesenitz, V. C., Curtis, N., & Ritz, N. (2018). The Immunomodulatory Effects of Macrolides—A Systematic Review of the Underlying Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00302>
77. Zinner, S. H. (2007). Antibiotic use: present and future. *The New Microbiologica*, 30(3), 321–325. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17802919/>

Anexos

Cálculos

1) Preparación de medio de cultivo RPMI-1640

$$V_{\text{Suero fetal bovino}} = \frac{(10\%)(500 \text{ mL})}{100\%} = 50 \text{ mL}$$

$$V_{\text{L-glutamina}} = \frac{(2 \text{ mM})(500 \text{ mL})}{200 \text{ mM}} = 5 \text{ mL}$$

$$V_{\text{Piruvato de sodio}} = \frac{(1 \text{ mM})(500 \text{ mL})}{100 \text{ mM}} = 5 \text{ mL}$$

$$V_{\text{Aminoácidos no esenciales}} = \frac{(1X)(500 \text{ mL})}{100 X} = 5 \text{ mL}$$

$$V_{\beta\text{-mercaptoetanol}} = \frac{(50 \mu\text{M})(500 \text{ mL})}{55 \mu\text{M}} \cdot \frac{1 \text{ mM}}{1000 \mu\text{M}} = 0.045 \text{ mL}$$

2) Conteo de células mediante tinción vital con azul de tripano

Fórmula general: #células/mL = (\bar{x} de células) (vol. original) (10) (10000)

$$S1 \text{ \#células/mL} = (41) (2 \text{ mL}) (10) (10000) = 8\,200\,000 \text{ cel/mL}$$

$$S2 \text{ \#células/mL} = (32) (2 \text{ mL}) (10) (10000) = 6\,400\,000 \text{ cel/mL}$$

$$S3 \text{ \#células/mL} = (30) (2 \text{ mL}) (10) (10000) = 6\,000\,000 \text{ cel/mL}$$

3) Cultivo celular en placa

$$\alpha\text{-CD3: } 2.8 \text{ mg/mL (stock)} \Rightarrow 5 \mu\text{g/mL} \times 0.05 \text{ mL} = 0.25 \mu\text{g}$$

$$2800 \mu\text{g} - 1 \text{ mL} \Rightarrow \text{dilución } 1:100 \Rightarrow 28 \mu\text{g/mL}$$

$$V_{\alpha\text{-CD3}} = \frac{0.25 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{28 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 8.9 \mu\text{L de } \alpha\text{CD3/ pozo}$$

$$\alpha\text{-CD28: } 1.81 \text{ mg/mL (stock)} \Rightarrow 2.5 \mu\text{g/mL} \times 0.05 \text{ mL} = 0.125 \mu\text{g}$$

$$1810 \mu\text{g} - 1 \text{ mL} \Rightarrow \text{dilución } 1:100 \Rightarrow 18.1 \mu\text{g/mL}$$

$$V_{\alpha\text{-CD28}} = \frac{0.125 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{18.1 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 6.9 \mu\text{L de } \alpha\text{CD28/ pozo}$$

$$\text{DPBS: } V_{\text{DPBS}} = 50 \mu\text{L} - 8.9 \mu\text{L} - 6.9 \mu\text{L} = 34.2 \mu\text{L de DPBS/ pozo}$$

a) Antibióticos

Se requieren 4 concentraciones:

- 1 $\mu\text{g/mL}$: $1 \mu\text{g/mL} \times 0.2 \text{ mL} = 0.2 \mu\text{g}$
- 10 $\mu\text{g/mL}$: $10 \mu\text{g/mL} \times 0.2 \text{ mL} = 2 \mu\text{g}$
- 25 $\mu\text{g/mL}$: $25 \mu\text{g/mL} \times 0.2 \text{ mL} = 5 \mu\text{g}$
- 50 $\mu\text{g/mL}$: $50 \mu\text{g/mL} \times 0.2 \text{ mL} = 10 \mu\text{g}$

Ampicilina: 1000 $\mu\text{g/mL}$ (stock)

- 1 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{0.2 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{100 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 2 \mu\text{L}$

1000 $\mu\text{g} - 1 \text{ mL} \Rightarrow$ dilución 1: 10 \Rightarrow 100 $\mu\text{g/mL}$

- 10 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{2 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 2 \mu\text{L}$

- 25 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{5 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 5 \mu\text{L}$

- 50 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{10 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 10 \mu\text{L}$

Cefalotina: 1000 $\mu\text{g/mL}$ (stock)

- 1 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{0.2 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{100 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 2 \mu\text{L}$

1000 $\mu\text{g} - 1 \text{ mL} \Rightarrow$ dilución 1: 10 \Rightarrow 100 $\mu\text{g/mL}$

- 10 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{2 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 2 \mu\text{L}$

- 25 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{5 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 5 \mu\text{L}$

- 50 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{10 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 10 \mu\text{L}$

Eritromicina: 500 $\mu\text{g/mL}$ (stock)

- 1 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{0.2 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{50 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 4 \mu\text{L}$

500 $\mu\text{g} - 1 \text{ mL} \Rightarrow$ dilución 1: 10 \Rightarrow 50 $\mu\text{g/mL}$

- 10 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{2 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{500 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 4 \mu\text{L}$

- 25 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{5 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{500 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 10 \mu\text{L}$

- 50 $\mu\text{g/mL}$: $\frac{10 \mu\text{g} \times 1 \text{ mL}}{500 \mu\text{g}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 20 \mu\text{L}$