



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización fenotípica de linfocitos T
reguladores en calostro humano**

TESIS

**Que para obtener el título de
Química Farmacéutica Bióloga**

PRESENTA

Romero Venado Jannett Guadalupe

DIRECTOR DE TESIS

Dr en C. Ismael Mancilla Herrera



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor: Gibran Pérez Montesinos**
VOCAL: **Profesor: Luz María Mora Velandia**
SECRETARIO: **Profesor: Ismael Mancilla Herrera**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Luis Ángel Flores Mejía**
2° SUPLENTE: **Profesor: Octavio Castro Escamilla**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA TORRE DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES”.

ASESOR DEL TEMA: DR. EN C. ISMAEL MANCILLA HERRERA

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): ROMERO VENADO JANNETT GUADALUPE

(Nombre (s) y firma (s))

Resumen

La leche humana representa la fuente de nutrición más importante para los recién nacidos y su práctica mejora la digestión, la absorción de nutrientes, y el desarrollo de los sistemas gastrointestinal, neurológico e inmune. Entre sus componentes se encuentran más de 200 elementos funcionales, incluidos lípidos, proteínas, enzimas, carbohidratos, vitaminas, minerales y macronutrientes; en conjunto, todas estas sustancias protegen al neonato contra infecciones y favorecen la tolerancia alimenticia y microbiana comensal que acompaña al individuo la mayor parte de su vida. El calostro es la primera etapa de la leche y se caracteriza por que tiene alto contenido de leucocitos como neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Recientemente reportamos la presencia de linfocitos T reguladores (Treg) con fenotipo CD127^{low} CD25^{high}Foxp3⁺ en calostro que potencialmente son capaces de atenuar las respuestas inflamatorias que se generan frente a los primeros retos antigénicos, sin embargo se desconocen los niveles de expresión de moléculas asociadas a sus funciones. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de las moléculas CD152, CD279 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β en linfocitos Treg de calostro de voluntarias puérperas sanas y compararlas con células antólogas de sangre periférica. Para ello, células de sangre periférica (SP) y calostro (C) de veinte donadoras sanas fueron inmunomarcadas con anticuerpos monoclonales y analizadas por citometría de flujo. Aplicando un análisis multiparamétrico encontramos que la mayoría de los linfocitos Treg (CD4⁺ CD25^{high}) en C presentan fenotipo de memoria (CD45RO⁺CD45RA⁻). Del mismo modo, encontramos que la expresión de CD152 y CD279 fue mayor en Treg de C respecto a SP. Además, la expresión intracelular de TGF- β también fue mayor en C. Nuestros datos sugieren que los linfocitos Treg en calostro pudiesen transferir experiencias antigénicas de la madre al neonato y que potencialmente serían capaces de atenuar enfermedades con desequilibrios inflamatorios por sus funciones inmunoregulatoras.

ABREVIATURAS

APC	<i>Célula presentadora de antígeno</i>
C	<i>Calostro</i>
CD	<i>Cluster de diferenciación, del inglés.</i>
CTLA-4	<i>Antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico, del inglés</i>
ECN	<i>Enterolitis necrotizante</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
FVD	<i>Fixable Viability Dye</i>
HMO	<i>Oligosacáridos de leche humana, del inglés</i>
Ig	<i>Inmunoglobulina</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IMC	<i>Índice de Masa Corporal</i>
IMF	<i>Intensidad media de fluorescencia</i>
MHC	<i>Complejo principal de histocompatibilidad</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PD-1	<i>Muerte programada 1, del inglés</i>
SDG	<i>Semanas de gestación</i>
TGF	<i>Factor de crecimiento transformante</i>
Treg	<i>Linfocitos T reguladores</i>
SP	<i>Sangre periférica</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
La leche humana.....	3
Propiedades de la leche humana.....	5
Componentes de la leche materna	8
Componentes solubles	8
Factores que afectan la composición de moléculas solubles del calostro	12
Componentes inmunológicos solubles:	14
Componentes celulares	16
Factores que afectan la composición celular del calostro.....	17
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos Particulares	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Diseño de estudio	26
Población de estudio.....	26
Colección de muestras.....	26
Obtención de células de calostro	28
Inmunomarcaje de sangre periférica y calostro	28
Tinción de superficie	28
Tinción intracelular.....	29
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIÓN	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	57
ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	57

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Práctica de la Lactancia Materna en México	7
Figura 2	Motivos para no amamantar	8
Figura 3	Componentes solubles de la leche materna	9
Figura 4	Mecanismo de inmunoregulación de los linfocitos T reguladores	21
Figura 4	Obtención de calostro por la técnica de Marmet	27
Figura 5	Algoritmo de análisis para la identificación de linfocitos T reguladores en sangre periférica y calostro de mujeres puérperas	32
Figura 6	Correlación del porcentaje de Linfocitos T reguladores	33
Figura 7	Porcentaje de Linfocitos T reguladores naive y de memoria	34
Figura 8	Expresión de CD152 y CD279 en sangre periférica y calostro	35
Figura 9	Expresión de TGF- β en sangre periférica y calostro	35
Figura 10	Expresión relativa de CD152, CD279 y TGF- β en LT reg con fenotipo naive y de memoria	36
Figura 11	Expresión relativa de CD279 ^{high} en linfocitos T reg de memoria de sangre periférica y calostro	37
Figura 12	Comparación del tiempo de gestación en el porcentaje de Treg y su fenotipo en calostro	38
Figura 13	Comparación de la vía de nacimiento en el porcentaje de Treg y su fenotipo en calostro	39
Figura 14	Comparación del género en el porcentaje de Treg y su fenotipo en calostro	40

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Beneficios a la salud de la Lactancia Materna	5
Tabla 2	Anticuerpos monoclonales utilizados para inmunomarcaje	29
Tabla 3	Datos demográficos	30
Tabla 4	Datos demográficos conforme al tiempo de gestación	38
Tabla 5	Datos demográficos conforme a la vía de nacimiento	39
Tabla 6	Datos demográficos conforme al género del recién nacido	40

INTRODUCCIÓN

La leche humana

A diferencia de los demás órganos del cuerpo que maduran durante la etapa embrionaria, las glándulas mamarias alcanzan su maduración durante el periodo embarazo-lactancia¹. La maduración de las glándulas mamarias están regulados directamente por el incremento de los niveles en circulación del complejo de hormonas lactogénicas (estrógeno, progesterona y prolactina) que inducen la morfogénesis alveolar y diferenciación secretora². Otras hormonas y factores de crecimiento que son reguladores directos de la expansión mamaria durante el embarazo son el lactógeno placentario, el factor de crecimiento epidérmico y Factor de crecimiento transformante (TGF)- α , mientras que la insulina, la hormona del crecimiento y los glucocorticoides están relacionados indirectamente³.

Existen dos etapas en el inicio de la lactación, la primera es llamada diferenciación secretora o lactogénesis I, empieza en el segundo trimestre del embarazo y después de la fase de expansión (mamogénesis) cuando el incremento gradual de los niveles de prolactina propicia la diferenciación de células epiteliales mamarias en lactocitos. En esta etapa, los lactocitos tienen la capacidad de sintetizar componentes únicos de la leche como lactosa, caseína, α -lactoalbumina, ácidos grasos, entre otros⁴, y empieza a acumularse la primera secreción después del parto, el calostro. La segunda etapa es llamada activación secretora o lactogénesis II, ocurre comúnmente unas horas después del parto, se desencadena por la disminución de progesterona en circulación y por un aumento de prolactina⁵. El efecto de la prolactina en las glándulas mamarias es estimular la síntesis de la leche y la proliferación celular por lo que en la lactogénesis II empieza la secreción de leche materna⁶.

De acuerdo al tiempo en el que se genera posterior a la resolución del embarazo, su volumen, y composición, la leche materna se divide en tres tipos: El calostro, que es el primer fluido secretado por la madre después del nacimiento del infante y está presente en los primeros 3 a 4 días, es seguido de la leche de transición o intermedia la cual se secreta hasta las siguientes 2 a 3 semanas, y posteriormente

se denomina tardía o madura. De estas formas de leche, el calostro resalta por sus propiedades inmunológicas más que nutricionales⁷. El calostro varía entre mujeres en volumen, apariencia y composición bioquímica y celular, contiene altas concentraciones de componentes inmunológicos que favorecen la protección y que permiten el adecuado desarrollo del recién nacido. Entre los diversos factores inmunológicos se encuentran inmunoglobulinas, lactoferrina, oligosacáridos, moléculas del complemento, factores de crecimiento y de proliferación celular y leucocitos⁸. Todos estos componentes bioactivos que contiene la leche materna son capaces de inhibir la respuesta de elementos proinflamatorios, aumentan la producción de anticuerpos de clase IgA, antioxidantes, TGF- β , e interleucinas (IL-1, 6, 8 y 10)⁹.

El calostro además, contiene glicanos que inhiben la unión de patógenos como *Escherichia coli* o *Campylobacter jejuni*¹⁰ a sus receptores de superficie celular de la mucosa que es el primer paso para la patogénesis. A la vez que los componentes del calostro inhiben la unión de patógenos también pueden estimular la colonización intestinal. Los oligosacáridos de leche humana (HMOs) promueven selectivamente el desarrollo de bacterias mutualistas como *Bifidobacterium*¹¹

Otros componentes importantes del sistema inmune presentes en el calostro son los receptores tipo Toll (TLRs) que son los principales receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) y reconocen un amplio rango de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son expresados sobre los microorganismos¹². Los PAMPs de bacterias Gram negativas y Gram positivas son sensados por varios PRRs incluidos TLR-1, 2, 4, 6 y 9. TLR-2 reconoce principalmente componentes de bacterias Gram positivas junto con TLR-1 o TLR-6. Por su parte, TLR-4 detecta bacterias Gram negativas respondiendo al lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Por último, TLR-5 y TLR-9 son desencadenados por flagelina y por motivos CpG de ADN, respectivamente, derivados de los dos tipos de bacterias¹³.

Propiedades de la leche humana

Existen diversos beneficios del calostro en relación a la salud de los niños a corto y largo plazo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó una recomendación de salud pública y mundial descrita en la Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño¹⁴ en donde indica que durante los primeros 6 meses de vida, los niños deben ser alimentados exclusivamente con leche materna para lograr un crecimiento, desarrollo y salud óptimos. Después de ese tiempo y con el fin de satisfacer una mayor demanda nutricional, los infantes tienen que recibir alimentos complementarios adecuados además del seguimiento de la lactancia materna hasta los dos años de edad¹⁵.

Uno de los primeros estudios reporta una asociación entre la lactancia materna y una baja incidencia de morbilidad y mortalidad durante el primer año de vida. Además, estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de leche materna está asociado con beneficios a la salud para muchas condiciones relacionadas con el sistema inmune (Tabla 1)¹⁶.

Tabla 1 Beneficios a la salud de la Lactancia Materna. Modificado de Blewett et al. 2008¹⁶.

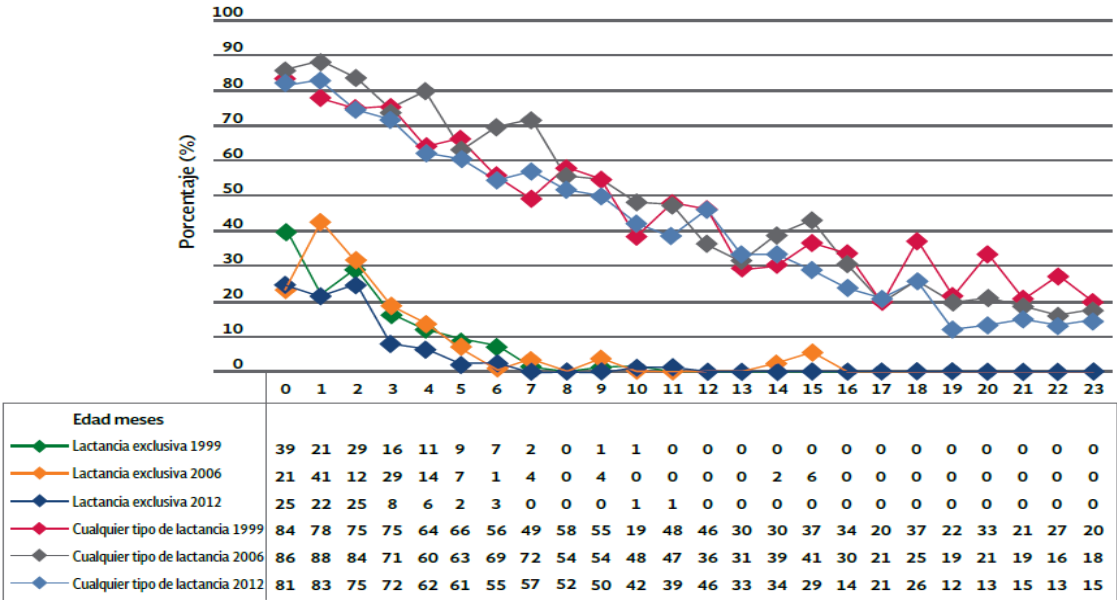
Condición	Referencias
Enterocolitis necrotizante	Lucas and Cole, 1990
Enfermedad celiaca	Akobeng et al; 2006
Diabetes tipo I	Malcova et al; 2006
Diabetes tipo II	Owen et al; 2006
Obesidad	Arenz et al; 2004
Ateroesclerosis	Martin and Abraham; 2005
Cáncer de mama	Potischman and Troisi; 1999
Linfoma de Hodgkin	David; 1998
Artritis reumatoide	Karlson et al; 2004
Eczema	Kull et al; 2005
Alergias	Van Odijk et al; 2003
Infección del tracto respiratorio	Chantry et al; 2006
Asma	Kull et al; 2004

Por otro lado, según la Agencia para la Investigación y Calidad de la Salud (AHRQ)¹⁷ encontró que el riesgo por hospitalización de infecciones del tracto respiratorio bajo disminuye en un 72% en infantes con lactancia materna exclusiva por más de 4 meses. Asimismo, los neonatos alimentados de 4 a 6 meses con leche materna son cuatro veces más vulnerables a neumonía comparados con los neonatos amamantados por más de 6 meses¹⁸. El consumo de leche materna por más de 3 meses reduce el riesgo de otitis media en un 50%, los resfriados graves e infecciones de oído y garganta también se reducen en un 63% en infantes que son alimentados con leche materna exclusivamente por 6 meses¹⁹. La incidencia de infecciones no específicas del tracto gastrointestinal disminuye un 64% con la lactancia materna. Varios análisis realizados de 1983 a 2005 soportan la idea que los infantes pretérmino alimentados con leche humana se asocian con una reducción significativa (58%) en la incidencia de ECN (Enterocolitis necrotizante) y una reducción del 31% del riesgo en los niños de padecer enfermedades inflamatorias intestinales²⁰. De igual manera, la lactancia materna de 3 a 4 meses reduce la incidencia de asma, dermatitis atópica y eczema en un 27% en una población de infantes de bajo riesgo y reduce el riesgo en un 42% en infantes con un historial familiar positivo²¹.

Así mismo existen estudios donde investigaron que efecto tiene la lactancia materna exclusiva en las primeras semanas después del nacimiento en relación con la morbilidad infantil debido a las infecciones y alergias. En un estudio, disminuyó significativamente la incidencia de infecciones respiratorias, otitis, diarrea, deshidratación y neumonía en infantes alimentados con leche materna^{8, 22}.

En México existe la Estrategia Nacional de Lactancia Materna (ENLM) que integra diferentes acciones que se realizan en el país para proteger, promover y apoyar la práctica de la lactancia materna hasta los dos años de edad²³ ya que según estimaciones realizadas por el Instituto Nacional de Salud Pública a partir de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT) la práctica de lactancia materna en el país ha disminuido en los últimos años, particularmente en los sectores más vulnerables²⁴.

El análisis de alimentación infantil (Figura 1) en menores de dos años mostró que el 38.3% de los recién nacidos son puestos al seno materno en la primera hora de vida, la lactancia materna exclusiva descendió de 22.3% a 14.5% según las encuestas 2006 y 2012 y en el medio rural de 36.9% a 18.5% en el mismo periodo. En el primer año de vida, sólo la tercera parte de niños recibían lactancia materna, y a los dos años, tan sólo la séptima parte. La reducción de la lactancia materna exclusiva a nivel nacional fue de 7.9% de 2006 a 2012.



Existen diversas razones (Figura 2) por las que las madres nunca dieron pecho a sus hijos, estas razones, sugieren desconocimiento o poco apoyo antes y alrededor del parto para iniciar y establecer la lactancia.

Los resultados de esta encuesta indican que las prácticas de lactancia materna en México están muy alejadas de lo que recomienda la OMS. La lactancia materna exclusiva bajo entre el 2006 y 2012 y la disminución en el medio rural fue mayor. La disminución del porcentaje de niños alimentados exclusivamente con leche materna desde su nacimiento hasta los 6 meses de edad se debe a una temprana introducción de fórmulas lácteas y a la alimentación complementaria.

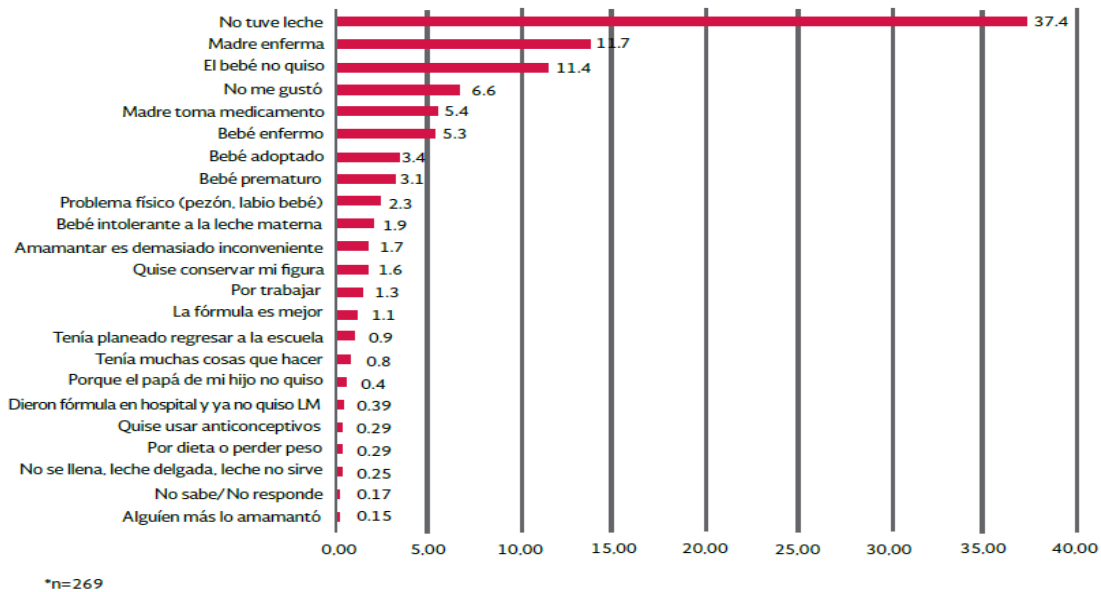


Figura 2. Motivos para no amamantar. Mujeres de 12 a 49 años con recién nacidos menores de 24 meses. Fuente ENSANUT 2012

Existen condiciones sociales y culturales que determinan la práctica de la lactancia materna, una de ellas, es la incorporación de las mujeres al mercado de trabajo, formado en su mayoría por mujeres en edad reproductiva. En la actualidad 42.2% de las mujeres mayores de 12 años laboran. En relación a la legislación que protege la lactancia materna ésta es poco difundida lo que hace incierta su aplicación, cumplimiento y sanción.

Componentes de la leche materna

La composición general de la leche humana es 87% agua, 3.8% grasa, 1.0% proteína y 7% lactosa. La grasa y la lactosa proveen respectivamente el 50% y el 40% de la energía total de la leche²⁵.

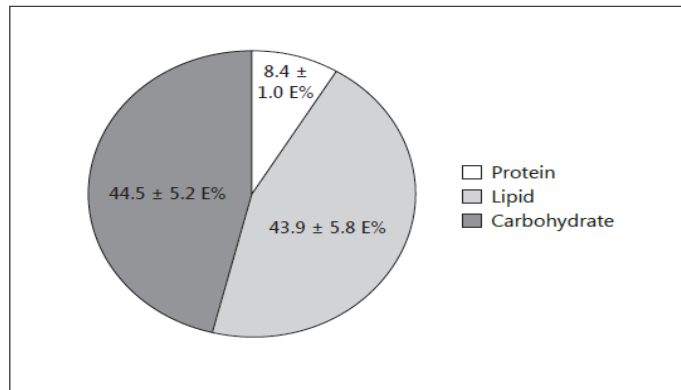
Los componentes de la leche humana se pueden dividir en compuestos solubles como los carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y minerales y en compuestos celulares que incluyen células inmunes.

Componentes solubles

Los componentes solubles de la leche materna varían en cada madre y del tiempo de lactación, pero se conservan notablemente entre las poblaciones a

pesar de las variaciones del estado nutricional materno²⁶. Los componentes solubles pueden ser divididos principalmente en proteínas, lípidos y carbohidratos

(Figura 2)



nas
S
hidratos

do de nn Nutr Metab 2016;69 (suppl

Proteínas y Compuestos nitrogenados no proteicos. Entre sus componentes biológicamente activos de la leche, las proteínas y los péptidos son conocidos por ejercer funciones inmunológicas, nutricionales y antimicrobiales. La leche humana contiene alrededor de 400 proteínas diferentes²⁷ que se dividen en dos principales grupos: caseínas y proteínas del suero. Los lactocitos producen entre el 80-90% de las proteínas de leche materna.

El calostro contiene altas concentraciones de proteínas de suero mientras que las cantidades de caseína son casi indetectables, la relación suero/caseína fluctúa entre el 70/30 y 80/20 en la lactación temprana y va disminuyendo conforme el tiempo²⁸.

Las principales proteínas del suero son la α -lactoalbúmina, lactoferrina, sIgA, lisozima, lipasas, amilasas y haptocorrina. Después de la digestión estas proteínas rompen sus enlaces peptídicos para convertirse en aminoácidos libres para su absorción y utilización²⁹. La α -lactoalbúmina es la proteína principal de la leche humana, representa alrededor del 25-35% de las proteínas totales, es esencial para la síntesis de lactosa. Las proteínas inmunoprotectoras que están presentes en altas concentraciones en leche humana son lisozima, lactoferrina e inmunoglobulinas (Ig) que juntas actúan contra diversos patógenos. La lisozima es conocida por degradar la pared extracelular de las bacterias Gram negativas; la lactoferrina tiene propiedades bacteriostáticas contra patógenos dependientes de

hierro; por su parte, las sIgA antígeno-específicas transfieren la inmunidad de la madre al recién nacido contra diversos patógenos²². Otras proteínas que pueden actuar como componentes del sistema inmune y que muestran actividad antimicrobial son la κ-caseína y la haptocorrina²⁸.

Por otro lado, los compuestos nitrogenados no proteicos incluyen moléculas como urea, ácido úrico, creatina, creatinina, aminoácidos, nucleótidos y péptidos y representan aproximadamente el 25% del nitrógeno presente en la leche humana³⁰. En cuanto a los péptidos, ejercen distintas actividades fisiológicas y pueden generarse a partir de proteínas en el tracto gastrointestinal mediante proteólisis, su tamaño pequeño es una ventaja para su absorción intacta.

Los nucleótidos son considerados como nutrientes esenciales en la etapa temprana del neonato, son necesarios para el desarrollo, maduración y reparación del tracto gastrointestinal, también son indispensables para el desarrollo de la microbiota y la función inmune³¹. Los nucleótidos funcionan principalmente en el metabolismo energético celular como mensajeros y coenzimas en las vías metabólicas y en la producción y recuperación de ácidos nucleicos. Ante la infección, los nucleótidos son esenciales para la respuesta inmune (activación celular, proliferación y acción, y transducción de señales celulares)³².

Lípidos. Los lípidos son la mayor fuente de energía que aporta la leche materna al neonato, contribuyen en un 40-50% del total de la energía y son los que le dan sabor y aroma a la leche^{33, 34}. Los lípidos también aportan nutrientes esenciales como ácidos grasos polinsaturados y vitaminas solubles³⁵. La gran mayoría de los lípidos secretados son triacilglicéridos, contribuyendo al 98% de la fracción lipídica, el resto consiste en diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y colesterol²⁷. La leche materna contiene alrededor de 200 ácidos grasos, sin embargo, muchos de estos se encuentran en muy bajas concentraciones. La síntesis de novo de ácidos grasos representa el 17% de la grasa total de la leche materna. Los ácidos grasos libres poliinsaturados de cadena larga se transfieren de la madre al feto en el tercer trimestre del embarazo a través de la placenta; en el neonato se transfieren a través de la leche materna³⁶

y constituyen aproximadamente el 2% del total de los ácidos grasos presentes en la leche materna.

La leche humana puede ser caracterizada como una emulsión con glóbulos de grasa dispersos en un líquido acuoso. Los glóbulos de grasa son de distintos tamaños formados en las células alveolares mamarias, contienen un centro de lípidos no polares compuestos principalmente de triacilglicéridos con pequeñas cantidades de agregados de monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos no esterificados³⁵. Los glóbulos de grasa también proveen considerables cantidades de colesterol libre y esterificado resultando en un contenido total de colesterol de 90-150 mg/L en contraste con los máximo 4mg/L que tiene la leche de fórmula. El colesterol es indispensable para todas las membranas celulares.

La leche humana contiene dos ácidos grasos esenciales, el ácido linoleico y el ácido α linoleico, estos ácidos grasos se convierten respectivamente en ácido araquidónico (AA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), este último se transforma en ácido docosahexaenoico (DHA)³⁷. El AA, el EPA y el DHA son importantes para la regulación del crecimiento, de las respuestas inflamatorias, de la función inmune, del desarrollo cognitivo y del desarrollo del sistema motor en los recién nacidos.

Muchos estudios han demostrado los importantes efectos biológicos que tienen los lípidos de la leche humana en los recién nacidos, por ejemplo, ayudan a la función gastrointestinal, al metabolismo de lípidos y lipoproteínas, a la función y composición de la membrana, al crecimiento del neonato y a la función inmune³⁴.

Carbohidratos. La lactosa es el carbohidrato principal en la leche humana, es un disacárido compuesto de glucosa unida covalentemente con galactosa, se encuentra en altas concentraciones en leche humana comparada con cualquier otra especie, esto debido a la alta demanda energética del cerebro humano. Otra fracción significativa de los carbohidratos de la leche materna son los oligosacáridos que no son digeribles por el neonato por lo que sirven como prebióticos fomentando el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto gastrointestinal como *Bifidobacterium infantis*³⁸. Los oligosacáridos de leche humana (HMO) tienen un papel importante en la prevención de diarreas

neonatales e infecciones del tracto respiratorio. La leche humana a menudo cubre la superficie de la mucosa en las regiones nasofaríngeas de los infantes y ocasionalmente alcanzan el tracto respiratorio superior. Los niños alimentados con leche materna son menos propensos a desarrollar otitis media causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Haemophilus influenzae*. Estos patógenos emplean interacciones lectina-glicano para iniciar la infección por lo que los HMO bloquean esta adhesión. En calostro la cantidad de oligosacáridos varía entre 20-25 g/L mientras que en la leche madura las concentraciones oscilan entre 5-20 g/L³⁹.

Además de su función como prebióticos, los HMO también reducen directamente las infecciones microbiales actuando como antiimicrobiales antiadhesivos⁴⁰. Muchos patógenos como virus, bacterias y protozoarios necesitan adherirse a la superficie de las mucosas para colonizar o invadir al hospedero y causar enfermedad⁴¹. Algunos HMO se parecen a los glicanos de la superficie celular de las mucosas y actúan como receptores solubles para prevenir la unión de los patógenos y reducir el riesgo de infecciones⁴².

En cuanto a su acción inmunológica, varios estudios sugieren que los HMO modulan directamente la respuesta inmune. Los HMO pueden actuar localmente en células del tejido linfoide asociado a mucosa o a nivel sistémico ya que aproximadamente el 1% de los HMO son absorbidos y llegan a la circulación sistémica⁴³. El número de linfocitos CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺ productores de interferón- γ así como linfocitos CD3⁺ CD8⁺ productores de IL-13 aumenta cuando los linfocitos T de sangre de cordón se exponen a HMO⁴⁴.

Factores que afectan la composición de moléculas solubles del calostro

La composición de la leche humana cambia en respuesta a varios factores, adaptándose a las necesidades del infante según su edad y otras características⁹. Entre los factores que afectan la composición de calostro se encuentra la edad gestacional, la vía de nacimiento y el género del recién nacido. Existen diferencias en los compuestos bioactivos, macronutrientes, citocinas, enzimas, proteínas y factores inmunológicos en la leche materna de mujeres con partos pretérmino,

término y de mujeres que dieron a luz vía vaginal y cesárea. Además el contenido energético de la leche es diferente dependiendo del género del recién nacido. La leche de madres que dieron a luz niños tiene más grasa que la leche de mujeres que dieron a luz niñas⁴⁵.

La leche de mujeres con infantes pretérmino es diferente de la leche de mujeres que llegaron a término. Los nacimientos pretérmino pueden afectar la concentración de algunos compuestos bioactivos de la leche materna⁴⁶. Inicialmente, la leche pretérmino tiene concentraciones altas de proteínas, grasas, aminoácidos libre y sodio, sin embargo van disminuyendo conforme al tiempo. Las concentraciones de lactosa en calostro, son relativamente bajas pero van aumentando conforme al tiempo, en leche pretérmino el incremento de lactosa se produce más rápido. Los minerales no varían tanto debido al tiempo de gestación, excepto el calcio, el cual es más bajo en leche pretérmino y no incrementa conforme al tiempo, mientras que, el contenido de cobre y el zinc se encuentra más alto que en leche término y disminuye conforme al tiempo de lactación. La leche pretérmino también tiene altos niveles de sIgA, lactoferrina y lisozima y bajos niveles de leptina²⁵. Además, la leche pretérmino tiene altos niveles de adiponectina, un factor que reduce la producción de citocinas proinflamatorias.

Los partos pretérmino están asociados negativamente con la adaptación del recién nacido a su nuevo ambiente, con la disfunción de órganos y con infecciones excesivas relacionados con la morbilidad neonatal⁴⁷.

En cuanto a la vía de nacimiento, en los partos vaginales, el contacto con la microbiota vaginal e intestinal es importante para empezar la colonización intestinal del recién nacido. Las bacterias intestinales son importantes para el desarrollo postnatal del sistema inmune y varían dependiendo de la vía de nacimiento por lo que el desarrollo del sistema inmune también podría ser diferente⁴⁸. Datos epidemiológicos muestran que las enfermedades atópicas aparecen con más frecuencia en infantes que han nacido vía cesárea que los que han nacido vía vaginal⁴⁹, también muestran que la vía de nacimiento está asociado con diferencias en la microbiota intestinal aún después de 7 años.

Por último, el género del recién nacido también produce diferencia en la composición de la leche. Powe y colaboradores⁵⁰ examinaron varias fuentes potenciales de variación de la calidad de la leche, particularmente el género del recién nacido y encontraron que las madres con infantes masculinos producían leche con un contenido energético 25% mayor que las madres con infantes femeninos.

Componentes inmunológicos solubles:

Los componentes protectores de la leche humana son tan numerosos y multifuncionales que en este trabajo, solo mencionaremos a las inmunoglobulinas, en particular a la SIgA y citocinas como TGF- β .

Inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas están presentes en altas concentraciones en el calostro y van disminuyendo durante la lactación, sin embargo la cantidad de inmunoglobulinas que recibe el infante es la misma debido a que va aumentando la ingesta de leche⁵¹. El isotipo de inmunoglobulina más predominante es la sIgA seguida de la IgG y proveen protección inmunológica al infante. Los anticuerpos sIgA son esenciales para la defensa de las membranas mucosas, previenen eficazmente la entrada de microorganismos en los tejidos, tienen propiedades antiinflamatorias⁵². La protección contra patógenos invasivos en la superficie de la mucosa depende en gran medida de los anticuerpos de la leche materna. Los anticuerpos encontrados en la leche materna se generan como resultado de la estimulación antigénica del tejido linfoide asociado a mucosa materno, por lo tanto estos anticuerpos están dirigidos a los agentes infecciosos de la madre durante el periodo perinatal y que también son los más susceptibles de ser encontrados en el neonato. Por ejemplo, la inmunización materna con la vacuna contra *Neisseria meningitidis* demostró altos niveles de anticuerpos IgA específicos en la leche materna hasta seis meses después del parto⁵³. Las moléculas de sIgA permanecen activas a lo largo del tracto gastrointestinal del neonato y afectan la unión de microorganismos patógenos impidiendo su adherencia y penetración en el epitelio, sin desencadenar reacciones inflamatorias que podrían ser dañinas para el recién nacido⁵⁴. En calostro, las concentraciones

de sIgA son alrededor de 12mg/mL mientras que en leche madura solo se encuentra en concentraciones de 1mg/mL⁵⁵.

Citocinas. La leche humana contiene varias citocinas, pequeñas glicoproteínas solubles que actúan de manera autocrina o paracrina al unirse a receptores celulares específicos, sus concentraciones relativas son diferentes entre cada mujer y varían conforme al tiempo en la misma persona. Las citocinas son importantes para la proliferación y migración de las células epiteliales intestinales y para la modulación del sistema inmune de la mucosa; sus efectos pueden ser importantes para los neonatos con bajo peso, una población con riesgo de mortalidad y complicaciones como sepsis o enterocolitis necrozante⁵⁶. Los enterocitos (células epiteliales del intestino) y las células inmunes producen citocinas antiinflamatorias como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e interleucina (IL-) 10, 11 y 13³².

TGF- β es una citocina presente en el fluido amniótico y en el calostro humano, puede ser rápidamente absorbido por el intestino del neonato⁵⁷. La leche humana contiene principalmente dos isoformas: TGF- β -1 y TGF- β -2, siendo TGF- β -2 la más predominante⁵⁸. Bajos niveles de TGF- β en leche materna ha sido relacionado con un incremento del riesgo en infantes de sufrir enfermedades atópicas como asma, rinoconjuntivitis y dermatitis atópica⁵⁹, lo cual apoya la idea de que esta citocina participa en el desarrollo de la tolerancia. Oddy y colaboradores reportaron que las concentraciones en calostro y en leche madura de TGF- β 1 y TGF- β 2 de madres con niños alérgicos son más bajas que las concentraciones de madres con infantes no alérgicos⁵⁸. Por otra parte, diversos estudios en animales muestran que TGF- β que se encuentra en la leche materna sobrevive a la digestión y se absorbe rápidamente en el intestino por lo que tiene efectos funcionales en otros compartimentos de los neonatos⁶⁰. TGF- β es un péptido extracelular involucrado en muchas funciones incluido el crecimiento, diferenciación celular, motilidad, muerte celular y también puede modular la inflamación⁶¹.

Componentes celulares

Al nacimiento, los componentes celulares del sistema inmune responden apropiadamente, no obstante, el sistema inmune del infante no es el mismo que el del adulto. Las células del sistema inmune innato que predominan en el calostro son los macrófagos, neutrófilos y linfocitos⁶².

Linfocitos T en leche humana

En 1977, Jacob y colaboradores⁶³ demostraron que la inmunidad mediada por células, como los linfocitos T, puede ser adquirida por medio de la leche materna. Lo anterior lo demostraron al evaluar 26 mujeres puérperas positivas (MPP) a la prueba de la tuberculina, 9 mujeres puérperas negativas (MPN) a dicha prueba y sus respectivos hijos en ambos grupos. Todos los niños de MPN y 13 niños de MPP fueron alimentados con leche materna. Se encontraron linfocitos T reactivos a la tuberculina en el calostro de la mayoría de las MPP pero en ninguna MPN. Además, un número significativo (8/13) de neonatos de MPP tenían en sangre periférica linfocitos T reactivos a tuberculina después de 4 semanas de lactancia exclusiva comparados con los que recibieron leche de bote (1/13) o los niños de MPN (0/13). Para comprobar que estos linfocitos no se habían transferido por la placenta, examinaron la sangre de cordón umbilical y no encontraron evidencias significativas de transmisión transplacentaria, lo que sugieren que los lactantes alimentados con leche materna pueden adquirir pasivamente la respuesta de los linfocitos T a un antígeno específico por ingestión de leche materna.

La mayoría de los linfocitos encontrados en la leche materna son linfocitos T, mientras que los linfocitos B son no más del 6% del número total de linfocitos⁶⁴. De los linfocitos T, existen células CD8⁺ y células CD4⁺. Las células CD4⁺ están presentes en un estado activado y expresan diversos marcadores de activación en su superficie, entre ellos CD45RO, que es una proteína de superficie asociada a la memoria inmunológica. Los linfocitos T CD4⁺ de memoria son una población de células de vida prolongada que comparten algunas características de superficie de células T efectoras activadas, pero que son distintas de las células T efectoras debido a que requieren reestimulación adicional antes de actuar sobre células

blanco. La isoforma de CD45 cambia debido a un empalme alternativo de exones que codifican para el dominio extracelular de CD45, lo que conduce a isoformas, como CD45RO, que son de menor tamaño y se relacionan con mayor facilidad con el receptor de célula T, y facilitan el reconocimiento de antígeno⁶⁵. Los linfocitos T activados de la madre, compensan la función de los linfocitos T del neonato además de promover su maduración. Al principio de la lactación el neonato puede consumir hasta 10^{10} leucocitos maternos por día aunque la cantidad de estas células varía dependiendo de la madre y también está reportado que varía en la leche de infantes que desarrollan alergias⁷.

Factores que afectan la composición celular del calostro

Así como los factores solubles pueden ser afectados por diferentes condiciones del nacimiento y etapas de maduración de la leche, la frecuencia de aparición así como sus características fenotípicas de los leucocitos pueden también verse afectados.

Jin y colaboradores⁶⁶ examinaron si algunas enfermedades atópicas como dermatitis, rinitis, asma, alergia a alimentos y la vía de nacimiento afectaban las poblaciones de linfocitos en calostro humano. Encontraron que el número de células NK y de linfocitos T de memoria en calostro de madres atópicas es menor en comparación con madres sin atopias. En cuanto a la vía de nacimiento, encontraron que los números de linfocitos T CD4⁺ son menores en el calostro de madres con partos vía cesárea en comparación con madres que dieron a luz vía vaginal.

Otro estudio también demuestran que la edad gestacional afecta la concentración y frecuencia de las poblaciones de leucocitos en leche materna⁶⁷. En calostro la frecuencia relativa de linfocitos T no citotóxicos y linfocitos B disminuyen conforme aumenta la edad gestacional. En la leche de transición la concentración de precursores de células B fue significativamente mayor en madres con neonatos extremadamente prematuros (< 28 semanas) en comparación con las madres con neonatos moderadamente prematuros (32-36 semanas) además, la frecuencia de monocitos CD16⁻ fue significativamente menor en madres con nacimientos

extremadamente prematuros en comparación con las madres de nacimientos pretérmino moderado. Por último, en la leche madura encontraron que las concentraciones totales de linfocitos T citotóxicos y NK fueron significativamente más bajas en mujeres con neonatos muy pretérmino (28-31 semanas) en comparación con madres de neonatos moderadamente pretérmino.

Por otra parte, desde 1991 se encontró que los linfocitos con previa exposición a un antígeno (CD45RO+) se encuentran en leche humana en mayor porcentaje que los linfocitos naive (CD45RA+)⁶⁸. A partir de ahí, diversos estudios han respaldado que el principal subgrupo de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ son los linfocitos T de memoria, CD45RO+, (85.07%). En contraste, los linfocitos T naive son apenas detectables⁶⁶.

Linfocitos T reguladores (Treg)

Los linfocitos Treg están involucrados en el mantenimiento y establecimiento de la tolerancia inmunológica, es decir, controlan posibles respuestas de un amplio rango de antígenos, incluidos antígenos propios, antígenos derivados de bacterias comensales y alérgenos ambientales.

Los linfocitos Treg se generan, principalmente, por el reconocimiento de antígenos propios en el timo y por el reconocimiento de antígenos propios y extraños en los órganos linfáticos periféricos.

Diferenciación de linfocitos Treg

Los linfocitos Treg pueden producirse en el timo como una subpoblación de linfocitos T funcionalmente maduros (tTreg) y pueden llamarse también linfocitos Treg naturales (nTreg). Durante su maduración en el timo muchos linfocitos T inmaduros que reconocen antígenos con avidéz alta son eliminados (selección negativa) y algunas de las células supervivientes de la línea CD4⁺ evolucionan a linfocitos Treg.

Los linfocitos Treg expresan el factor de transcripción Foxp3 (forkhead box P3) el cual es un factor importante para la diferenciación, mantenimiento y función de los mismos. Una mutación en el gen foxp3 en humanos resuelta en una enfermedad

autoinmune llamada síndrome IPEX (síndrome ligado al cromosoma X con alteración de la regulación inmunitaria, poliendocrinopatía y enteropatía) y se asocia a una deficiencia de linfocitos Treg.

Los linfocitos Treg también pueden ser generados a partir de linfocitos naive T CD4⁺ de la periferia después de una estimulación antigénica y con una apropiada combinación de citocinas, incluida IL-2 y TGF- β . Estos linfocitos Treg que se producen por esta vía se les llama linfocitos Treg inducibles (iTreg) cuando son generados *in vitro* o linfocitos Treg inducidos en la periferia (pTreg) cuando son generados *in vivo*⁶⁹.

La diferencia principal entre estos dos subgrupos de células Treg es la ubicación y el tipo de antígeno que facilitan su diferenciación, las células tTreg son responsables de la tolerancia a los antígenos propios, mientras que las células pTreg restringen las respuestas inmunitarias a antígenos no autónomos como alérgenos, microbiota comensal y alimentos⁷⁰.

Marcadores moleculares para identificar a los linfocitos T reguladores

Los marcadores moleculares son esenciales para identificar y analizar a los linfocitos Treg. Los marcadores más usados para estas células son:

- CD25, es una glicoproteína transmembranal de 55kDa, es la cadena α del receptor de IL-2⁷¹; muchos estudios indican que CD25 es un marcador de superficie crucial para esta población reguladora, sin embargo, diversos estudios sugieren que, solamente la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ que expresan altos niveles de CD25 (denominado CD25^{high})⁷² presenta las características típicas de los linfocitos Treg y una alta expresión del factor de transcripción Foxp3 lo que correlaciona positivamente con los linfocitos Treg clásicos⁷³.
- CTLA-4 o CD152 es un regulador negativo de la activación de los linfocitos T, el cual se describirá más adelante.

- GITR es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral α inducido por glucocorticoides, es una glicoproteína homodímera de 66-70 kDa y también es conocida como CD357. GITR es un coestimulador fundamental para las funciones de los linfocitos Treg^{74, 75}.
- LAG-3, es conocida también como proteína FDC o CD223, es una glicoproteína transmembranal de aproximadamente 70 kDa; se expresa en linfocitos Treg, NKs y linfocitos T convencionales activados, es inducida por activación. LAG3 es una molécula de adhesión homóloga a CD4 que se une a las moléculas del MHC de clase II lo que permite que LAG-3 actúe como competidor negativo de CD4^{76, 77}.
- CD127, es una glicoproteína de 60-90 kDa, también conocida como la subunidad alfa del receptor de IL-7; se expresa en timocitos, progenitores de células T y B, células maduras y algunas células mieloides⁷⁸. Una baja o nula expresión de CD127 en combinación con una alta expresión de CD25 puede distinguir a los linfocitos Treg de los linfocitos T convencionales⁷⁹.
- Foxp3, es un factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función de los linfocitos CD4⁺ CD25^{high}. FOXP3 ha sido definido como el gen maestro que controla el desarrollo y función de los linfocitos Treg y es considerado el principal marcador molecular, a la fecha, de esta subpoblación reguladora⁸⁰.

Mecanismos de inmunoregulación de los linfocitos Treg

Por otra parte, existen varios mecanismos de acción por los cuales las células Treg controlan la respuesta inmune: 1) Inhibición por citocinas inmunoreguladoras como TGF- β , IL-10 e IL-35; 2) Inhibición contacto dependiente por moléculas como CTLA-4 (Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico) y PD-1 (muerte programada 1); 3) Inhibición por citólisis de células efectoras por la producción de granzimas y perforinas; 4) Interrupción metabólica, incluida la inhibición de la respuesta proliferativa vía el receptor de IL-2, la inhibición metabólica mediada por AMPc y la inmunomodulación mediado por receptores A2 de adenosina; e 5) interacción con células dendríticas que modulan su función y maduración⁸¹ (Figura 4).

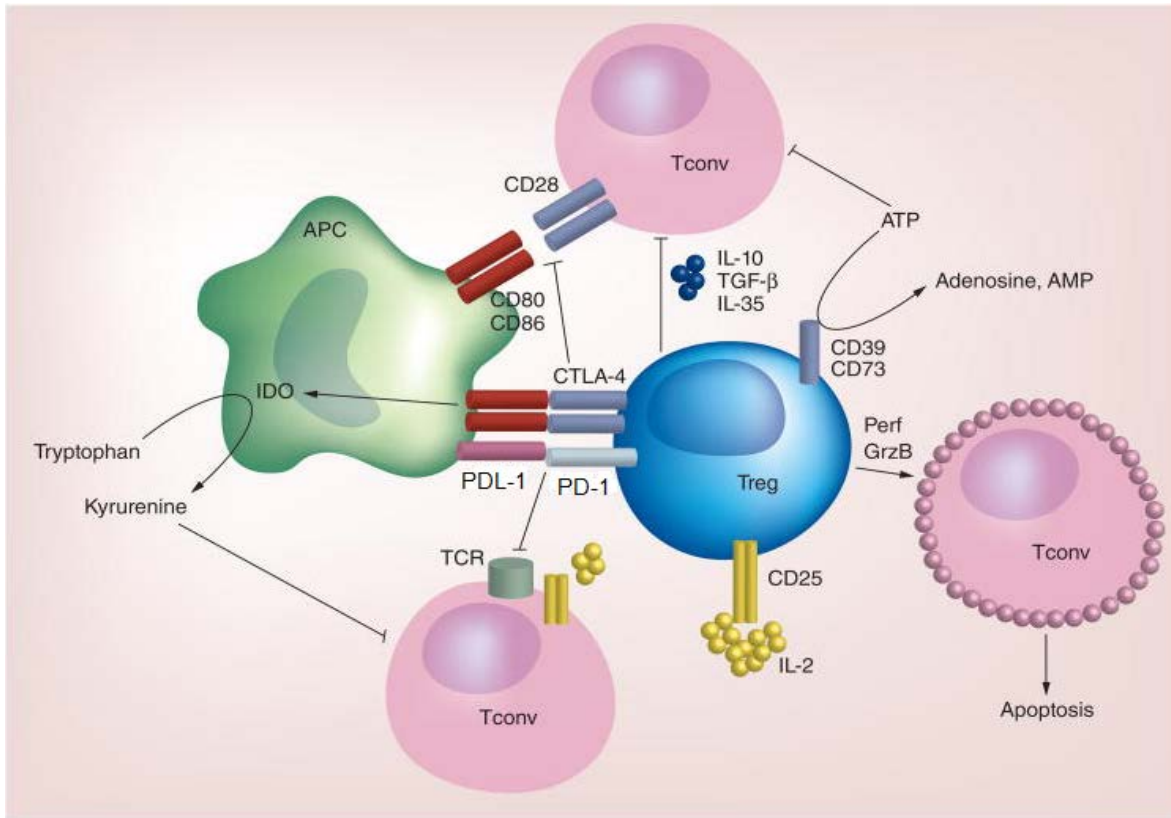


Figura 4. Mecanismos de inmunoregulación de los linfocitos T reguladores. Los linfocitos Treg utilizan múltiples mecanismos para suprimir las actividades dañinas de los linfocitos T convencionales entre los cuales se encuentra la inhibición contacto dependiente por moléculas como CTLA-4 y CD279. Además los Treg suprimen las respuestas de las células T al secretar citocinas antiinflamatorias e interrumpir las respuestas metabólicas, de modo que la proliferación y la activación de las células T convencionales se ven afectadas. Por último, bajo ciertas condiciones los Treg secretan perforinas y granzima B e inducen apoptosis de los linfocitos T .

Todos los mecanismos mencionados anteriormente son importantes para que los linfocitos Treg cumplan con sus funciones inmunoreguladoras, sin embargo nosotros sólo retomaremos la inhibición contacto dependiente por moléculas como CTLA-4 y PD-1, debido a que estos mecanismos tienen un rol importante en el embarazo.

En el embarazo, el sistema inmune presenta grandes cambios debido a que el feto contiene la mitad de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad del padre y no puede desencadenar respuestas desfavorables contra el feto. Los linfocitos Treg desempeñan un papel importante en la protección fetal, no obstante, el mecanismo por el cual mantienen la tolerancia del feto semi alogénico

sigue siendo poco entendido. CTLA-4 y PD-1 son receptores de membrana asociados con las funciones inmunoregulatoras de los linfocitos Treg en el embarazo.

CTLA-4

CTLA-4 o CD152 es una glicoproteína con 223 aminoácidos que se encuentra en la superficie de los linfocitos T, interviene en la prevención de patologías autoinmunes. CD152 comparte el 31% de homología con CD28, una glicoproteína homodimérica que se presenta en la mayoría de las células T maduras. CTLA-4 y CD28 también comparten los mismos ligandos, miembros de la familia B7, CD80 y CD82 que están presentes en células presentadoras de antígeno (APC); sin embargo CTLA-4 muestra mayor afinidad a estos receptores que CD28 lo que limita la coestimulación dependiente de CD28 lo que lleva a una inapropiada activación de los linfocitos T⁸².

CTLA-4 tiene un papel inhibitorio fundamental en la respuesta de las células T, dando como resultado una disminución en su proliferación y en la producción de citocinas. Los linfocitos Treg pueden interactuar con las células dendríticas a través de CTLA-4, así competir con las células T efectoras para unirse a sus ligandos (CD80 y CD86). La pérdida de la expresión CTLA-4 en los linfocitos Treg es suficiente para desencadenar distintas enfermedades autoinmunes como hipotiroidismo autoinmune, enfermedad de Graves y diabetes tipo I^{83, 84}

PD-1

CD279 o PD-1 es una glicoproteína de 288 aminoácidos que consta de un dominio variable tipo Ig (tipo V) en el extremo N-terminal extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. PD-1 se expresa durante el desarrollo tímico y se induce en una gran variedad de células hematopoyéticas. Durante el rearrreglo del TCR, PD-1 se expresa en timocitos inmaduros CD4⁻ CD8⁻, tras la activación PD-1 se expresa en células CD4⁺, CD8⁺, B, NKT, monocitos, macrófagos y células dendríticas⁸⁵.

PD-1 es un coestimulador negativo de la activación celular, se ha demostrado que bloquea la entrada de las células al ciclo celular y la producción de citocinas

efectoras. Sus ligandos, PDL-1 y PDL-2, son glicoproteínas transmembranales de tipo I y participan en la regulación de las respuestas inmunes in vivo. La expresión de PDL-2 está limitado a APC profesionales, mientras que PDL-1 está ampliamente distribuido en varias células y tejidos⁸⁶.

PD-1 inhibe la inducción de PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) y la activación posterior de Akt, una proteína asociada al crecimiento y proliferación celular. La actividad de PI3K y Akt es clave para el transporte de glucosa y la glucólisis, por lo que la inhibición mediada por PD-1 de estas moléculas de señalización puede dificultar la bioenergética celular dando como resultado una disminución en la proliferación, en la síntesis de proteínas, en la secreción de citocinas y en la supervivencia de los linfocitos T⁸⁷.

La unión PD-1-PDL-1 se cree que mantiene la tolerancia periférica, también se ha reportado que proporciona señales inhibitorias que regulan el balance entre la activación de células T, la tolerancia periférica y el daño tisular mediado por el sistema inmunológico; además, esta interacción está involucrada en el establecimiento de la tolerancia materno-fetal y en el mantenimiento del embarazo debido a la regulación de la homeostasis de los linfocitos T. En relación con los linfocitos Treg, la unión PD-1-PDL-1 puede aumentar el desarrollo y la capacidad supresora de los Treg. En presencia de TGF- β , PD-1 puede inducir una generación masiva de iTreg⁸⁷.

Linfocitos T reguladores en calostro

Hasta la fecha, diversos trabajos han mostrado la presencia de linfocitos T cooperadores en calostro. Sin embargo poco se ha descrito los fenotipos asociados a las funciones inmunoregulatoras. En nuestro grupo de trabajo hemos reportado la existencia de la subpoblación con fenotipo CD4⁺ CD127^{low}, quienes expresaban el factor transcripcional Foxp3⁸⁸, las cuales corresponden a linfocitos Treg y se asocian a la tolerancia inmune hacia antígenos alogénicos, semialogénicos y no propios (Artículo en revisión). Un aspecto importante en la descripción de las estirpes celulares es el grado de la expresión de las moléculas

que se asocian a sus funciones, lo cual aún no se ha realizado en los linfocitos Treg de calostro.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el nivel de expresión de las moléculas asociadas a la función inmunoreguladora (CD152, CD279 y TGF- β) de los linfocitos T reguladores de calostro humano?

¿El nivel de expresión de CD152, CD279 y TGF- β dependen del tiempo de gestación, la vía de nacimiento y el sexo del recién nacido?

HIPÓTESIS

Los linfocitos T reguladores de calostro expresan altos niveles de moléculas asociadas a la inmunoregulación (CD152, CD279 y TGF- β) y pueden ser afectados por el tiempo de gestación, la vía de nacimiento y el sexo del recién nacido.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la población de linfocitos T con fenotipo inmunoregulador (CD4+CD25^{high}) en calostro humano.

Objetivos Particulares

1. Establecer el algoritmo de análisis que permita identificar a las células que representan a las Treg (CD45+CD3+CD4+CD25^{high}) en calostro.
2. Determinar la expresión de las moléculas en superficie CD152 y CD279 en Treg de calostro.
3. Determinar los niveles de expresión del Factor de Crecimiento Transformante (TGF)- β en Treg de calostro.
4. Determinar si los Treg en calostro tienen fenotipos de memoria (CD45RO). Determinar si el fenotipo de Treg en calostro se comportan de manera tiempo-gestacional dependiente.
5. Determinar si el fenotipo de Treg en calostro es modificada por la vía de nacimiento
6. Determinar si existen diferencias en el fenotipo de Treg de acuerdo al género del recién nacido.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo del presente estudio fue evaluado y aprobado por el comité de investigación, ética y bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), cuyo registro es: 3120-20706-01-16, y financiado por fondos del mismo Instituto.

Diseño de estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo para caracterizar linfocitos T reguladores en muestras de calostro.

Población de estudio

Los experimentos se realizaron con muestras de sangre periférica y calostro que se recolectaron de voluntarias puérperas del área de alojamiento conjunto del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) "Isidro Espinosa de los Reyes" que dieron su consentimiento informado por escrito (Ejemplo del consentimiento en Anexo 1).

No participaron en el estudio mujeres con:

- Hijos con alteraciones genéticas o cromosómicas
- Morbilidades como enfermedades autoinmunes, diabetes y/o hipertensión.
- Contraindicación para la lactancia humana.
- Antecedentes de tabaquismo, drogadicción o cualquier farmacodependencia.

Asimismo, se eliminaron las mujeres que retiraron su consentimiento informado.

Colección de muestras

- *Colección de sangre periférica. Punción venosa*

Para la recolección de sangre periférica primero se realizó la limpieza del brazo de la donadora con agua y jabón, posteriormente, con una torunda impregnada con etanol al 70%, fue asepticado frotando de manera circular en la región de la vena humeral. Utilizando una aguja de calibre 22G acoplada al sistema Vacutainer® (BD), se puncionó la vena y 3 mL de sangre periférica fueron recolectados en un tubo con EDTA.K₂ (BD, CAT No 367863). La sangre periférica se utilizó como control para la identificación y comparación de linfocitos T reguladores en calostro.

- *Colección de calostro manual. Técnica de Marmet*

Se recolectaron 300 μ L de calostro de cada voluntaria; la recolección se realizó mediante la técnica de Marmet (Figura 5) la cual consta de los siguientes pasos:

1. Colocar el dedo pulgar y los dedos índice y medio formando una letra C, a unos 3 o 4 cm del pezón (no siempre coincide con el borde de la areola). Evitar que el pecho descansa sobre la mano.
2. Empujar los dedos hacia atrás (hacia las costillas), sin separarlos. Si los pechos son grandes o caídos, primero levantarlos y después empujar los dedos hacia atrás.
3. Comprimir hacia el pezón, con movimiento como de rodillo, sin deslizar los dedos.
4. Repetir rítmicamente para vaciar. Rotar la posición de los dedos para vaciar todos los cuadrantes del pecho. Se utiliza ambas manos en cada pecho.
5. Evitar maniobras como exprimir, deslizar y estirar. La extracción no debe causar dolor.
6. Alternar estimulación y extracción en ambos pechos.



Figura 5. Obtención de calostro por la técnica de Marmet. Colocar los dedos detrás del pezón formando una letra "C", después, empujar el pecho hacia la pared torácica sin separarlos, comprimir el pezón y repetir rítmicamente los movimientos para vaciar los depósitos de leche

Obtención de células de calostro

Se realizó un primer lavado a las muestras diluyendo 1 volumen de calostro con 3 volúmenes de solución isotónica amortiguadora (BD, FACSFlow™ Cat. No. 342003) y se centrifugaron a 600xg durante 15 min. El contenido graso se eliminó manualmente con una gasa, el sobrenadante se retiró por inversión del tubo y el botón celular se resuspendió en el volumen remanente. Posteriormente, se realizó un segundo lavado con el mismo volumen de FACSFlow inicial y se centrifugó a 400xg durante 5 minutos; el sobrenadante se retiró y se resuspendió el botón celular. El número total de células se obtuvo a través de la cuenta de viabilidad con azul de Tripano (1:10) usando el contador automatizado Countess® (Invitrogen). La suspensión celular se ajustó a 1×10^6 células vivas/mL para realizar el inmunomarcaje.

Inmunomarcaje de sangre periférica y calostro

Partiendo de 1×10^6 células de sangre periférica (50 μ L) y calostro de cada voluntaria se realizó el inmunomarcaje de acuerdo a los siguientes procedimientos.

Tinción de superficie

Ambas muestras se pusieron en contacto con anticuerpos monoclonales (Tabla 2) previamente titulados e incubadas en oscuridad a 4°C durante 30 minutos los marcadores que se incluyeron fueron anti: CD45, CD3, CD4, CD25, CD45RO, CD45RA, CD152, CD279 y FVD (Fixable Viability Dye); después de ese tiempo, se fijaron las células y lisaron los eritrocitos de sangre periférica con una solución de Paraformaldehído (<15%) y Cloruro de amonio (1:10; BD, FACS™ Lysing Solution, Cat. No. 349202). Las células se incubaron 10 min en oscuridad a temperatura ambiente y el exceso de anticuerpo se retiró centrifugando las muestras a 400xg durante 5 min. Las células se almacenaron hasta su análisis por citometría de flujo en el equipo FACS Aria III (BD) equipado con láseres de 405, 488, 603 nm.

Tinción intracelular

Las muestras fueron marcadas con anticuerpos monoclonales de superficie anti: CD45, CD3, CD4, CD25, CD45RA, CD45RO y FVD previamente titulados e incubadas a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente se volvieron a incubar a 4°C por 20 minutos con solución permeabilizadora (BD Cytotfix/Cytoperm™, Cat 421005) Las muestras fueron lavadas con una solución amortiguadora (1:10; BD, Perm Wash Buffer™ Cat. No. 421002), enseguida se les adicionó el anticuerpo intracelular anti-TGF-β y se incubaron 30 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se lavaron con Perm Wash Buffer™ para retirar el exceso de anticuerpo. Los datos fueron analizados por citometría de flujo.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para inmunomarcaje

Marcador	Fluorocromo	Marca	Clona	Lote	Catálogo	Volumen titulado (μL)
CD45	eFluor 450	eBioscience	clona HI30	B180440	304029	1.0
CD3	PerCp	Biosciences	SE	4232779	347344	10.0
CD4	APC Cy7	BioLegend	RPA-T4	B209548	300518	1.0
CD25	PeCy7	BioLegend	M-A251	B190207	356108	2.5
CD45RO	FITC	Biosciences	SE	41590	555492	5.0
CD45RA	RedTexas	Invitrogen	SE	797594 A	SE	5.0
CD152	APC	BioLegend	L3D10	B185662	349908	5.0
CD279	PE	BioLegend	EH12.2 H7	B201138	3299906	5.0
FVD	eFluor 506	eBioscience	SE	E15162-127	65-0866-14	0.5
TGF-β	PE	Macs	SE	514112709	SE	2.5

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y la correlación de Spearman para establecer si se encontraban diferencias

estadísticamente significativas; los resultados se muestran como la media \pm error estándar (SEM). Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.01.

RESULTADOS

Características demográficas de la población

Hasta el momento, se han incluido en el estudio 17 voluntarias puérperas y las características demográficas de ellas y de los recién nacidos se resumen en la Tabla 3. La edad de las participantes se encuentran en el rango promedio de edad reproductiva recomendada (25.5 ± 8.8 años); además, el IMC al momento del parto es, en promedio $29.5 \pm 5.1 \text{ kg/m}^2$. Por otra parte, el número de gestas se encuentra en 1.8 ± 1.0 hijos.

Con respecto a los datos demográficos de los recién nacidos, el tiempo de gestación se encontró entre 37.6 ± 1.5 semanas (SDG), contando así con más nacimientos a término ($n=12$) que pretérmino ($n=5$) y más partos vaginales ($n=13$) que cesáreas ($n=4$). De éstos, 10 recién nacidos fueron masculinos y 7 femeninos.

Tabla 3. Datos demográficos

Madre (n=17)	
Edad (años)	25.5 ± 8.8
IMC (kg/m^2)	29.5 ± 5.1
Gestas	1.8 ± 1.0
Recién Nacido (n=17)	
Tiempo de Gestación (SDG)	37.6 ± 1.5 Pretérmino: 5; Término: 12
Vía de Nacimiento	Vaginal: 13; Cesárea: 4
Peso (kg)	2.8 ± 0.1
Talla (cm)	48.2 ± 2.3
Género	Masculino: 10; Femenino: 7

Se muestran el promedio \pm SD (desviación estándar). IMC: Índice de Masa Corporal. SDG: Semanas de Gestación

El calostro humano contiene linfocitos Treg

Partiendo de sangre periférica como referencia, se estableció el algoritmo de análisis para identificar a los linfocitos Treg en calostro. Este consistió en seleccionar los eventos sencillos con el diagrama FSC-A vs FSC-H para excluir los eventos agregados; a partir de estos eventos sencillos y utilizando el marcador CD45 (CD45 vs SSC-A) nos enfocamos en la región de linfocitos, los cuales tienen alta expresión a dicho marcador y baja complejidad. Con el marcador de viabilidad FVD nos aseguramos sólo estar analizando células vivas, posteriormente, se seleccionan a las células que coexpresan CD3 y CD4 (linfocitos T cooperadores); a partir de éstos identificamos a los linfocitos T reguladores (a partir de un diagrama de puntos CD25 vs CD4) que presentan una alta expresión al marcador CD25 (Figura 6a).

Utilizando esta estrategia de análisis para las muestras de calostro, observamos gran proporción de eventos agregados, así mismo, mayor cantidad de células no hematopoyéticas que tienen nula expresión de CD45 (Figura 6b). A pesar de lo anterior, observamos que los linfocitos T con fenotipo CD4⁺CD25^{high} están presentes en calostro, y su porcentaje dentro de los linfocitos T cooperadores totales es mayor que los que se encuentran en sangre periférica. De esta manera, obteniendo el resultado promedio de todas las muestras, encontramos que el porcentaje de células Treg es mayor en calostro que en sangre periférica (Figura 6c, $36.83 \pm 3.9\%$ vs $7.0 \pm 0.5\%$, $p < 0.001$).

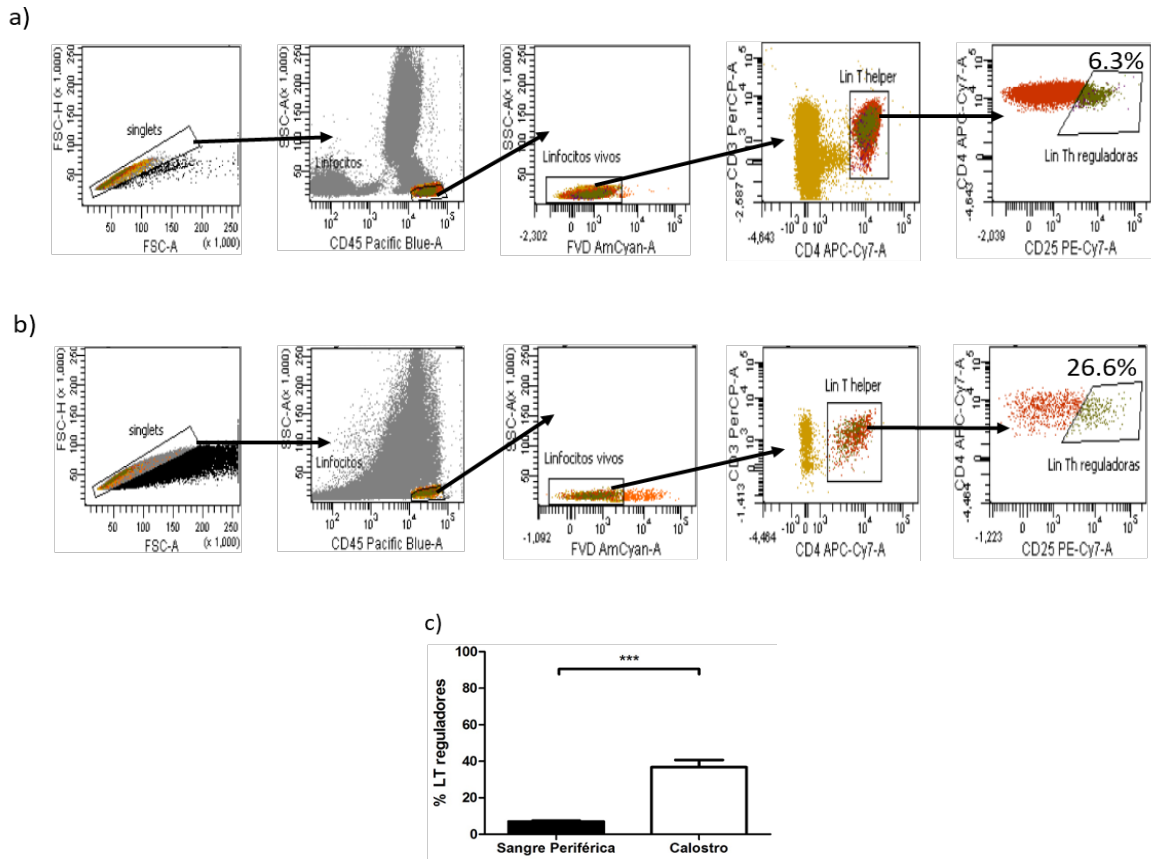


Figura 6. Algoritmo de análisis para la identificación de linfocitos T reguladores en sangre periférica y calostro de mujeres puérperas. A partir de eventos sencillos (FSC-A vs FSC-H) se seleccionó de la región de linfocitos (CD45+ vs SSC-A^{low}) las células viables (FVD-). De éstas últimas, se incluyeron solo a los linfocitos T cooperadores (CD3+ CD4+) y eligió la subpoblación de T cooperadores con fenotipo Treg (CD25^{high}). Se muestran gráficas de diagramas de puntos de una muestra representativa de sangre periférica (a) y calostro (b). El número total de muestras analizadas por citometría de flujo se muestran en gráfica de barras (c). Prueba de Mann Whitney. ***p<0.001

Pensando en que los linfocitos Treg de calostro pudieran provenir de sangre periférica, realizamos una prueba correlación de las frecuencias de linfocitos Treg de sangre periférica con los de calostro (Figura 7). De acuerdo a la regresión lineal, los resultados encontrados fueron $P= 0.2323$ y $r^2= 0.0944$. Además, la correlación de Spearman fue $r= 0.1642$ y $P= 0.5288$ lo cual indica que no existe correlación entre los linfocitos Treg de sangre periférica y los que se encuentran en calostro.

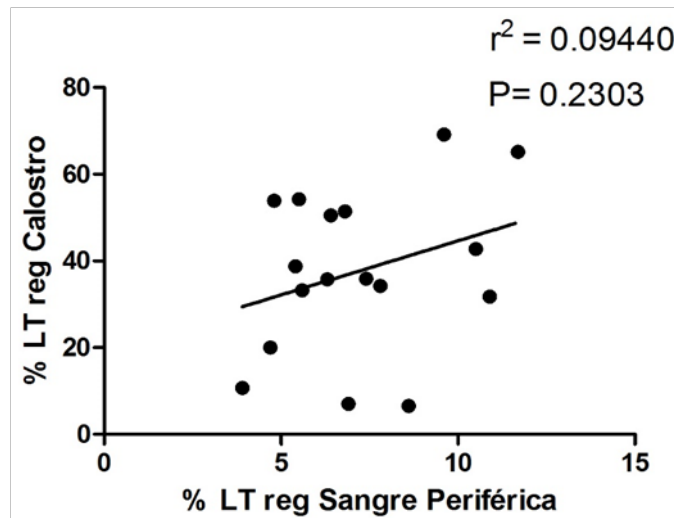


Figura 7. Correlación del porcentaje de Linfocitos T reguladores. El porcentaje de linfocitos Treg fue evaluado por citometría de flujo. El número total de muestras se representan en gráfica de puntos. Prueba de Spearman.

Linfocitos Treg de calostro, tienen fenotipo de memoria

Para caracterizar más a fondo el fenotipo de Treg de calostro, evaluamos sus características por su experiencia antigénica. Utilizando la expresión de las moléculas en superficie CD45RA se identificó a los linfocitos Treg naive (CD45RA+) y con la molécula CD45RO a los linfocitos Treg que se asocian a la memoria inmunológica (CD45RO+). En sangre periférica se observa que la proporción de dichos fenotipos en Treg son similares entre sí (Figura 8a), mientras que en calostro el porcentaje de Treg naive es considerablemente menor y los que poseen el fenotipo de memoria representan la mayoría de las mismas (Figura 8b). Así mismo, cuando comparamos la proporción de los dos fenotipos de Treg en ambos compartimentos observamos que en sangre periférica hay mayor proporción de Treg naive ($35.9 \pm 3.1\%$ vs $3.2 \pm 0.9\%$, $p < 0.001$, Figura 8c), mientras que en calostro hay mayor cantidad de Treg de memoria ($95.8 \pm 0.9\%$ vs $63.7 \pm 3.2\%$, $p < 0.001$).

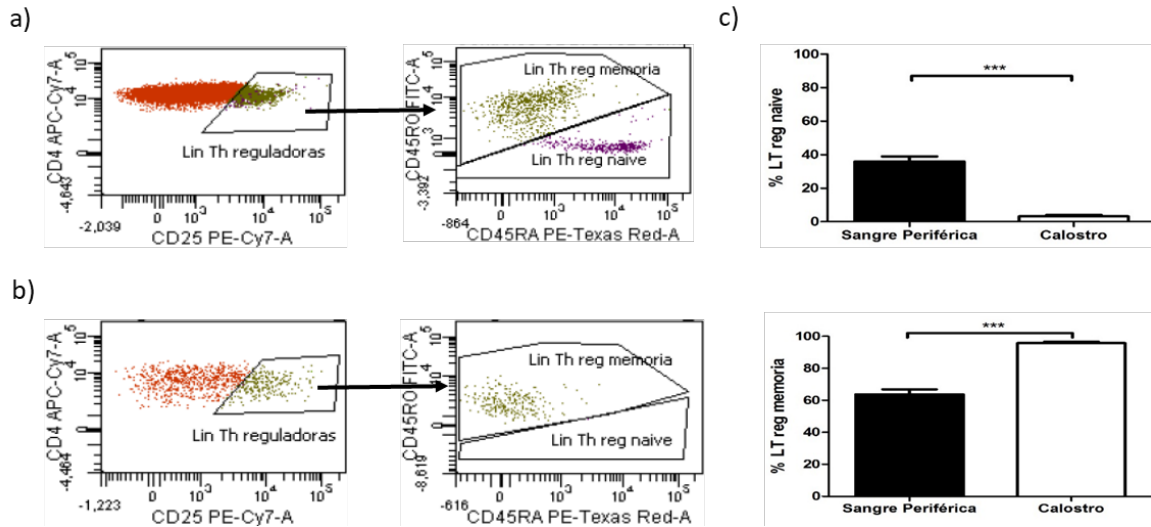


Figura 8. Porcentaje de Linfocitos T reguladores naive y de memoria. Muestras de sangre periférica (a) y calostro (b) analizadas por citometría de flujo fueron inmunomarcadas con anticuerpos anti- CD4, CD25, CD45RO y CD45 RA. Se obtuvo el porcentaje de linfocitos T reg naive (CD45 RA+) y de memoria (CD45 RO+). En diagramas de puntos se observa muestras representativa de sangre periférica y calostro. El número total de muestras se representan en gráfica de barras (c). Las muestras fueron obtenidas de mujeres púerperas. Prueba de Mann Whitney. ***p<0.001

Mayor expresión de moléculas inmunoregulatoras de Treg en calostro

Siguiendo con la caracterización de Treg se evaluó la expresión relativa de moléculas con funciones inmunoregulatoras: CD152, CD279 y TGF- β . Tanto en los histogramas de sangre periférica (Figura 9a y 10a) como de calostro (Figura 9b y 10b) se puede ver que estas moléculas se expresan en los linfocitos Treg; sin embargo en calostro la expresión relativa de estas moléculas es mayor. Del mismo modo, cuando analizamos toda nuestra población de estudio (Figura 9c y 10c), encontramos que la expresión relativa de CD152 y CD279 en Treg de sangre periférica fue de 347.7 ± 28.7 y 909.2 ± 51.8 ; mientras que en calostro fue de 2253 ± 752 y 2380 ± 217.4 , ($p<0.05$ y $p<0.001$) respectivamente. En cuanto a la expresión relativa de TGF- β , esta fue de 683.4 ± 61.3 en sangre periférica y 1695 ± 295.3 en calostro ($p<0.01$). Esto nos indica que, el nivel de expresión de estas moléculas es mayor en calostro comparado con sangre periférica.

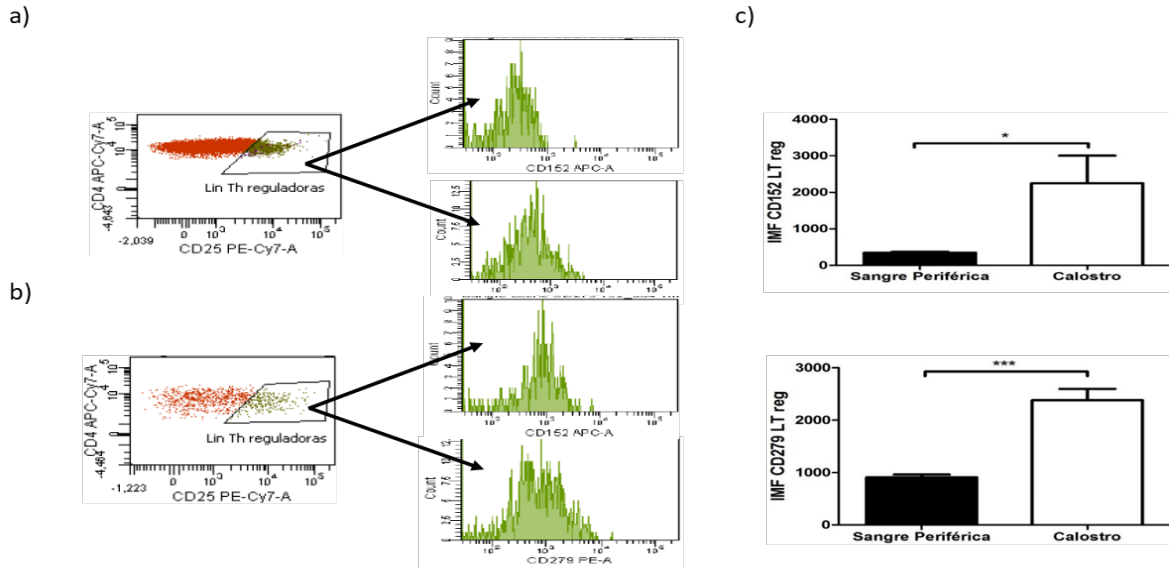


Figura 9. Expresión de CD152 y CD279 en sangre periférica y calostro. Las muestras fueron inmunomarcadas con anticuerpos anti- CD152 y CD279. Por citometría de flujo se evaluó la expresión relativa (medida como la intensidad media de fluorescencia, IMF) de cada una de ellas en linfocitos T reg de sangre periférica (a) y calostro (b). Los diagramas de puntos y los histogramas son muestras representativas. En gráficas de barras se muestra la expresión relativa de CD152 (c) y CD279 (d) del número total de muestras. Prueba de Mann Whitney. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

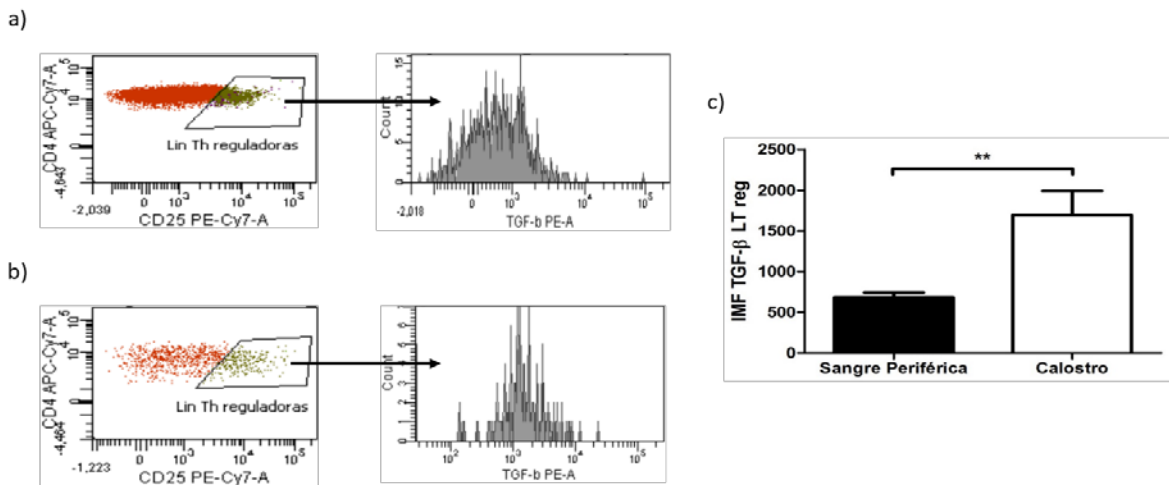


Figura 10. Expresión de TGF-β en sangre periférica y calostro. Las muestras fueron inmunomarcadas para el fenotipo Treg y TGF-β. La expresión de TGF-β (medida como la intensidad media de fluorescencia, IMF) se evaluó en linfocitos T reg de sangre periférica (a) y calostro (b). Los diagramas de puntos y los histogramas son muestras representativas. El número total de muestras se representa en una gráfica de barras (c). Prueba de Mann Whitney. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

El fenotipo inmunoregulador en Treg de memoria en calostro es mayor.

Se evaluó la expresión de CD152, CD279 y TGF- β en los fenotipos Treg naive (Figura 11a) y Treg memoria (figura 11b) y se encontró que la expresión relativa de estas moléculas es mayor en calostro que en sangre periférica, sin embargo, cuando se analizan todos los datos, observamos que esta tendencia sólo es estadísticamente significativa en la expresión de CD279 en ambos fenotipos y en la expresión TGF- β en la población de Treg memoria.

Además, el nivel de expresión promedio de CD279 en Treg naive fue menor en sangre periférica (537.2 ± 154.2 IMF) respecto al calostro (1834 ± 304.2 IMF) encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A su vez la expresión de las mismas moléculas en Treg memoria tuvieron el mismo comportamiento en sangre periférica (1045 ± 64.8 IMF) y en calostro (2315.0 ± 216.9 IMF) ($p < 0.001$). Respecto a la expresión de TGF- β mostramos que su expresión en Treg memoria es mayor en aquellas que provienen de calostro (1768 ± 339.5 IMF), comparadas con las de sangre periférica (693.7 ± 51.95 IMF) ($p < 0.05$) (Figura 11).

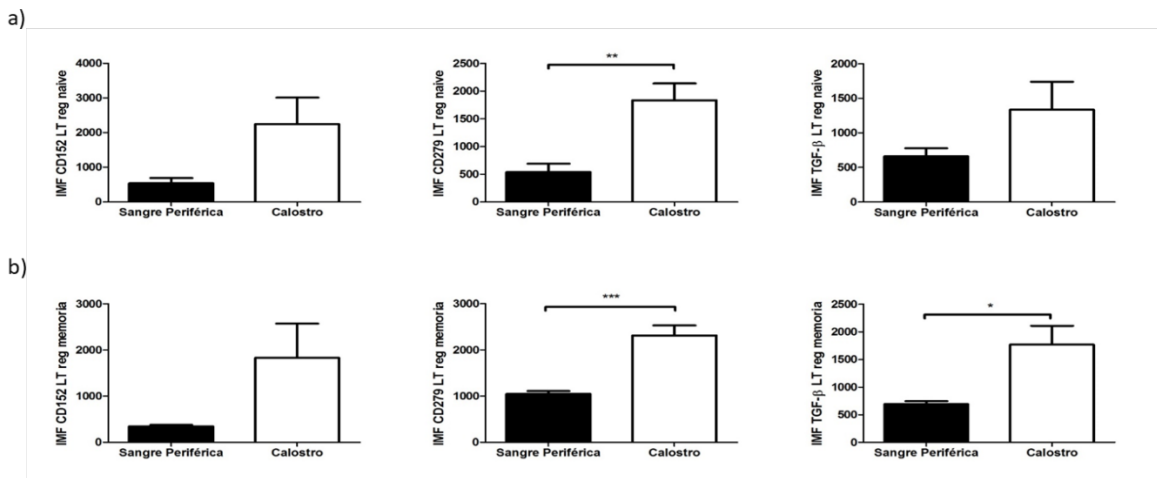


Figura 11. Expresión relativa de CD152, CD279 y TGF- β en LT reg con fenotipo naive y de memoria. La expresión de éstas moléculas fue evaluada por citometría de flujo en Treg naive (a) y memoria (b). Muestras obtenidas de sangre periférica y calostro de mujeres púerperas. . El número total de muestras se representan en gráficas de barras. Prueba de Mann Whitney. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Expresión de CD279^{high} en Treg memoria es mayor en calostro.

Ahora bien, se seleccionó una subpoblación de Treg con fenotipo de memoria (Figura 12a) que expresa altos niveles de CD279 y se encontró que la relación porcentual de ésta subpoblación (Figura 12b) es mayor en calostro que en sangre periférica ($48.8 \pm 4.7\%$ vs $33.1 \pm 3.3\%$; $p < 0.05$). Su incremento no solo se observa en la proporción, también mostramos que su expresión (Figura 12c) es mayor en calostro en relación a las Treg de sangre periférica (4117 ± 464.0 vs 2430 ± 238.0 ; $p < 0.01$).

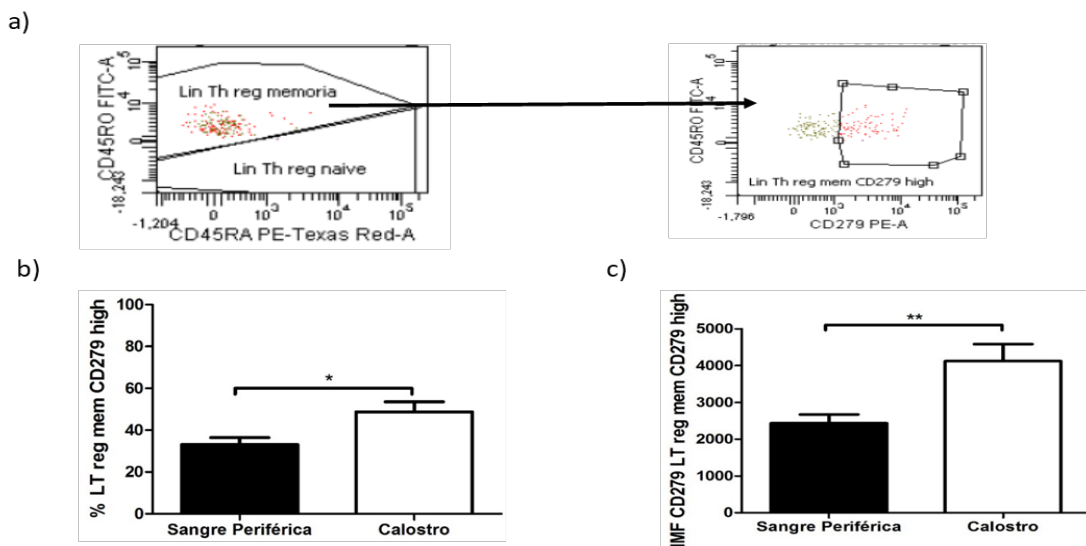


Figura 12. Expresión relativa de CD279^{high} en linfocitos T reg de memoria de sangre periférica y calostro. De las Treg con fenotipo de memoria se seleccionaron aquellas que expresan altos niveles de CD279, y se evaluó su distribución porcentual (b) y la expresión relativa (c). Las muestras fueron obtenidas de mujeres púerperas y analizadas por citometría de flujo. Los diagramas de puntos son muestras representativas y el número total de muestras se representa en una gráfica de barras. Prueba de Mann Whitney. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

El tiempo gestacional no afecta el porcentaje de los linfocitos T reguladores en calostro

Considerando el tiempo de gestación en la resolución del embarazo dividimos la población de estudio entre pretérmino (<37 SDG) y término (>37 SDG). Los datos demográficos los presentamos en la Tabla 4. Comparando la distribución porcentual de Treg de calostro, así como la expresión relativa de las moléculas

CD152, CD279 y TGF- β no encontramos diferencias significativas cuando comparamos entre sí ambos grupos (Figura 13a-d).

Tabla 4. Agrupación de la población de estudio dependiendo de la edad gestacional

Madre	Pretérmino (n= 5)	Término (n= 12)	p
Edad (años)	27.4 \pm 9.2	24.7 \pm 8.9	>0.05
Edad gestacional (SDG)	35.9 \pm 1.0	38.4 \pm 1.0	0.0052
IMC (Kg/m ²)	32.1 \pm 8.4	28.4 \pm 2.7	>0.05
Gestas	1.8 \pm 1.3	1.7 \pm 1.0	>0.05

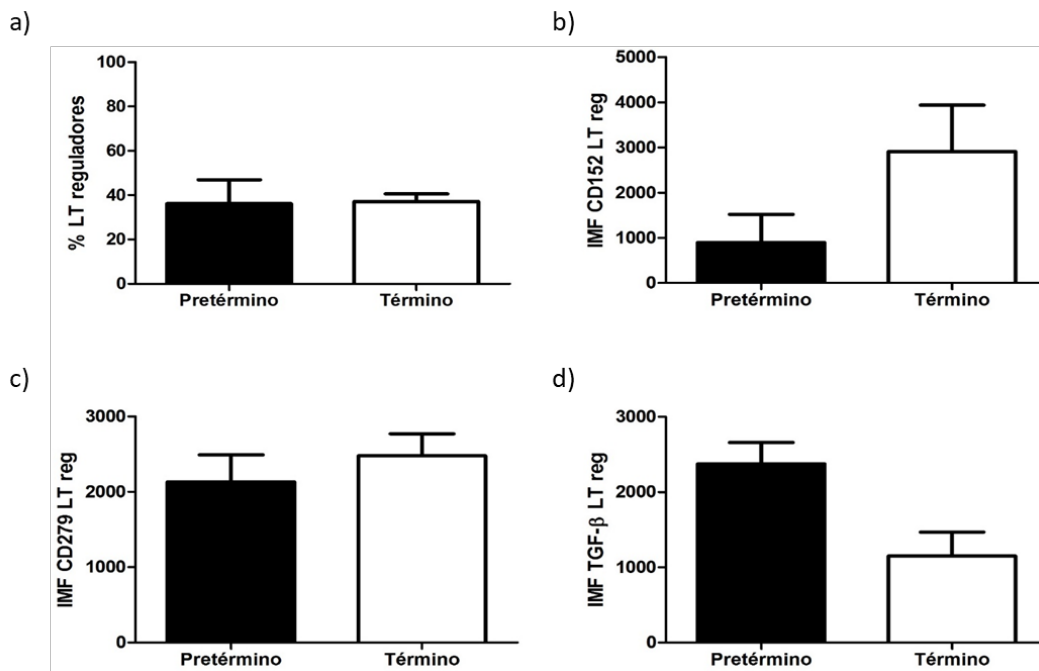


Figura 13. Comparación del tiempo de gestación en el porcentaje de Treg y su fenotipo en calostro. Con base a las semanas de gestación (pretérmino: 32-37 SDG; y término: >37 SDG) se evaluó el porcentaje de linfocitos T reguladores (a), la expresión de CD152 (b), CD279 (c) y TGF- β (d). El porcentaje y la expresión de éstas moléculas fueron evaluadas por citometría de flujo. Prueba de Mann Whitney. * p<0.05 ** p<0.01 ***p<0.001

Expresión de TGF- β en Treg de calostro es mayor cuando el nacimiento es vía vaginal

Por otra parte, también evaluamos si la vía de nacimiento (vaginal vs cesárea) impacta en los parámetros valorados. Los datos demográficos se muestran en la tabla 5 siendo que los grupos son comparables entre sí. Observamos que la vía de

nacimiento no afecta el porcentaje de Treg en calostro, ni la expresión de CD152 y CD279 (Figura 14a-c). Sin embargo, mostramos que la expresión de TGF- β es mayor en Treg de calostro de mujeres puérperas que alumbraron a su recién nacido vía vaginal respecto a los que su nacimiento fue cesárea (Figura 14d) (2161.0 ± 274.1 vs 763.7 ± 140.5 ; $p < 0.05$).

Tabla 5. Agrupación de estudio de acuerdo a la vía de nacimiento

Madre	Vaginal (n= 4)	Cesárea (n=13)	p
Edad (años)	24.8 ± 8.8	28.0 ± 9.5	>0.05
Edad gestacional (SDG)	37.5 ± 1.6	38.1 ± 1.4	>0.05
IMC (Kg/m^2)	30.0 ± 5.0	27.7 ± 2.3	>0.05
Gestas	1.8 ± 1.1	1.7 ± 0.9	>0.05

Los resultados se muestran como ($\bar{x} \pm \text{SD}$). Prueba de Mann Whitney. SDG: Semanas de gestación. IMC: Índice de masa corporal

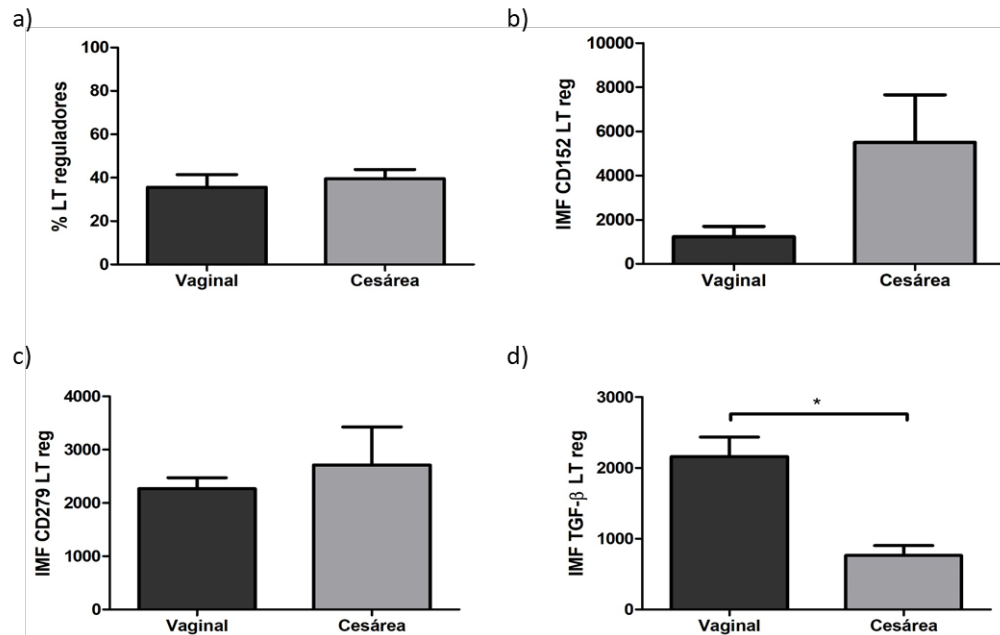


Figura 14. Comparación de la vía de nacimiento en el porcentaje de Treg y su fenotipo en calostro. Con base a la vía de nacimiento, vaginal y cesárea, se evaluó el porcentaje de linfocitos T reguladores (a), la expresión de CD152 (b), CD279 (c) y TGF- β (d). El porcentaje y la expresión de éstas moléculas fue evaluada por citometría de flujo. Prueba de Mann Whitney. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

El género del recién nacido no afecta el contenido porcentual de linfocitos T reguladores en calostro

Por último, dividimos la población de estudio considerando el sexo del recién nacido. Haciendo esta distinción (Tabla 6), observamos que el porcentaje de Treg en calostro, así como la expresión de CD152, CD279 o TGF- β no difieren por el género del recién nacido (Figura 15).

Tabla 6. Agrupación de estudio de acuerdo al género del recién nacido

Madre	Masculino (n= 4)	Femenino (n=13)	p
Edad (años)	26.3 \pm 9.6	26.7 \pm 8.8	>0.05
Edad gestacional (SDG)	37.6 \pm 1.5	37.7 \pm 1.5	>0.05
IMC (Kg/m ²)	30.0 \pm 5.6	29.1 \pm 4.8	>0.05
Gestas	1.5 \pm 1.0	2.2 \pm 1.1	>0.05

Los resultados se muestran como ($\bar{x} \pm SD$). Prueba de Mann Whitney. SDG: Semanas de gestación. IMC: Índice de masa corporal

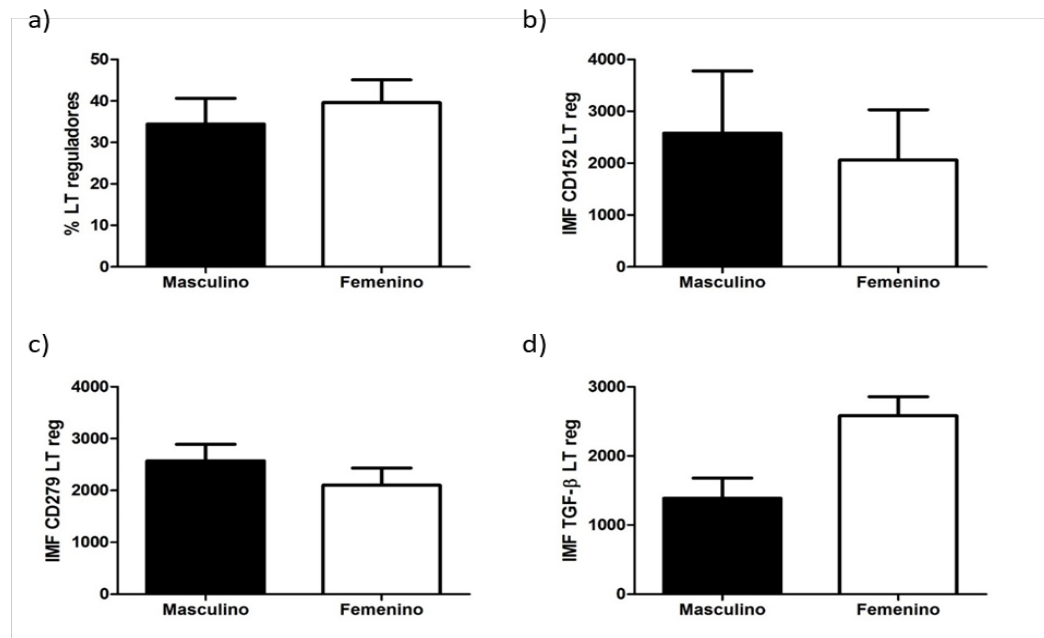


Figura 15. Comparación del género en el porcentaje de Treg y su fenotipo en calostro. Con base al género, masculino y femenino, se evaluó el porcentaje de linfocitos T reguladores (a), la expresión de CD152 (b), CD279 (c) y TGF- β (d). El porcentaje y la expresión de éstas moléculas fue evaluada por citometría de flujo. Prueba de Mann Whitney. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

DISCUSIÓN

Es bien sabido que el calostro y la leche materna aportan diferentes factores inmunoactivos como la inmunidad activa y pasiva que contienen, entre otras cosas, inmunoglobulinas, lactoferrinas, citocinas y leucocitos maternos⁸⁹. De estos últimos, se encuentran los linfocitos T reguladores quienes juegan un papel muy importante en el embarazo ya que la madre tolera al feto que inmunológicamente hablando es llamado aloinjerto ya que expresa antígenos paternos, sin embargo en leche materna, aún no han sido caracterizados.

El primer hallazgo encontrado en el presente estudio fue que por primera vez se demostró la existencia de linfocitos Treg en calostro humano y que, además, el porcentaje de éstas en calostro es mayor comparado con el porcentaje encontrado en sangre periférica. Somerset y colaboradores encontraron que durante la etapa temprana del embarazo, los linfocitos Treg en circulación incrementan considerablemente, después, hay un pico máximo en el segundo trimestre y finalmente en el postparto disminuyen, lo que es consistente con el retiro del estímulo inmunológico⁹⁰; esta disminución durante el postparto podría indicar que éstas células se estuvieran movilizándose a otros compartimentos o transfiriéndose al recién nacido vía la leche materna. Para comprobar esto realizamos la correlación del porcentaje de Treg en sangre periférica contra el porcentaje en calostro y encontramos que no existe correlación entre la disminución en circulación y los que se encuentran en calostro. Lo anterior pudiera indicar que los linfocitos Treg que encontramos en calostro pueden estar proviniendo de otros tejidos, por ejemplo, existen reportes donde hablan que los macrófagos, células que más predominan en el calostro y que se originan a partir de los monocitos de sangre periférica, salen del torrente sanguíneo para migrar hacia la leche a través del epitelio mamario. Algo similar ocurriría con los linfocitos Treg que pudieran estar proviniendo de tejidos como la mucosa intestinal, que es rica en linfocitos Treg y de donde provienen las bacterias que son transferidas por esta vía⁹¹.

Por otro lado, la existencia de Treg en calostro nos habla de transferencia de funciones inmunoregulatoras al recién nacido que potencialmente son capaces de atenuar enfermedades inflamatorias, infecciosas y alérgicas. Estos linfocitos Treg representarían la herencia de las experiencias inmunológicas de la madre y permitirían que el sistema inmunológico de los recién nacidos sea potencializado por la inmunidad adquirida en la madre. Por un lado estudios indican que las alergias maternas afecta el ambiente *in utero* y esto, a su vez, podría influenciar negativamente el sistema inmune del neonato⁹²; Meng y colaboradores demuestran que las alergias maternas correlacionan con una deficiencia de Treg en neonatos y esto puede aumentar la susceptibilidad de enfermedades alérgicas en los hijos⁹³. Por otro lado, ha sido mostrado que estos linfocitos también previenen autoinmunidades y suprimen la inflamación en varios modelos de enfermedades en animales, tales como, diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal y trasplante de órganos⁹⁴.

Nuestro estudio también revela que, a diferencia de sangre periférica en dónde hay un mayor porcentaje de linfocitos Treg naive (CD45RA+), en calostro prácticamente todos los linfocitos Treg encontrados expresan el marcador CD45RO lo que significa que tienen fenotipo de memoria, es decir, han tenido exposición antigénica previa. Esto último nos indica que esta población es capaz de transferir memoria inmunológica y por lo tanto protección al recién nacido. Desde 1991, Wirt⁶⁸ demostró que existen cambios en la expresión de ciertos marcadores fenotípicos de reciente o previa activación en linfocitos T de leche humana comparados con los que se encuentran en sangre periférica; en leche, el porcentaje de células CD45RO+ aumenta significativamente lo que asegura una reinducción rápida de linfocitos T reguladores específicos para un antígeno ante encuentros subsiguientes con el mismo agente patógeno, lo que proporciona protección a largo plazo, contra ese agente.

Estudios *in vitro* han demostrado que los linfocitos Treg deben activarse primero a través del TCR para poder ejercer su actividad supresora⁹⁵. Esto implica que la activación del linfocito Treg es específica del antígeno y que la actividad supresora

de los Treg se desencadena de una manera antígeno-restringido⁹⁶. Por ejemplo, en un modelo de ratones diabéticos no obesos para diabetes tipo 1⁹⁷, las células Treg específicas para un autoantígeno pancreático fueron mucho más eficaces para prevenir la diabetes que las células policlonales Treg. En nuestros resultados, al haber un mayor porcentaje de Treg CD45RO+ éstos pueden tener una función inmunoreguladora más eficiente en el neonato, pues ya traen las experiencias antigénicas de la madre.

Los linfocitos Treg de calostro pueden tener varias funciones en el neonato como: 1) prevenir enfermedades inflamatorias como ECN⁹⁸; 2) suprimir alergias y asma⁹³; 3) inducir tolerancia contra antígenos alimentarios⁹⁹ y ayudar al establecimiento de bacterias comensales¹⁰⁰.

Se sabe que la leche humana es una importante fuente de bacterias que ayudan al desarrollo del bebé; estudios en animales han demostrado que los leucocitos de leche sobreviven el pasaje a través del tracto gastrointestinal en donde ellos se adhieren al epitelio o pueden atravesar la mucosa hacia la circulación e influenciar en la respuesta inmune del neonato⁸⁹. El hecho de que los linfocitos Treg encontrados tengan fenotipo de memoria, también puede indicar que tengan memoria de antígenos bacterianos de la madre y que estos pudieran ser transferidos al neonato y con esto obtener experiencia antigénica. Esta experiencia antigénica puede ayudar a que el neonato tenga una colonización específica en el tracto gastrointestinal, ya que si los linfocitos tienen antígenos de bacterias comensales que se encuentran en el intestino de la madre o en la leche materna como *Bifidobacterium*, estos pueden establecerse más rápidamente que un microorganismo patógeno. Además, cuando un microorganismo patógeno intenta colonizar, los anticuerpos sIgA promueven la inhibición de estos microorganismos impidiendo su adherencia y penetración al epitelio⁵⁴.

La leche materna es un ejemplo de inmunidad pasiva, ofrece el paso de linfocitos T y B maternos al neonato, lo que le permite al recién nacido combatir infecciones antes de adquirir la capacidad para producir estos linfocitos. Esta inmunización es

un método útil para dar lugar a una resistencia con rapidez sin tener que esperar el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria activa¹⁰¹.

En cuanto a los mecanismos de acción para el control de respuestas inmunes dañinas, los linfocitos Treg poseen varios, por mencionar algunos: (1) inmunosupresión contacto dependiente mediante moléculas como CTLA-4 y PD-1 e (2) inhibición por citocinas inmunoregulatoras como TGF- β ⁸¹. En esta investigación también encontramos que la expresión relativa de estas moléculas en linfocitos Treg es mayor en calostro comparado con la expresión en sangre periférica. Así mismo, cuando analizamos la expresión de las mismas moléculas en las subpoblaciones con fenotipo naive y memoria encontramos la misma tendencia en calostro, sin embargo sólo se encontraron diferencias significativas en CD279 y TGF- β . Los estudios de Wafula⁸⁵ sugieren que PD-1 (CD279) es un importante mediador en la protección fetal inducida por Treg en modelos murinos más que CTLA-4; ellos bloquearon PD-1 y observaron que se abolía el efecto protector de Treg, dando como resultado una tasa de abortos más alta comparado con los controles, mientras que el bloqueo de CTLA-4 no interfiere con el efecto protector de Treg. Por su parte TGF- β es esencial para el efecto inhibitorio de Treg, diversos estudios muestran una correlación estadísticamente significativa entre las altas concentraciones de TGF- β en leche y el riesgo reducido en niños de padecer enfermedades atópicas, los autores sugieren que TGF- β juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis en el intestino, regula la inflamación y subsecuentemente promueve la tolerancia oral¹⁰². Si consideramos que el tracto gastrointestinal del neonato está expuesto a antígenos bacterianos y alimentarios de la madre provenientes de la leche materna, TGF- β puede disminuir el riesgo de una respuesta inmune inadecuada y proporcionar tolerancia mientras que el infante gana experiencia antigénica sin repercusiones dañinas.

Por otra parte, la población con alta expresión de CD279 que se encontró en calostro puede indicar que ésta tiene mayor capacidad inmunoregulatora, sin embargo se necesita realizar ensayos funcionales para comprobar esto.

Existen diferencias entre los componentes bioactivos, macronutrientes, citocinas, enzimas, proteínas y factores inmunológicos de la leche dependiendo de la edad gestacional (pretérmino vs término) y la vía de nacimiento (vaginal vs cesárea). Además el contenido energético de la leche también cambia dependiendo del género del recién nacido⁴⁵. Debido a esto, decidimos evaluar el porcentaje de linfocitos Treg y su expresión de CD152, CD279 y TGF- β en cada uno de los factores mencionados para observar si alguno de estos modificaba la relación porcentual de Treg y/o la expresión de sus moléculas.

Con relación a la edad gestacional no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, la expresión de TGF- β de linfocitos Treg es mayor en calostro que en sangre periférica, esto coincide con diversos estudios, como el de Frost et al⁵⁷ donde encontraron una disminución significativa en los niveles de TGF- β 1 en calostro, dependiendo del avance de la edad gestacional, así mismo, niveles altos fueron producidos por madres de recién nacidos pretérmino; ellos suponen que la inflamación *in utero* asociada con la prematuridad puede desencadenar respuestas anti inflamatorias y reguladoras que conducen a un incremento en la producción de TGF- β .

Por otra parte, Yildiran y colaboradores¹⁰³ muestran que el número de linfocitos Treg cambia dependiendo de la vía de nacimiento, en los partos vaginales el número de Treg es mayor. En nuestro estudio, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos Treg, sin embargo, la expresión de TGF- β en linfocitos Treg es mayor en mujeres con partos vaginales que en mujeres con nacimientos vía cesárea electiva esto podría deberse al fenómeno de estrés relacionado con el parto vaginal.

CONCLUSIÓN

Los linfocitos Treg que se encuentran en calostro presentan fenotipo de memoria (CD45RO+), además su fenotipo inmunoregulador es mayor comparado con el fenotipo de los linfocitos Treg de sangre periférica. El fenotipo de estas células pudiera reflejar parte de las propiedades tolerogénicas que la leche humana tiene en los recién nacidos e infantes, y la vía de nacimiento, así como la edad gestacional pueden determinar su ocurrencia en calostro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical anatomy* 2013, **26**(1): 29-48.
2. Pang WW, Hartmann PE. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2007, **12**(4): 211-221.
3. Medina D. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1996, **1**(1): 5-19.
4. Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast cancer research : BCR* 2007, **9**(1): 204.
5. Suzuki R, Atherton AJ, O'Hare MJ, Entwistle A, Lakhani SR, Clarke C. Proliferation and differentiation in the human breast during pregnancy. *Differentiation; research in biological diversity* 2000, **66**(2-3): 106-115.
6. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2002, **7**(1): 49-66.
7. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America* 2013, **60**(1): 49-74.
8. Reber AJ, Donovan DC, Gabbard J, Galland K, Aceves-Avila M, Holbert KA, *et al.* Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part II. Effects on neonatal lymphocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* 2008, **123**(3-4): 305-313.
9. Michaelsen KF, Skafte L, Badsberg JH, Jorgensen M. Variation in macronutrients in human bank milk: influencing factors and implications for human milk banking. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1990, **11**(2): 229-239.
10. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(16): 14112-14120.
11. Yu ZT, Chen C, Kling DE, Liu B, McCoy JM, Merighi M, *et al.* The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* 2013, **23**(2): 169-177.

12. He Y, Lawlor NT, Newburg DS. Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. *Advances in nutrition* 2016, **7**(1): 102-111.
13. Vendrig JC, Fink-Gremmels J. Intestinal barrier function in neonatal foals: options for improvement. *Veterinary journal* 2012, **193**(1): 32-37.
14. SALUD OMDL. Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño. 2001 [cited 2017 30 de Mayo]Available from: <http://bit.ly/2vl3ggf>
15. Recomendación de la OMS sobre la alimentación del lactante. 2015 [cited 2017 28 de Mayo]Available from: <http://bit.ly/2vQpF6y>
16. Hosea Blewett HJ, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The immunological components of human milk. *Advances in food and nutrition research* 2008, **54**: 45-80.
17. Ip S, Chung M, Raman G, Trikalinos TA, Lau J. A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine* 2009, **4 Suppl 1**: S17-30.
18. Nishimura T, Suzue J, Kaji H. Breastfeeding reduces the severity of respiratory syncytial virus infection among young infants: a multi-center prospective study. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 2009, **51**(6): 812-816.
19. Duijts L, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics* 2010, **126**(1): e18-25.
20. Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D, *et al.* Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evidence report/technology assessment* 2007(153): 1-186.
21. Greer FR, Sicherer SH, Burks AW, American Academy of Pediatrics Committee on N, American Academy of Pediatrics Section on A, Immunology. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* 2008, **121**(1): 183-191.
22. Bertino E, Arslanoglu S, Martano C, Di Nicola P, Giuliani F, Peila C, *et al.* Biological, nutritional and clinical aspects of feeding preterm infants with human milk. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2012, **26**(3 Suppl): 9-13.

23. Estrategia Nacional de Lactancia Materna 2014-2018. In: Salud Sd, editor.; 2013. p. 32.
24. Pública INDS. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales México; 2013.
25. Lonnerdal B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Advances in experimental medicine and biology* 2004, **554**: 11-25.
26. Prentice A. Regional Variations in the Composition of Human Milk. In: Jensen R (ed). *Handbook of Milk Composition*: San Diego, CA, 1995, p 919.
27. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development* 2015, **91**(11): 629-635.
28. Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition* 2003, **77**(6): 1537S-1543S.
29. Boniglia C, Carratu B, Chiarotti F, Giammarioli S, Sanzini E. Influence of maternal protein intake on nitrogen fractions of human milk. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition* 2003, **73**(6): 447-452.
30. Jenness R. The composition of human milk. *Seminars in perinatology* 1979, **3**(3): 225-239.
31. Uauy R, Quan R, Gil A. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *The Journal of nutrition* 1994, **124**(8 Suppl): 1436S-1441S.
32. Cacho NT, Lawrence RM. Innate Immunity and Breast Milk. *Frontiers in immunology* 2017, **8**: 584.
33. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early human development* 2001, **65 Suppl**: S3-S18.
34. Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients* 2016, **8**(5).
35. Koletzko B. Human Milk Lipids. *Annals of nutrition & metabolism* 2016, **69 Suppl 2**: 28-40.

36. Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta* 2002, **23 Suppl A**: S9-19.
37. M G. *Human Milk Biochemistry and Infant Formula*. Elsevier: Cambridge, UK, 2014.
38. Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, *et al*. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(40): 34583-34592.
39. Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Peila C, *et al*. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* 2011, **128**(6): e1520-1531.
40. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual review of nutrition* 2005, **25**: 37-58.
41. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 2012, **22**(9): 1147-1162.
42. Gustafsson A, Hultberg A, Sjostrom R, Kacsokovics I, Breimer ME, Boren T, *et al*. Carbohydrate-dependent inhibition of Helicobacter pylori colonization using porcine milk. *Glycobiology* 2006, **16**(1): 1-10.
43. Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *The Journal of nutrition* 2000, **130**(12): 3014-3020.
44. Eiwegger T, Stahl B, Schmitt J, Boehm G, Gerstmayr M, Pichler J, *et al*. Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatric research* 2004, **56**(4): 536-540.
45. Urbaniak C, Angelini M, Gloor GB, Reid G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome* 2016, **4**: 1.
46. Mehta R, Petrova A. Biologically active breast milk proteins in association with very preterm delivery and stage of lactation. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 2011, **31**(1): 58-62.
47. McGuire W, Henderson G, Fowlie PW. Feeding the preterm infant. *Bmj* 2004, **329**(7476): 1227-1230.
48. Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clinics in perinatology* 2011, **38**(2): 321-331.

49. Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* 2004, **53**(9): 1388-1389.
50. Powe CE, Knott CD, Conklin-Brittain N. Infant sex predicts breast milk energy content. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council* 2010, **22**(1): 50-54.
51. Hanson LA, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Seminars in neonatology : SN* 2002, **7**(4): 275-281.
52. Lepage P, Van de Perre P. The immune system of breast milk: antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Advances in experimental medicine and biology* 2012, **743**: 121-137.
53. Shahid NS, Steinhoff MC, Roy E, Begum T, Thompson CM, Siber GR. Placental and breast transfer of antibodies after maternal immunization with polysaccharide meningococcal vaccine: a randomized, controlled evaluation. *Vaccine* 2002, **20**(17-18): 2404-2409.
54. Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. *Revista da Associacao Medica Brasileira* 2016, **62**(6): 584-593.
55. Palmeira P, Costa-Carvalho BT, Arslanian C, Pontes GN, Nagao AT, Carneiro-Sampaio MM. Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2009, **20**(6): 528-535.
56. Zambruni M, Villalobos A, Somasunderam A, Westergaard S, Nigalye M, Turin CG, *et al.* Maternal and pregnancy-related factors affecting human milk cytokines among Peruvian mothers bearing low-birth-weight neonates. *Journal of reproductive immunology* 2017, **120**: 20-26.
57. Frost BL, Jilling T, Lapin B, Maheshwari A, Caplan MS. Maternal breast milk transforming growth factor-beta and feeding intolerance in preterm infants. *Pediatric research* 2014, **76**(4): 386-393.
58. Oddy WH, Rosales F. A systematic review of the importance of milk TGF-beta on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2010, **21**(1 Pt 1): 47-59.

59. Rigotti E, Piacentini GL, Ress M, Pigozzi R, Boner AL, Peroni DG. Transforming growth factor-beta and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2006, **36**(5): 614-618.
60. Donnet-Hughes A, Duc N, Serrant P, Vidal K, Schiffrin EJ. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor-beta. *Immunology and cell biology* 2000, **78**(1): 74-79.
61. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology* 1990, **6**: 597-641.
62. F.O. Uruakpa* MAHI, E.N.T. Akobundu. Colostrum and its benefits: a review *Nutrition Research* 2002, **22**.
63. Schlesinger JJ, Covelli HD. Evidence for transmission of lymphocyte responses to tuberculin by breast-feeding. *Lancet* 1977, **2**(8037): 529-532.
64. Pavlova V. Immune properties of milk cells. *J BioSci Biotech* 2012, **22**.
65. Kenneth M. PTMW. *Inmunobiología de Janeway, 7a edn, 2008*.
66. Jin YY, Wei Z, Cao RM, Xi W, Wu SM, Chen TX. Characterization of immunocompetent cells in human milk of Han Chinese. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* 2011, **27**(2): 155-162.
67. Trend S, de Jong E, Lloyd ML, Kok CH, Richmond P, Doherty DA, *et al*. Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PLoS one* 2015, **10**(8): e0135580.
68. Wirt DP, Adkins LT, Palkowetz KH, Schmalstieg FC, Goldman AS. Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry* 1992, **13**(3): 282-290.
69. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological reviews* 2014, **259**(1): 88-102.
70. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in immunology* 2016, **37**(11): 803-811.

71. Barclay NA BM, Birkeland ML, et al. The Leukocyte Antigen FactsBook. San Diego, CA; 1997.
72. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European journal of immunology* 2007, **37 Suppl 1**: S116-123.
73. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation* 2012, **35**(6): 1773-1780.
74. Ji HB, Liao G, Faubion WA, Abadia-Molina AC, Cozzo C, Laroux FS, et al. Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *Journal of immunology* 2004, **172**(10): 5823-5827.
75. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology* 2002, **3**(2): 135-142.
76. Casati C, Camisaschi C, Novellino L, Mazzocchi A, Triebel F, Rivoltini L, et al. Human lymphocyte activation gene-3 molecules expressed by activated T cells deliver costimulation signal for dendritic cell activation. *Journal of immunology* 2008, **180**(6): 3782-3788.
77. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004, **21**(4): 503-513.
78. Akashi K, Traver D, Kondo M, Weissman IL. Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *International journal of hematology* 1999, **69**(4): 217-226.
79. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(7): 1701-1711.
80. José Luis González Parias VEDG, Margarita M. Velásquez-Lopera. FOXP3: MASTER GENE CONTROLLING THE DEVELOPMENT AND FUNCTION OF REGULATORY CELLS. *Inmunología* 2010, **Vol. 29**.
81. Arce-Sillas A, Alvarez-Luquin DD, Tamaya-Dominguez B, Gomez-Fuentes S, Trejo-Garcia A, Melo-Salas M, et al. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *Journal of immunology research* 2016, **2016**: 1720827.

82. Romo-Tena J, Gomez-Martin D, Alcocer-Varela J. CTLA-4 and autoimmunity: new insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmunity reviews* 2013, **12**(12): 1171-1176.
83. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003, **423**(6939): 506-511.
84. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine* 2007, **13**(3): 108-116.
85. Wafula PO, Teles A, Schumacher A, Pohl K, Yagita H, Volk HD, *et al.* PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells in a pregnancy murine model. *American journal of reproductive immunology* 2009, **62**(5): 283-292.
86. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology* 2006, **27**(4): 195-201.
87. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews* 2010, **236**: 219-242.
88. Paulina B-P. Identificación de Linfocitos T con caracter inmunoregulador en calostro humano. Licenciatura thesis, Simon Bolivar, Mexico, 2017.
89. Hassiotou F, Geddes DT. Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Advances in nutrition* 2015, **6**(3): 267-275.
90. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004, **112**(1): 38-43.
91. Kourtis AP, Ibegbu CC, Theiler R, Xu YX, Bansil P, Jamieson DJ, *et al.* Breast milk CD4+ T cells express high levels of C chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 4 and are preserved in HIV-infected mothers receiving highly active antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* 2007, **195**(7): 965-972.
92. Amoudruz P, Holmlund U, Malmstrom V, Trollmo C, Bremme K, Scheynius A, *et al.* Neonatal immune responses to microbial stimuli: is there an influence of maternal allergy? *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005, **115**(6): 1304-1310.

93. Meng SS, Gao R, Yan BD, Ren J, Wu F, Chen P, *et al.* Maternal allergic disease history affects childhood allergy development through impairment of neonatal regulatory T-cells. *Respiratory research* 2016, **17**(1): 114.
94. Okeke EB, Okwor I, Mou Z, Jia P, Uzonna JE. CD4+CD25+ regulatory T cells attenuate lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory responses and promotes survival in murine *Escherichia coli* infection. *Shock* 2013, **40**(1): 65-73.
95. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International immunology* 1998, **10**(12): 1969-1980.
96. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology* 2009, **70**(4): 326-336.
97. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, *et al.* In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(11): 1455-1465.
98. Dingle BM, Liu Y, Fatheree NY, Min J, Rhoads JM, Tran DQ. FoxP3(+) regulatory T cells attenuate experimental necrotizing enterocolitis. *PloS one* 2013, **8**(12): e82963.
99. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *Journal of immunology* 2001, **167**(8): 4245-4253.
100. Konieczna P, Groeger D, Ziegler M, Frei R, Ferstl R, Shanahan F, *et al.* Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* 2012, **61**(3): 354-366.
101. Abul AK. *Inmunología celular y molecular*, 7a edn. ELSEVIER, 2007.
102. Munblit D, Treneva M, Peroni DG, Colicino S, Chow LY, Dissanayeke S, *et al.* Immune Components in Human Milk Are Associated with Early Infant Immunological Health Outcomes: A Prospective Three-Country Analysis. *Nutrients* 2017, **9**(6).
103. Yildiran A, Yurdakul E, Guloglu D, Dogu F, Arsan S, Arikan M, *et al.* The effect of mode of delivery on T regulatory (Treg) cells of cord blood. *Indian journal of pediatrics* 2011, **78**(10): 1234-1238.

ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TEXTO DECLARATIVO

Yo _____ declaro libremente que he sido informada de manera verbal y por escrito de los aspectos que se mencionan a continuación de la investigación titulada **“Influencia de los linfocitos T reguladores de calostro humano en la colonización de los géneros bacterianos *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* en el intestino de neonatos término y pre-término”**

- Justificación y objetivos de la investigación
- Procedimientos que van a usarse y su propósito con un lenguaje entendible para mi (representado), así como las responsabilidades que adquiero al participar
- Molestias y riesgos esperados
- Beneficios que puedan obtenerse
- La disponibilidad de tratamiento médico a la que tendría derecho por parte de la institución de atención a la salud
- El compromiso de proporcionarme información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esta pudiera afectar mi voluntad para continuar participando
- Que si existen gastos adicionales, derivados de este estudio de investigación, estos serán absueltos por el presupuesto de la misma
- La seguridad de que no se me identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares. Capítulo I de los Principios de Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7, 8 y 9: y aviso de privacidad Institucional
- La libertad de retirar mi consentimiento in en cualquier momento sin que por ello se creen prejuicios para continuar mu cuidado y tratamientos
- Que en caso de no aceptar participar en el investigación no existirá ninguna responsabilidad, ni se verán afectados los derechos de atención médica presentes o futura
- La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados a la investigación

Por lo anterior **Si** ___ o **no** ___ estoy de acuerdo en participar en la investigación arriba señalada firmando la declaración de consentimiento informado

Nombre y firma del sujeto de investigación o su representante legal

Testigo 1

Nombre y firma

Parentesco

Domicilio

Testigo 2

Nombre y firma

Parentesco

Domicilio

Nombre y firma del investigador principal Ciudad de México a ____ de ____ de ____