



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS.**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS.**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR.**

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS LINFOCITOS T CD4+ DE ADULTOS Y  
NEONATOS HUMANOS EN FUNCIÓN DE LA ACTIVACIÓN, LA EDAD  
GESTACIONAL Y EL TIPO DE NACIMIENTO.**

**TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. LINDA AIMARA KEMPIS CALANIS**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN.**

**(CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR)**

**CUERNAVACA, MORELOS.**

**Febrero, 2024.**

## **JURADO**

**Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz**

Facultad de Medicina, UAEM.

PRESIDENTE

**Dra. Sonia Dávila Ramos**

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

SECRETARIO

**Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay**

Instituto de Biotecnología, UNAM.

VOCAL

**Dra. Vanessa López Guerrero**

Facultad de Nutrición, UAEM.

VOCAL

**Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva.**

Instituto de Biotecnología, UNAM.

VOCAL

**Dra. Gabriela RosasSalgado**

Facultad de Medicina, UAEM.

SUPLENTE

**Dra. María Angélica Santana Calderón**

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

SUPLENTE

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Angélica Santana, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y hacer un ambiente en donde todos pueden crecer tanto en la parte académica y como en lo personal.

A CONACyT, por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo. Al IICBA, UAEM, por brindarme los medios necesarios para mi desarrollo profesional. Al Hospital General “Dr. José G. Parres ” de Cuernavaca y al hospital general de Temixco, por aportar los concentrados leucocitarios y la sangre de cordón umbilical.

A mis sinodales, en especial a la Dra. Yvonne y a el Dr. Gustavo por todas sus valiosas aportaciones en esta tesis.

Al Biólogo Oscar Ramírez Pliego por su ayuda en el laboratorio.

A Pao, Rebe y Sara que me han brindado su compañía desde el inicio de mi trayectoria en la UAEM.

A todos mis compañeros de laboratorio, por siempre apoyarme y darme ánimos. En especial al Mtro. C. Carlos Ventura por su aportación con los experimentos de proliferación que se usaron en esta tesis.

A mi Toni por todo su amor.

A mi familia, quienes me respaldan y me brindan su amor incondicional. A mi hermanita, por llenar mi vida de colores y alegría. A mi abuelo Hugo, mi abuela Beatriz y tíos, cuyo afecto han trascendido la distancia y el tiempo, llevándolos siempre en mi corazón.

Dedico esta tesis de manera especial a mi mamá, quien, a través de sus acciones, ha trazado un camino inédito para las mujeres de nuestra familia. Gracias a sus esfuerzos, he logrado avanzar hasta donde estoy hoy.

Y, finalmente, mi agradecimiento a todos mis queridos perros. Aunque algunos ya no están conmigo, su recuerdo sigue dándome mucha felicidad.

## Resumen

La respuesta inmune adaptativa es coordinada por las células T CD4<sup>+</sup>, que determinan el tipo y la fuerza de la respuesta inmune, así como las células efectoras involucradas durante un desafío inmunitario particular. Se ha reportado que las células T CD4<sup>+</sup> de los recién nacidos son menos responsivas y sesgadas en su respuesta, lo que lleva a una activación baja de la respuesta inmune celular y una producción deficiente de anticuerpos por parte de las células B. Esta baja respuesta es esencial para la ventana tolerante que favorece la transición del nacimiento del ambiente estéril en el útero al mundo exterior plagado de antígenos, pero deja a los recién nacidos vulnerables a la infección, que sigue siendo un problema de salud importante en México y el mundo.

Los recién nacidos tienen una alta tasa de morbilidad y mortalidad por infecciones. Los mecanismos celulares y moleculares asociados están poco descritos. En este trabajo, nos preguntamos si los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales, tienen un programa genómico específico que los predispone a una baja respuesta inmune en comparación con las células vírgenes de adultos.

Para responder a esta pregunta, evaluamos el transcriptoma de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes neonatales y de adultos humanos. Nuestros resultados apuntan a una red de regulación muy particular en las células neonatales, que favorece procesos como la proliferación, el metabolismo de la glucosa, la señalización intracelular y una baja respuesta de las células T. Comprender esta red es de suma importancia ya que podría conducir a mejores vacunas para recién nacidos y mejor tratamiento de las enfermedades potencialmente mortales durante este período altamente vulnerable de nuestras vidas.

Adicionalmente, quisimos saber si el tipo de nacimiento o la edad gestacional (parto prematuro) influyen en el establecimiento del perfil génico neonatal. Usando transcriptómica, encontramos que, en la transición del nacimiento, el tipo de parto determina el establecimiento del perfil de expresión génica que tendrá el recién nacido, ya que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos nacidos por parto por cesárea presentan un perfil de expresión génica diferente que los de los neonatos nacidos por parto natural. Por otra parte, los neonatos prematuros no cambian mucho su

patrón de expresión génica al compararlos con los neonatos de término, nacidos en ambos casos por cesárea.

Nuestros hallazgos indican que para los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, el tipo de nacimiento es sumamente importante en el establecimiento del perfil de expresión génica del neonato, teniendo mayor impacto que las últimas semanas de gestación.

# INDICE

## Tabla de contenido

JURADO .....	2
Resumen .....	4
INDICE.....	6
Introducción: .....	8
Inmunidad Adaptativa .....	8
Señalización a través del TCR. ....	10
Fenotipo efector .....	11
Metabolismo en células T .....	12
La glucosa es una fuente importante de energía en las células inmunes. ....	13
El TLR5 como receptor coestimulador en linfocitos T.....	15
Inmunidad neonatal .....	16
Sistema inmunológico de neonatos nacidos por cesárea.....	17
Sistema inmunológico de neonatos de pretérmino .....	18
Antecedentes: .....	19
Objetivo general:.....	21
Objetivo .....	21
Objetivos particulares:.....	22
Materiales y métodos .....	22
Purificación y estimulación celular.....	22
Preparación y secuenciación de ARN .....	23
Análisis de los datos de RNA-seq .....	24
Concepto RNA-seq:.....	24
Citometría de flujo.....	25
Evaluación de la proliferación y activación temprana en respuesta a señales TCR/CD28 y TCR/TLR5.....	25
Capítulo 1. Expresión génica en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de adultos y neonatos humanos en estado basal y en respuesta a señales de activación. ....	27
Purificación celular .....	27
Transcriptoma de las células T CD4 <sup>+</sup> de neonatos y adultos. ....	29
Análisis de calidad .....	30
Alineamiento y conteo.....	31

Visualización de IGV de regiones importantes .....	32
Conteo de lecturas (reads) por gen.....	33
Expresión diferencial con Deseq2.....	33
Comparación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de neonatos y adultos a nivel basal. ....	34
Anotación funcional.....	34
Validación experimental .....	40
Ensayo de proliferación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de adultos y neonatos .....	45
Conclusiones de la comparación a nivel basal .....	47
El perfil de expresión génica de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> neonatales muestra una baja activación en comparación con los adultos.....	48
Conclusiones de las comparaciones entre las células estimulados mediante CD3/CD28 .....	52
Expresión génica en respuesta a la activación a través de TCR/TLR5 .....	52
Conclusiones .....	57
Capítulo 2: Expresión génica en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de neonatos de acuerdo con el tipo de nacimiento y edad estacional. ....	59
2.1 Secuenciación de las muestras.....	59
2.2 Análisis de calidad .....	59
2.3 Alineamiento y conteo .....	60
2.4 Visualización de regiones importantes en el IGV .....	61
2.5 Comparación entre linfocitos T CD4 de neonatos prematuros y de término. ....	62
Conclusiones de la sección.....	66
Discusión .....	67
Referencias.....	71
Anexo.....	80

## Introducción:

### Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa proporciona un reconocimiento amplio y específico para responder ante antígenos propios y no propios.<sup>1</sup> Aunque los linfocitos B pueden secretar anticuerpos, los cuales llegan a los espacios extracelulares para proteger contra la infección, las principales células que coordinan la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T. Los linfocitos T se subdividen en linfocitos T citotóxicos (T CD8), los cuales eliminan a células infectadas o cancerosas, y los linfocitos T cooperadores (T CD4), los cuales coordinan la activación de varios tipos celulares del sistema inmune para montar una respuesta inmune ante un patógeno particular<sup>2</sup>.

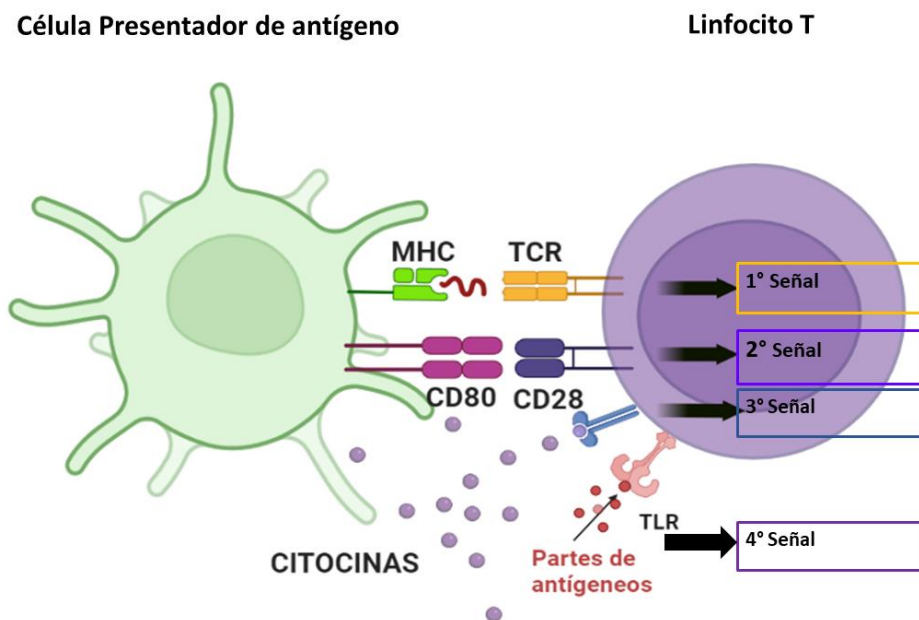
Los linfocitos T clásicos reconocen antígenos peptídicos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentados por las células presentadoras de antígenos (APC). Se subdividen en dos tipos: los linfocitos T cooperadores (Th) que coordinan la respuesta inmune y los linfocitos T citotóxicos (CTL) que producen gránulos citotóxicos y pueden matar a células infectadas. Los linfocitos T cooperadores expresan una proteína de superficie llamada CD4 y reconocen antígenos presentados por las moléculas de MHC II en la superficie de las APC. Por su parte, los linfocitos T citotóxicos expresan la proteína llamada CD8 y pueden reconocer antígenos presentados por moléculas de MHC I<sup>3</sup>.

Los linfocitos T maduran en el timo y salen a la circulación como linfocitos T vírgenes, ya que no han reconocido a su antígeno. Estos recirculan entre la sangre, la linfa y los nodos linfáticos hasta que reconocen su antígeno, lo cual ocurre en el nodo linfático. Para reconocer a su antígeno, este debe ser previamente procesado y presentado por una célula presentadora de antígeno a través de su MHC (Complejo mayor de histocompatibilidad).

Para que los linfocitos T se activen requieren de 4 tipos de señales. La primera señal



es a través del reconocimiento del péptido que está siendo presentado por una célula presentadora de antígeno, una segunda señal coestimuladora a través de receptores coestimuladores, uno de los más estudiados en humanos es el CD28, la tercera señal que puede ser inducida por citocinas y la cuarta señal es la que se da por partes de antígenos que viajan en la linfa y pueden ser reconocidos por receptores que se expresan en la membrana de linfocitos, entre los más estudiados están los receptores tipo toll (TLR).



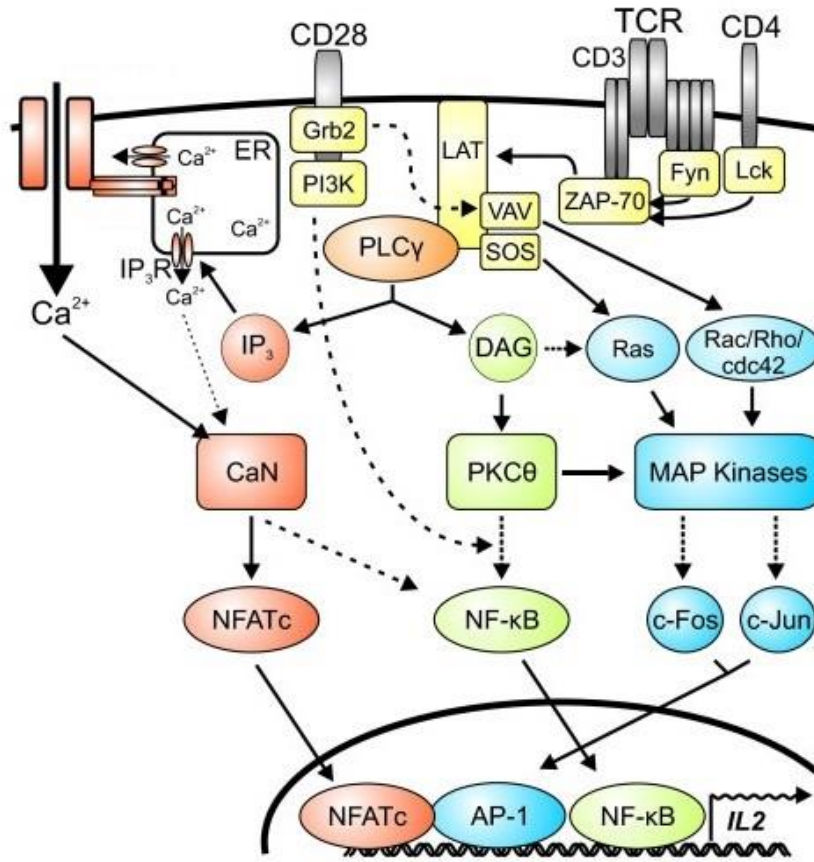
**Figura 1.** Señales necesarias para la activación de los linfocitos T. En la figura se muestra en verde a la célula presentadora de antígeno, presentando un péptido procesado a través de MHC y sus receptores coestimuladores, en morado se muestra al linfocito T recibiendo los 4 tipos de señales, a través del TCR, receptor coestimulador, por citocinas o partes del antígeno que viajan a través de la linfa. Figura creada con biorender, con la información del Abbas<sup>4</sup>.

Durante la activación, al ser estimulados con la primera y segunda señal, los linfocitos T vírgenes, pueden pasar por varias rondas de división celular, pero para que el linfocito T se programe para la supervivencia y proliferación (expansión clonal), pueda adquirir un fenotipo efector y desarrollar memoria inmunológica, se

requiere de la tercera señal, la cual puede ser proporcionada por interleucinas como la IL-12 o interferones de tipo I (IFN). En ausencia de la tercera señal, los linfocitos T no desarrollan un fenotipo efector y los que sobreviven a largo plazo son anérgicos<sup>5</sup>.

### **Señalización a través del TCR.**

El receptor de células T (TCR) es el responsable de reconocer al péptido antigénico presentado por el MHC. En la figura 2 se muestra una representación simplificada de la vía de señalización del TCR. Una señalización adecuada lleva a la activación de las células mediante la inducción de la activación de tres factores transcripcionales principales: el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT). Estos tres factores transcripcionales colaboran entre ellos para promover la expresión de genes que son cruciales para la activación del linfocito T. Durante este proceso, no sólo es importante la activación de cada uno de estos factores, sino que es necesario un balance adecuado en la activación de los tres. La alta activación de NFAT, por ejemplo, puede conducir a anergia mientras que la falta de su estimulación, no permite la proliferación adecuada de los linfocitos T. Asimismo, la baja de activación de AP-1 o de NF- $\kappa$ B lleva a una baja transcripción de genes de citocinas (Figura 2)<sup>26</sup>.

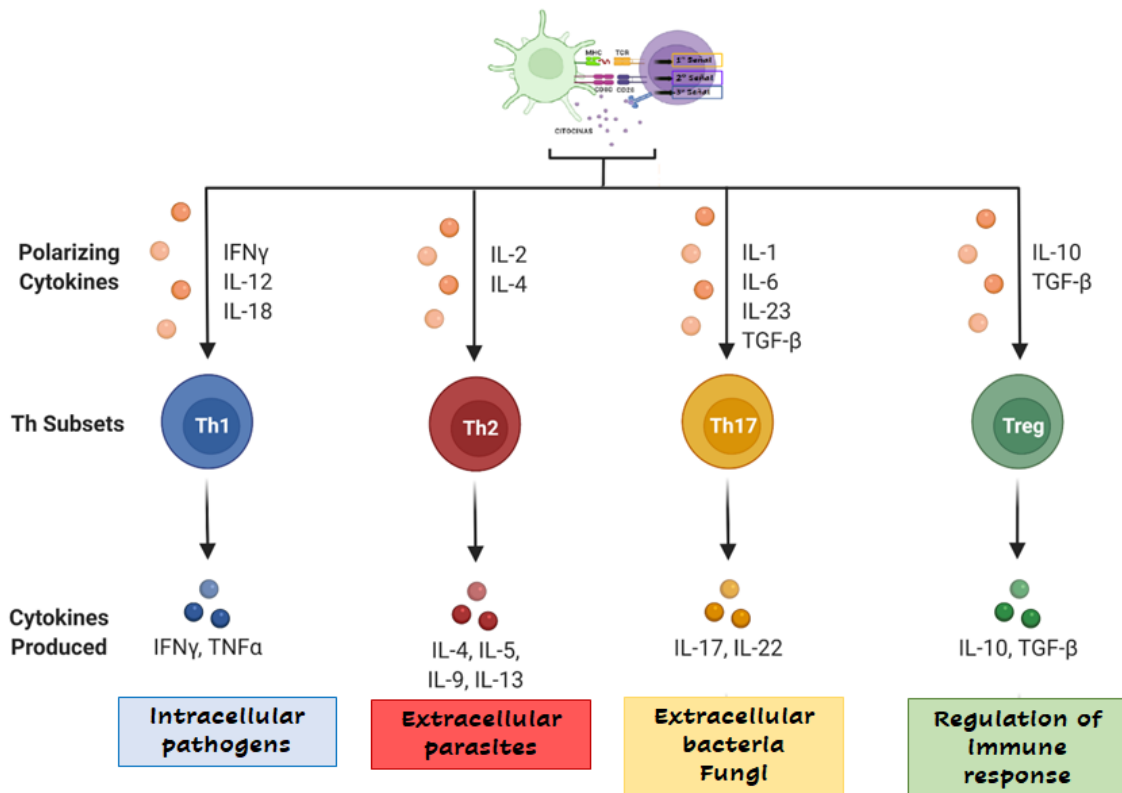


**Figura 2.** Señalización mediada por el TCR durante la activación de los linfocitos T. La señalización temprana (amarillo) lleva a la formación de un signalosoma con la proteína andamio LAT. A Partir de la activación de PLC $\gamma$ , las señales de calcio (naranja) llevan a la activación de NFAT, mientras que DAG (verde) es necesario para la activación de PKC $\theta$  y NF- $\kappa$ B. La activación de Ras y Rac (azul) llevan a la activación de AP-1. Estos factores de transcripción cooperan entre sí durante la activación de varios genes. Figura modificada de Sieber (2009)<sup>7</sup>.

### Fenotipo efector

Tras la activación, las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes pueden diferenciarse en varios tipos de fenotipos efectores, los cuales tienen la capacidad de producir citocinas específicas para promover varios tipos de respuestas inmunitarias. Existen cuatro tipos principales de células T efectoras: Las células Th1, encargadas de coordinar la eliminación de patógenos intracelulares, las células Th2, que se encargan de la

eliminación de helmintos y las células Th17, que coordinan la eliminación bacterias y hongos extracelulares. Las células T reguladoras (Treg) son otro importante subtipo celular que pueden adquirir los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las cuales tienen la capacidad de regular y suprimir la respuesta inmune<sup>2,8</sup>.



**Figura 3.** Diferenciación de las células T CD4. Al recibir las señales de activación las células T CD4 vírgenes se diferencian a subconjuntos efectoras (Th1, Th2, Th17, Treg). Cada fenotipo efector se caracteriza por su producción de citoquinas, expresión de factores de transcripción y receptores de quimiocinas, y regular una respuesta inmune específica. Figura creada con biorender, con la información de la revisión de Nurieva (2010)<sup>9</sup>.

### Metabolismo en células T

La activación, proliferación y diferenciación del linfocito T se combinan con cambios profundos en el metabolismo celular (reprogramación metabólica). Diversos estudios han mostrado que algunas variantes metabólicas específicas están

asociadas con distintos subconjuntos de células T, pueden ser auxiliares a su diferenciación e influir en sus funciones inmunológicas. El "efecto Warburg", originalmente usado para describir un fenómeno en el que la mayoría de las células cancerosas dependían de la glucólisis aeróbica para su crecimiento, es un proceso clave que sustenta la activación y diferenciación de las células T<sup>10</sup>.

Las células T hacen una transición rápida entre estados catabólicos en reposo (células T vírgenes y de memoria) a uno de crecimiento y proliferación (células T activadas y efectoras) durante la inmunidad normal<sup>11,12</sup>.

El compromiso de una célula inmune a un metabolismo específico depende de la función particular que va a adquirir. Esto queda en evidencia en los fenotipos efectoras de las células cooperadoras, donde las células T efectoras dependen de la glucólisis aeróbica, mientras que las células T vírgenes, de memoria y reguladoras (Treg) dependen de la oxidación de ácidos grasos para producir energía y precursores (figura 4B)<sup>13</sup>.

### **La glucosa es una fuente importante de energía en las células inmunes.**

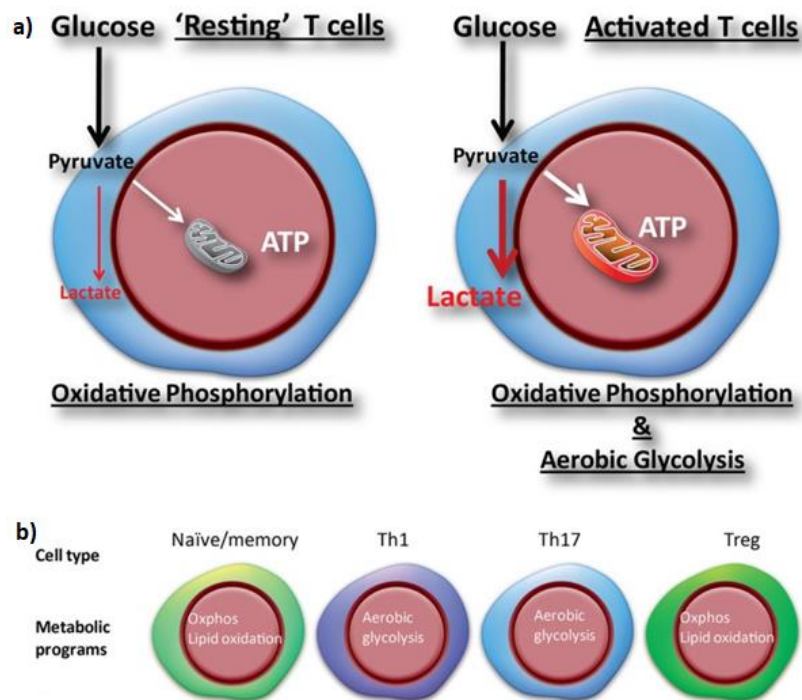
Tras el encuentro con el antígeno, las células T aumentan la captación de glucosa, debido a una mayor expresión del transportador de superficie celular Glut1 (Glucose transporter 1)<sup>14,15</sup>. En paralelo, aumenta la excreción de lactato, debido a que el piruvato se convierte a lactato en lugar de oxidarse a través de la vía del ácido tricarboxílico (TCA), lo cual es conocido como glucólisis aeróbica o efecto Warburg. El efecto Warburg fue descrito en células cancerosas, se postulaba que esto se debía a una deficiencia mitocondrial. Sin embargo, ahora se sabe que esto se debe al requerimiento metabólico de células que están proliferando rápidamente, acelera la obtención de esqueletos carbonados producidos durante la glucólisis en vez de aumentar la producción de ATP. Además, la reducción de piruvato a lactato genera NAD<sup>+</sup>, requerido para la función de las enzimas glucolíticas (GAPDH)<sup>16</sup>.

A través de un paso limitante catalizado por la hexoquinasa, la glucosa queda atrapada dentro del citosol de las células donde a través de 10 reacciones

enzimáticas se metaboliza a piruvato. Durante este proceso, cada molécula de glucosa se rompe en piruvato con una producción neta de dos moléculas de ATP y dos moléculas de  $\text{NADH}_2$ . Durante la glucólisis se producen múltiples moléculas intermediarias para la biosíntesis de ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos requeridas para células que están proliferando rápidamente después de la activación<sup>16</sup>.

La captación de glucosa y la glucólisis aeróbica se utilizan preferentemente para generar energía en células T  $\text{CD4}^+$  efectoras (Th1, Th2 y Th17), mientras que las células T vírgenes y las células T  $\text{CD4}^+$  reguladoras (Tregs) son más dependientes de oxidar completamente el piruvato a través de la vía del ácido tricarboxílico (TCA) para generar  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ , el cual es el combustible para la fosforilación oxidativa, produciendo hasta 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa<sup>17,18</sup>.

Se puede observar un esquema del metabolismo de la glucosa en linfocitos T  $\text{CD4}^+$  en la figura 4.



**Figura 4.** Metabolismo de la glucosa en linfocitos T  $\text{CD4}^+$ . a) Tras la activación, las células T incrementan la absorción de glucosa a través de GLUT1, el cual facilita el aumento de la fosforilación oxidativa y la glucólisis. b) Los cambios metabólicos

únicos tras la diferenciación de las células T son regulados por diversos factores de transcripción y vías de señalización. Figura tomada de la revisión de Palmer *et al.*<sup>10</sup>

### **El TLR5 como receptor coestimulador en linfocitos T**

Los linfocitos T presentan múltiples proteínas de membrana, que potencialmente pueden generar señales de co-estimulación. Entre los que se han reportado están receptores tipo Toll, que pueden reconocer partes de antígenos que viajan a través de la linfa.

Los receptores tipo Toll (TLRs) constituyen una familia de receptores que reconocen firmas moleculares de patógenos (PAMPs, Pathogen associated macromolecular patterns) o moléculas de daño celular (DAMPs damage associated molecular patterns). Los humanos expresan diez diferentes TLRs (TLR1-10). Cada TLR puede reconocer una diferente clase de componentes que son requeridos para el crecimiento y/o supervivencia del patógeno. El TLR5 reconoce a la flagelina, un componente del flagelo de las bacterias móviles. Los receptores tipo Toll tienen una región exterior que contiene muchas repeticiones ricas en leucinas (LRR), un dominio transmembranal y un dominio interior llamado dominio TIR. La unión del TLR a su ligando es específico a un grupo de moléculas similares, únicas de un grupo de patógenos, y desencadena una cascada de reacciones a partir del dominio TIR, por medio de dos vías de señalización: la vía dependiente de MYD88 y la vía independiente de MYD88, las cuales permiten la activación de factores nucleares que participan en la respuesta inmune<sup>2,3</sup>. La mayoría de los estudios que examinan funciones mediadas por TLRs están centrados en las APC, donde se ha reportado que, al identificar al patógeno, los ligandos de TLRs generan una respuesta inflamatoria estimulando la producción de citocinas, aumento de la superficie de receptores coestimuladores y maduración celular<sup>5</sup>. Sin embargo, las células T también expresan TLRs y responden a sus ligandos<sup>19-21</sup>. La activación simultánea de TLR2<sup>20</sup> o TLR5<sup>20,22</sup> conduce a la coestimulación de la activación y proliferación mediada por el TCR, la expresión de receptores de superficie y la liberación de citocinas. En este proyecto nos enfocaremos en el TLR5 como molécula accesoria en los linfocitos T y su papel en la expresión de genes importantes para estos<sup>23,24</sup>.

Previamente, en el laboratorio publicamos el papel del TLR5 como receptor coestimulador en los linfocitos T CD4 de adultos humanos, en los cuales promueve la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1, tal como se observó a nivel de fosforilación mediante citometría de flujo<sup>22</sup>.

Interesantemente, en resultados preliminares del laboratorio donde se evaluó la expresión de varios TLRs, se identificó al TLR5 como el TLR más expresado en linfocitos T totales de neonatos y adultos humanos a nivel de mensajero (tesis de licenciatura de Rodríguez- Jorge 2011). Además, se verificó la sobreexpresión de TLR5 en linfocitos T CD8 neonatales a nivel de proteína<sup>25</sup>.

### **Inmunidad neonatal**

Pese a los avances en medicina y tecnología, aproximadamente 2.4 millones de niños murieron en su primer mes de vida en el 2020, en el mundo<sup>26</sup>. Las muertes por infección constituyen un 23% en las muertes neonatales mundiales<sup>27</sup>.

Aunque el sistema inmune de un recién nacido a término (después de 37 semanas) permite algo de protección contra enfermedades infecciosas, los recién nacidos tienen una respuesta deficiente para una gama de patógenos y vacunas, resultando en una alta susceptibilidad a enfermedades graves<sup>2</sup>.

En el útero, los fetos tienen una exposición limitada a antígenos para inducir la inmunidad adaptativa. Por esto, se cree que los neonatos son muy dependientes de su sistema inmune innato y de los anticuerpos maternos para la protección contra infecciones. Las infecciones por patógenos intracelulares suelen ser más graves y prolongadas en los neonatos que en los adultos. Esto sugiere que las respuestas inmunes mediadas por células T son diferentes en etapas tempranas de la vida<sup>2</sup>.

Se ha reportado que las células T CD4<sup>+</sup> de cordón umbilical (CB) presentan una baja producción de citocinas, en particular la citocina firma del fenotipo Th1, IFN- $\gamma$ , en comparación con células de sangre periférica de adulto (APB). Asimismo, las APC de neonatos producen menos IL-12, que también se requiere para la diferenciación Th1. En cambio, la producción de la citocina IL-13 del perfil Th2 y las



citocinas inmunosupresoras están aumentadas en las células neonatales, que son también más propensas a la anergia y a entrar en apoptosis<sup>28,29</sup>.

Se ha propuesto la búsqueda de adyuvantes para vacunas y la activación de otros receptores que puedan fungir como coestimuladores, que puedan ayudar a mejorar la respuesta inmune de los neonatos. Entre los posibles adyuvantes para vacunas que actualmente se investigan se encuentran varios ligandos de los receptores tipo toll (TLRs). Estudios *in vitro* en células T humanas, tanto de nuestro grupo como de otros, apoyan fuertemente la hipótesis de que la flagelina puede estimular y coestimular directamente a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup><sup>30,31</sup>.

### **Sistema inmunológico de neonatos nacidos por cesárea**

El parto por cesárea es un procedimiento que salva vidas y reduce el riesgo de morbilidad y mortalidad materna e infantil cuando esté médicamente indicado<sup>32</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que dicho método no supere el 15% de los nacimientos del país<sup>33,34</sup>. Para el 2017, México ya tenía un elevado número de cesáreas, correspondientes a un 45.3% de los nacimientos<sup>35</sup>. Sin embargo, de acuerdo con datos preliminares del subsistema de información sobre nacimientos (SINAC) de la Secretaría de Salud, en el 2020 en México el número de nacimientos por cesárea superó a los partos naturales y llegó a ser más del 50%, Figura 5<sup>36</sup>.



**Figura 5.** Cantidad de cesáreas y partos naturales realizados en México. El eje horizontal (X) representa los primeros seis meses del año 2020, mientras que el eje vertical (Y) muestra el número de nacimientos. Se destaca que, según datos preliminares de 2020, las cesáreas (representadas por la línea verde) superaron en número a los partos naturales (línea rosa) en México. Imagen tomada del artículo en línea de Arteta con datos de la SINAC<sup>36</sup>.

Diversos estudios muestran que los niños nacidos por cesárea también pueden experimentar mayor riesgo de presentar problemas de salud en el futuro<sup>37</sup>, incluyendo diabetes tipo 1<sup>38</sup>, alergias y asma<sup>39,40</sup>, esclerosis múltiple<sup>41</sup> y trastornos inmunitarios crónicos<sup>42,43</sup>. Sin embargo, poco se conoce aún sobre los linfocitos T de los niños nacidos por cesárea.

### **Sistema inmunológico de neonatos de pretérmino**

Dentro de la población neonatal, los neonatos prematuros o pre-término (parto antes de las 37 semanas de gestación) tienen la tasa más elevada de mortalidad y una alta morbilidad. Entre las causas de muerte de estos neonatos están las infecciones graves y estados inflamatorios como sepsis y colitis necrosante. Lo cual indica que

los neonatos pre-término tienen un sistema inmunológico con características diferentes a los neonatos nacidos a término, dejándolos en una elevada vulnerabilidad<sup>44</sup>. Se ha reportado que los neonatos pre-término tienen una alta producción de IL-5 (Th2) y una baja producción de IFN- $\gamma$  (Th1)<sup>45</sup>. Además de presentar un aumento en la población de células T reguladoras. Sin embargo, mucho queda por describirse sobre el sistema inmune de los neonatos prematuros.

## Antecedentes:

En nuestro laboratorio se ha avanzado en el estudio de los linfocitos T de neonatos humanos. En un estudio previo del perfil de expresión génica de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se encontró que el transcriptoma de estas células revela la sobreexpresión de genes asociados con una alta tasa de proliferación, baja capacidad citotóxica y elevada producción de mediadores de inmunidad innata<sup>25</sup>.

Asimismo, encontramos que las células T CD8<sup>+</sup> neonatales pueden activarse a un fenotipo similar al de las células T CD8<sup>+</sup> de adulto en presencia de señales de IL-12<sup>46</sup>.

En tanto al metabolismo, en el transcriptoma se encontró que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> sobreexpresan genes relacionados con la glucólisis. Adicionalmente, en un estudio en linfocitos T CD8<sup>+</sup> neonatales se identificó una elevada proporción de ROS mitocondrial, en comparación con su contraparte de adultos, lo cual pudiera afectar su activación, tal como lo predijimos en un modelo lógico<sup>47</sup>.

En la búsqueda de potenciales moléculas que pudieran mejorar la activación de los linfocitos T neonatales, exploramos la función del TLR5. Primero encontramos que es el TLR que más se transcribe en linfocitos T de adultos y neonatos humanos<sup>48</sup> y que su expresión es similar en células T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos humanos<sup>49</sup>, mientras que se sobreexpresa en células T CD8<sup>+</sup> neonatales<sup>25</sup>. Las señales a través de TLR5 llevan a la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 en linfocitos T de adultos y neonatos<sup>22,50</sup>. También se demostró que la flagelina induce la producción de IFN $\gamma$  en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales<sup>51</sup> y un modelo lógico validado

experimentalmente permitió observar que las señales a través de TLR5 pueden conferir señales de co-estimulación a los linfocitos T. Durante mi proyecto de licenciatura y maestría evaluamos la activación de los tres factores transcripcionales: AP-1, CREB y NF- $\kappa$ B mediada por el estímulo del TCR/CD28 y el TCR/TLR5 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y de neonatos<sup>52</sup>. En general, la activación mediante ambos estímulos indujo la activación de AP-1, NF- $\kappa$ B y CREB a niveles comparables. Por otra parte, mediante la generación y el análisis de modelos computacionales para el TCR/CD28 y el TLR5, se encontró que CD28 y TLR5 emplean vías independientes para llegar a la activación de los factores transcripcionales anteriormente mencionados<sup>22</sup>. Por todo lo anterior, proponemos que el TLR5 es una vía de coestimulación alternativa a la de CD28, cuyo potencial no ha sido ampliamente explorado.

En este trabajo activamos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes de adultos y neonatos mediante el TCR y CD28 o mediante el TCR y el receptor tipo Toll 5 (TLR5), para evaluar si este pudiera sustituir las señales de moléculas co-estimuladoras tradicionales como CD28 (segunda señal). En la primera parte de mi trabajo (Capítulo 1), comparamos la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> de adultos jóvenes y neonatos en estado basal y estimulados con TCR/CD28 o con TCR/TLR5, determinando su perfil de expresión génica mediante análisis transcriptómicos, Figura 6A.

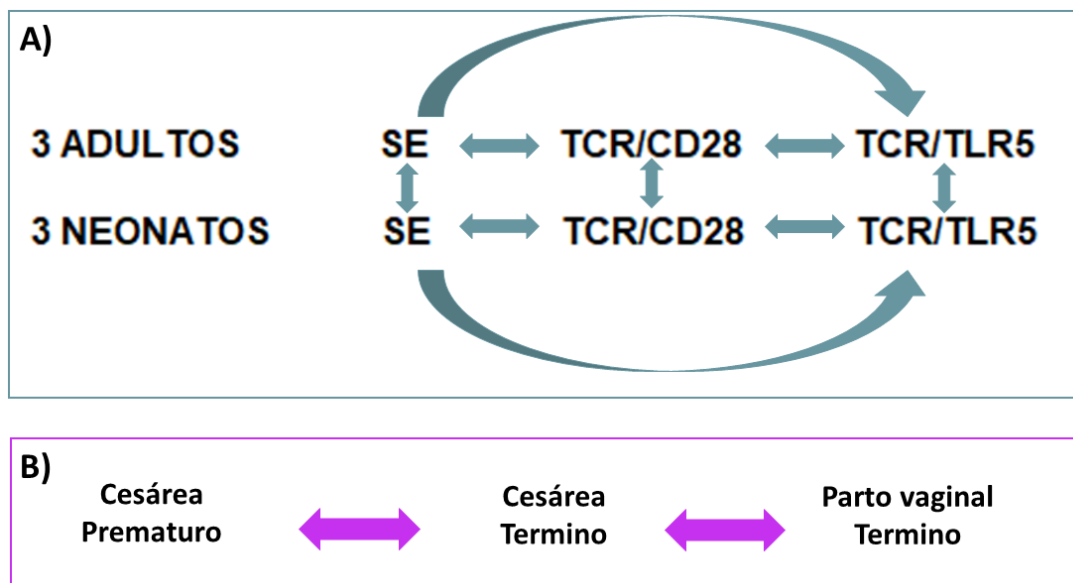
En la segunda parte de mi trabajo (Capítulo 2), analizamos el perfil de expresión génica de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes de neonatos de término nacidos por parto vaginal, neonatos de término nacidos por cesárea y neonatos de pre-término, también nacidos por cesárea, Figura 6B.

## Objetivo general:

### Objetivo

Caracterizar el perfil de expresión génica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos humanos a nivel basal y activados por el TCR/CD28 en presencia o ausencia de flagelina para determinar los mecanismos moleculares subyacentes a la función de las células neonatales. Además, determinar el papel del tipo de nacimiento y la edad gestacional en el perfil de expresión génica a nivel basal.

En la siguiente figura 6 se grafican las comparaciones que serán realizadas.



**Figura 6.** Gráfica de comparaciones del transcriptoma de linfocitos T CD4<sup>+</sup> del capítulo 1 (A). Se obtuvo el transcriptoma de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos a nivel basal y estimulados (TCR/CD28 o TCR/TLR5) y se encontraron los GDE en todas las comparaciones que se muestran en la imagen. Gráfica de comparaciones del transcriptoma de linfocitos T CD4<sup>+</sup> del capítulo 2 (B). Se obtuvo el transcriptoma de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos a nivel basal, nacidos por cesárea a término (mayor a 37 semanas de gestación), cesárea prematuros (menor a 37 semanas de gestación), o parto natural de término (mayor a 37 semanas de gestación) y se encontraron los GDE en todas las comparaciones que se muestran en la gráfica.

### **Objetivos particulares:**

1. Comparar el transcriptoma de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos en estado basal y después de la activación por el TCR/CD28 y por TCR/TLR5.
2. Identificar las vías de señalización importantes según los genes diferencialmente expresados en células de neonato y adultos activados.
3. Validar la expresión a nivel de proteína de algunos genes diferencialmente expresados en células de neonato y/o adulto.
4. Comparar el transcriptoma de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos de término nacidos por parto natural y cesárea, y prematuros, en estado basal.
5. Identificar los genes y las vías de señalización diferentes entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos de término nacidos por parto natural y por cesárea, y prematuros.

## **Materiales y métodos**

### **Purificación y estimulación celular**

Se recolectó sangre de la vena del cordón umbilical de recién nacidos sanos a término, nacidos por parto vaginal en el Hospital General Parres (Cuernavaca, Morelos, México), con el consentimiento informado de las madres y aprobación ética del hospital (CONBIOÉTICA-17-CEI-001-20160329). Las células de adulto se obtuvieron a partir de concentrados leucocitarios obtenidos del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, Cuernavaca. El permiso para utilizar muestras de sangre fue otorgado por Servicios de Salud Morelos, mediante el establecimiento de un convenio oficial (Expediente 1372/1706). Para asegurar que la sangre del cordón represente la sangre del bebé, obtuvimos las muestras antes de la expulsión de la placenta, para evitar la mezcla con la sangre de la madre y la presencia de factores de coagulación, que cambia la proporción de las células y el suero en las muestras.

Además, se realizó la evaluación rutinaria de la pureza de todas las muestras y la ausencia de células CD45RO+ para garantizar que no se produjera contaminación con la sangre de la madre.

Las muestras se procesaron el mismo día para obtener células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Lymphoprep (Axis-Shield; Dundee, Reino Unido). Los linfocitos T CD4+ se aislaron a partir de células mononucleares utilizando el cóctel de enriquecimiento de linfocitos T CD4+ RosetteSep (STEMCELL), con 5 ml de eritrocitos de la misma muestra de sangre (que se mantuvieron en cultivo durante un día), los cuales se utilizaron en un segundo gradiente de densidad. Las células de memoria y efectoras de sangre de adultos, fueron eliminadas con perlas magnéticas (Pierce) acopladas a anticuerpos anti-CD45RO (UCH-L1, TONBO biosciences; California, EE. UU.) y anti-CD44 (IM7, TONBO biosciences; California, EE. UU.). Las células naive de neonatos y adultos se cultivaron en medio RPMI (Thermo Fischer Scientific; Massachusetts, EE. UU.), suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 5 %, glutamina al 1 % y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) a 37 °C. C y 5% de CO<sub>2</sub>. La pureza de nuestras poblaciones de células CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> fue de al menos el 95 %, utilizando CD4 (20-0048-T100, TONBO biosciences) y CD3 (20-0037-T100, TONBO biosciences) como marcadores de pureza y CD45RO como marcador de memoria.

### **Preparación y secuenciación de ARN**

El ARN se preparó utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, EE. UU. 15596-018, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizó la integridad del ARN purificado con un kit de nano-ARN Bioanalyzer (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, EE. UU.) y solo se usaron muestras con un valor de integridad (RIN) superior a 8,0. Todas las muestras fueron procesadas, las librerías fueron generadas y se realizó la secuenciación en la plataforma de secuenciación del TAGC (TGML; Transcriptomic and Genomic Platform Marseille Luminy), en Francia, utilizando NextSeq-500 Sequencer Illumina (20-120Gb).

## **Análisis de los datos de RNA-seq**

### **Concepto RNA-seq:**

El RNA-Seq es un método de secuenciación masiva (NGS) de RNA que permite analizar el transcriptoma, es decir, el conjunto de moléculas de RNA mensajero transcritas. El análisis del transcriptoma nos da información sobre las muestras al permitirnos conocer el nivel de expresión de los genes, así como el uso preferencial de exones de un mismo gen (splicing alternativo) que da a lugar a distintas isoformas de una misma proteína.

El proceso de trabajo del RNA-Seq se basa, en primer lugar, en convertir un conjunto de RNA mensajeros en una librería de fragmentos de cDNA con adaptadores en uno o ambos extremos. Mediante las tecnologías de secuenciación masiva, se obtienen pequeñas secuencias de nucleótidos, llamadas *reads*, que corresponden a cada fragmento de la librería de fragmentos de cDNA obtenida. El número de *reads* varía en función de la expresión de un determinado gen, es decir, si un gen se expresa más, tendrá más cDNA y, por tanto, es más probable que tenga un mayor número de *reads*<sup>53</sup>.

La calidad de los datos se evaluó mediante el programa FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Los adaptadores y las lecturas de baja calidad se cortaron con Trimmomatic<sup>54</sup> versión 0.39 con los siguientes parámetros: “ILLUMINACLIP:Truseq3-SE:2:30:10 TRAILING:3 MINLEN:40”. Las lecturas se alinearon contra el transcriptoma de referencia GRCh38/hg38, utilizando el software STAR 2.4.2<sup>55</sup> con los siguientes parámetros: “runMode alignReads -outSAMtype BAM SortedByCoordinate -outFilterMultimapNmax 1”. Los archivos BAM (Binary Aligment Map) generados por alineación se visualizaron en regiones de interés con IGV<sup>56</sup>. El conteo de lecturas por gen se obtuvo utilizando el software HTSeq-count<sup>57</sup>. Para identificar los genes expresados diferencialmente (DEG), usamos la paquetería DESeq2 en R (Bioconductor)<sup>58</sup>. Para lo cual, se consideró un valor de p ajustado < 0,05 y un



$\log_2\text{foldchange} \geq |1|$ . Estos genes se utilizaron para la anotación funcional e identificación de las vías sobrerrepresentadas (enriquecidas). Para identificar las vías sobreexpresadas, usamos la paquetería ClusterProfiler<sup>59</sup> en R, usando la función EnrichKEGG, y las rutas de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Las vías enriquecidas se visualizaron utilizando la función enrichplot<sup>60</sup>.

## **Citometría de flujo**

Se purificaron células T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos y se evaluó la expresión a nivel de proteína de algunos genes sobreexpresados en células neonatales, usando anticuerpos específicos.

Se evaluó una selección de genes expresados diferencialmente mediante citometría de flujo con anticuerpos dirigidos a BCL11A (MA5-34678, Thermofisher), CEBP-alfa (aEbs-1630R, Thermofisher), GLUT1 (sc-377228 AF790, Santa Cruz Biotechnology), HOXA3 (PA5- 56077, Thermofisher), HOXA9 (PA5-102516, Thermofisher), INSR (sc-57342 AF790, Santa Cruz Biotechnology), DUSP6 (MA5-31988, Thermofisher), junto con el anticuerpo secundario Cabra anti-Conejo IgG FITC (35-8067, TONBO). La expresión de proteínas se evaluó en un citómetro Attune (Life Technologies) y se analizó utilizando el software Flow-Jo X.

## **Evaluación de la proliferación y activación temprana en respuesta a señales TCR/CD28 y TCR/TLR5.**

Para los ensayos de división celular, las células mononucleares de recién nacidos y adultos se dejaron sin tratar o se activaron entrecruzando las moléculas CD3 (70-0037-U100, TONBO) y CD28 (70-0289-U100, TONBO) con un anticuerpo secundario dirigido contra las regiones Fc (Goat Anti-Mouse Anticuerpo IgG (H+L) bs-0296G, Bioss Antibodies). Las células T CD4<sup>+</sup> en división se identificaron específicamente mediante una doble tinción con CFSE (21888, Sigma) 50 nM y CD4-PerCP-Cyanine 5.5 (65-0048-T100, TONBO). La dilución de CFSE en la población (gate) CD4<sup>+</sup> se midió después de la incubación, durante 96h, en un

citómetro Attune (Life Technologies) y se analizó con el Flow-Jo X.

La respuesta de activación temprana de las células T CD4<sup>+</sup> neonatales y de adulto se evaluó mediante el análisis del transcriptoma de las mismas células, después de entrecruzar CD3 y CD28 con un anticuerpo secundario, IgG anti-ratón de cabra (H+L) (bs-0296G, Bioss Antibodies), durante 6 h. La estimulación de TLR5 se realizó con el monómero FliC de la flagelina (FLA-ST ultrapure, InvivoGen) a una concentración de 250 ng/ml, junto a la estimulación del TCR con anti-CD3. Las muestras se mandaron a secuenciar como como se indicó anteriormente.

## **Capítulo 1. Expresión génica en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos humanos en estado basal y en respuesta a señales de activación.**

Para ganar información sobre las características y funciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales, decidimos hacer un análisis de transcriptoma comparando a las células vírgenes obtenidas de sangre de cordón umbilical con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes de la sangre de adultos jóvenes en estado basal. Adicionalmente, estimulamos por 6 horas a las células purificadas, mediante el entrecruzamiento de CD3 y CD28 o CD3 y flagelina, para evaluar la respuesta temprana de estos linfocitos.

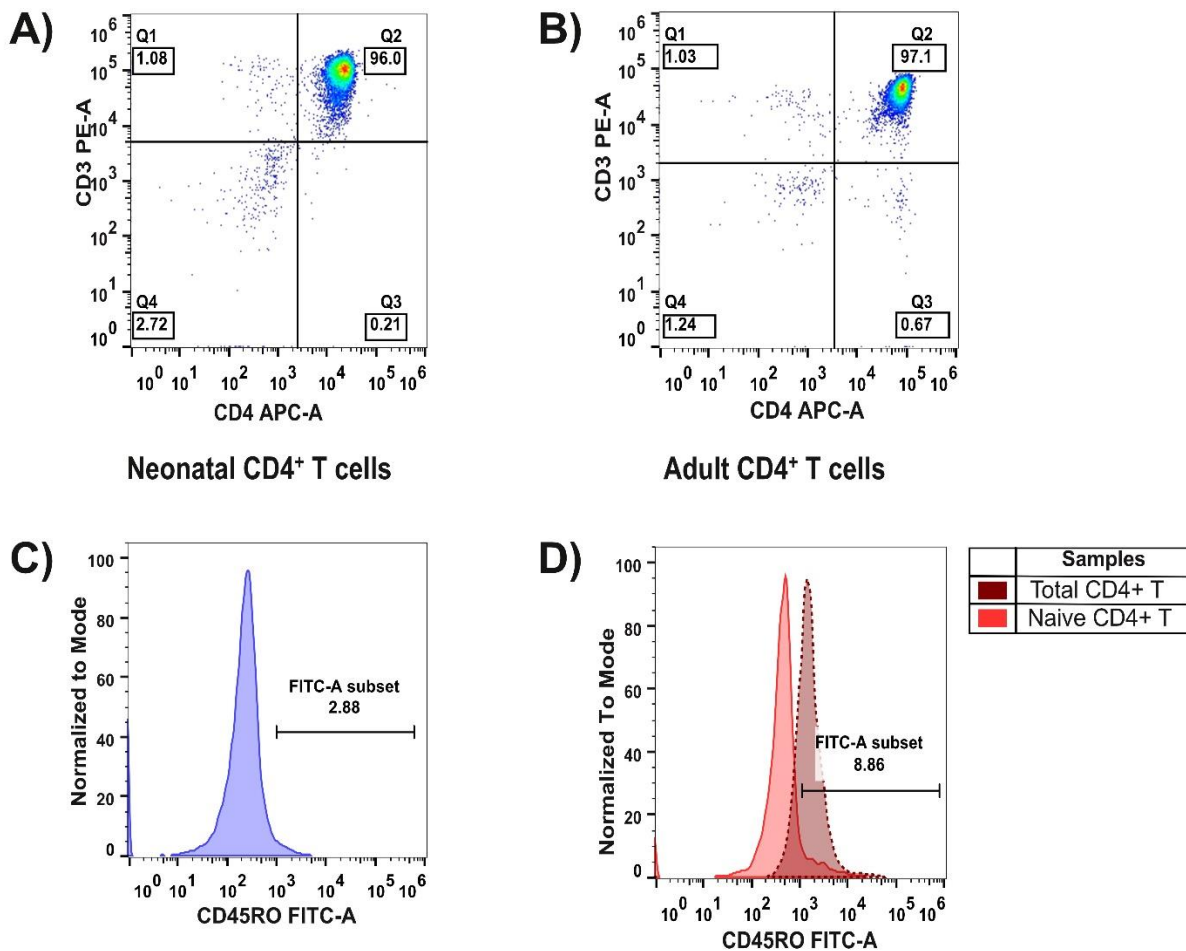
### **Purificación celular**

Primeramente, se realizó la purificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes de neonatos y adultos humanos a partir de sangre de cordón y concentrados leucocitarios, respectivamente. La pureza de cada muestra fue evaluada a través de citometría de flujo, mediante tinciones de membrana para los marcadores CD3 y CD4, usando anticuerpos monoclonales anti-CD3-PE (BL2) y anti-CD4-APC (RL1). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> obtenidos tuvieron una pureza mayor al 95%, con un promedio del 97%. En la Figura 7 se muestra una imagen representativa de la pureza obtenida en un adulto (7A) y un neonato (7B).

Los neonatos sanos, al momento de nacer, aún no se han enfrentado a ningún reto inmunológico, por lo tanto no han desarrollado linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria. En nuestro estudio se buscó comparar linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes de adultos y neonatos. Por lo tanto, para las muestras de adulto se llevó a cabo la eliminación de las células de memoria mediante el uso de perlas magnéticas acopladas a anti-CD45RO. Para medir la eficiencia con la que se eliminaron los linfocitos de memoria, se tiñó con el marcador de memoria anti-CD45RO (FITC). Por otro lado, las células neonatales presentaban contaminación de células negativas para CD3, que marca a todos los linfocitos T, por lo que se decidió eliminar CD11b, que marca células mieloides, tanto precursoras como maduras, y células NK. Esto permitió aumentar

la pureza de nuestras poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> neonatales y que los pasos de purificación de células neonatales y de adultos fueran equivalentes.

En la Figura 7D se muestra la expresión de CD45RO en linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales y en linfocitos CD4<sup>+</sup> vírgenes, se encontró una expresión de este marcador por debajo del 5% en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes de adulto, con una intensidad media de fluorescencia baja. Las células neonatales son negativas para CD45RO, Figura 7C.



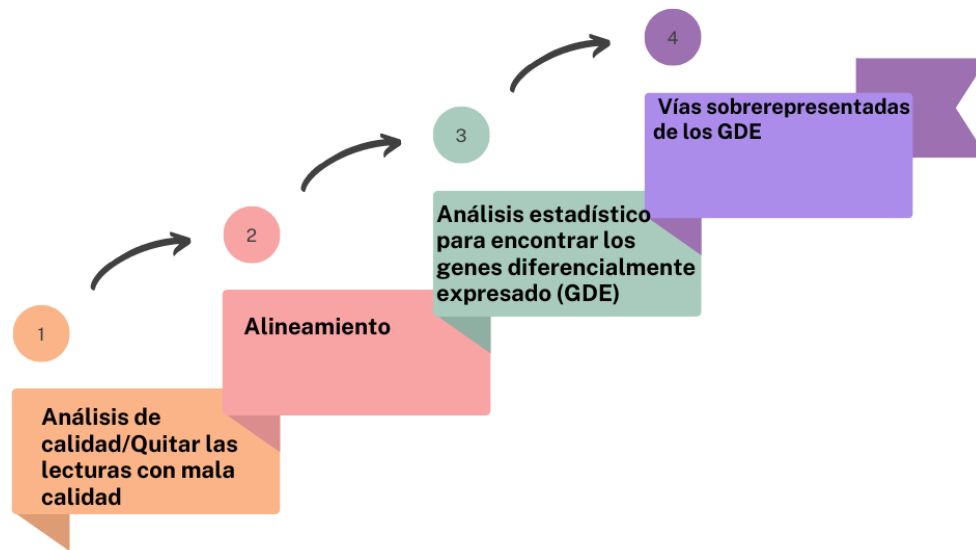
**Figura 7. Purificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos.** Se muestra la pureza (imagen representativa) de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de un adulto A) y un neonato B). En el eje X se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula CD4 acoplado a APC y en el eje Y se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula CD3 acoplado a PE. C) Histogramas de CD45RO acoplado a FITC de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adulto (rosa) antes de realizar la eliminación

de células de memoria y después de su eliminación (rojo), se logra apreciar la eliminación de las células de memoria. Los datos se adquirieron en un citómetro (Attune™ Nxt Acoustic Focusing Flow Cytometer) y se analizaron en el software FlowJo versión X. En total, 14 muestras de neonatos y 12 muestras de adultos fueron purificadas a linfocitos CD4<sup>+</sup>.

### **Transcriptoma de las células T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos.**

La evaluación del transcriptoma de las células T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos se realizó mediante la técnica de RNA-seq. Para lo cual, se obtuvieron 3 muestras biológicas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y 3 muestras de neonatos a nivel basal y las mismas muestras estimuladas durante 6 horas con anti-CD3/anti-CD28 o anti-CD3/Flagelina. Las muestras se guardaron en trizol y se mandaron a secuenciar a la unidad de secuenciación (Transcriptomic and Genomic Platform Marseille Luminy), en Francia. En la plataforma se evaluó la integridad del RNA en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent), sometándose a secuenciación sólo las muestras con una integridad (RIN) mayor a 8. Se realizaron las librerías con el kit single-end TruSeq mRNA (Illumina) y se secuenciaron usando el equipo NextSeq-500 Sequencer de Illumina.

Se obtuvieron 18 datos de RNA-seq, los cuales se fueron analizando mediante el siguiente flujo de trabajo (Figura 8).

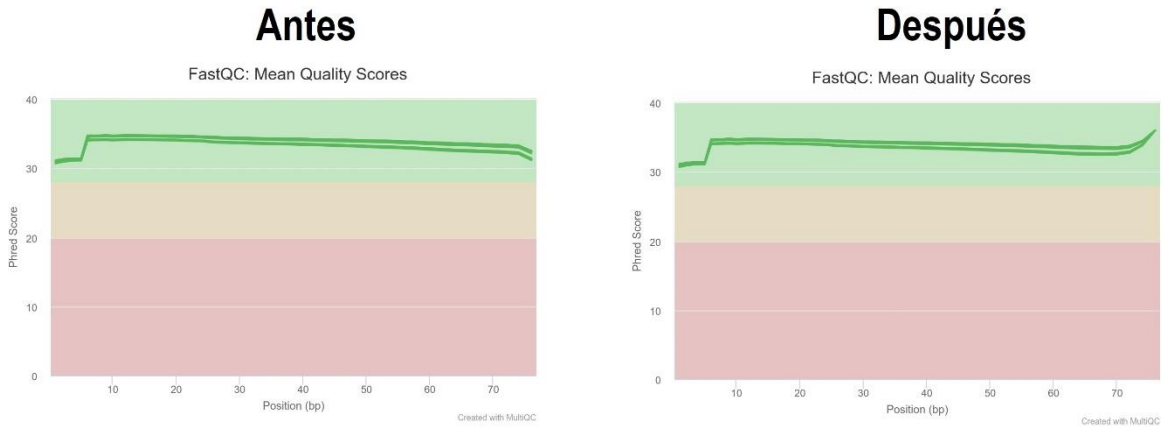


**Figura 8. Flujo de trabajo para el análisis de los datos de RNA-seq.** 1. Se realizó el análisis de calidad de los datos crudos con el programa FASTQC y se quitaron las lecturas de mala calidad y las secuencias de los adaptadores con el programa de trimmomatic. 2. Se realizó el alineamiento de las lecturas utilizando el programa STAR y el conteo de las lecturas se realizó con el programa Htseq-count. 3. Con el uso de los datos de conteo se realizó el análisis de genes diferencialmente expresados utilizando la paquetería de DESeq2 en R. 4. Con los GDE expresados se realizó la anotación funcional usando EnrichKEGG.

### **Análisis de calidad**

Se realizó el análisis de calidad de los datos crudos (archivos FASTQ) con el programa de FASTQC y se generó un reporte con MultiQC. Se seleccionaron los parámetros necesarios para mejorar la calidad y eliminar posibles secuencias de adaptadores, para lo cual se utilizó el programa de trimomatic. Posteriormente se realizó un reporte de todos los datos con el programa MultiQC antes y después de mejorar la calidad. El análisis de la calidad de secuencia por base se muestra en la Figura 9.

Adicionalmente, se verificó que la calidad de los datos fuera buena de acuerdo con todos los parámetros medidos por FASTQC.



**Figura 9. Calidad de los datos de RNA-seq.** A) Análisis de calidad de los datos crudos y b) análisis de calidad de los datos procesados con trimmomatic. El eje Y proporciona las puntuaciones de calidad (score Phred), mientras que el eje x representa la posición en la lectura. El código de colores de la gráfica denota lo que se considera puntuaciones de calidad alta (verde), media (naranja) y baja (Roja). Podemos notar que los datos crudos ya tenían una alta calidad y esta mejoró después de ser procesados con trimmomatic.

### Alineamiento y conteo

Una vez que los datos fueron procesados, tuvieron una muy buena calidad y se eliminaron las secuencias de los adaptadores, las lecturas se alinearon al genoma de referencia mediante el uso del programa STAR. Se encontró que la mayoría de las muestras tuvo valores arriba de un 70% de alineamiento, lo cual se muestra en la figura 9, a excepción de la muestra A1\_3 que obtuvo un alineamiento del 66.19%. Se decidió no descartar la muestra con menor calidad y ver cómo se agrupaba en posteriores análisis.

## ADULTOS

Condiciones	% Alineamiento
A1_1 (SE)	74.08 %
A3_1 (SE)	85.01 %
A4_1 (SE)	82.73 %
A1_2 (cd3 + cd28 )	81.98 %
A3_2 (cd3 + cd28 )	85.56 %
A4_2 (cd3 + cd28 )	89.57 %
A1_3 (cd3 + Flag )	<b>66.19 %</b>
A3_3 (cd3 + Flag )	86.24 %
A4_3 (cd3 + Flag )	83.74 %

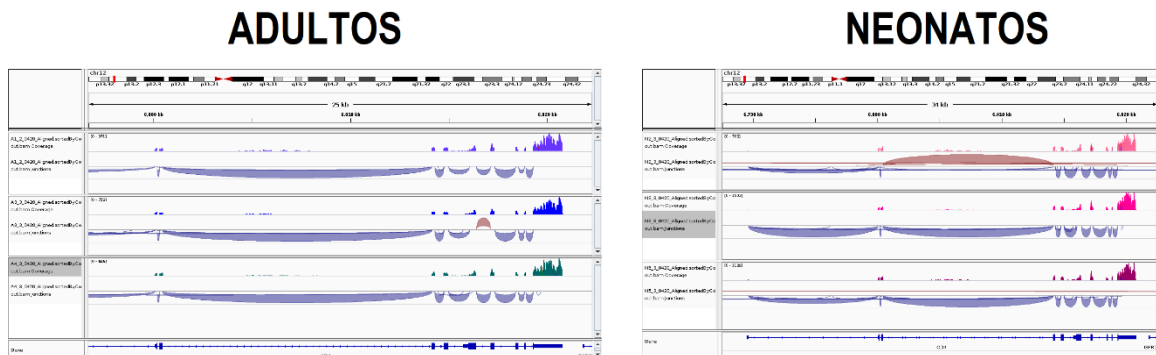
## NEONATOS

Condiciones	% Alineamiento
N2_1 (SE)	86.45 %
N3_1 (SE)	88.35 %
N5_1 (SE)	87.35%
N2_2 (cd3 + cd28 )	86.23 %
N3_2 (cd3 + cd28 )	86.45 %
N5_2 (cd3 + cd28 )	85.91 %
N2_3 (cd3 + Flag )	86.84 %
N3_3 (cd3 + Flag )	88.07 %
N5_3 (cd3 + Flag )	86.78 %

**Figura 10. Porcentaje de alineamiento de los datos de RNA-seq.** Se muestran los porcentajes de alineamiento de cada muestra secuenciada de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en estado basal (SE), estimulados (CD3/CD28 o CD3/TLR5) de adultos (A) y neonatos (N). La mayoría de las muestras tienen un alineamiento mayor al 74%, solo encontramos una con un bajo alineamiento.

## Visualización de IGV de regiones importantes

Al realizar el alineamiento se generó un archivo BAM (Binary Aligment Map), el cual fue visualizado en IGV en regiones cromosómicas correspondientes a genes de interés, para corroborar un correcto alineamiento. A continuación, se muestra una imagen representativa de los datos de adultos y neonatos en la Figura 11, en donde se observó un correcto alineamiento para el gen CD4.



**Figura 11. Visualización de genes con IGV.** Se muestra el alineamiento del gen



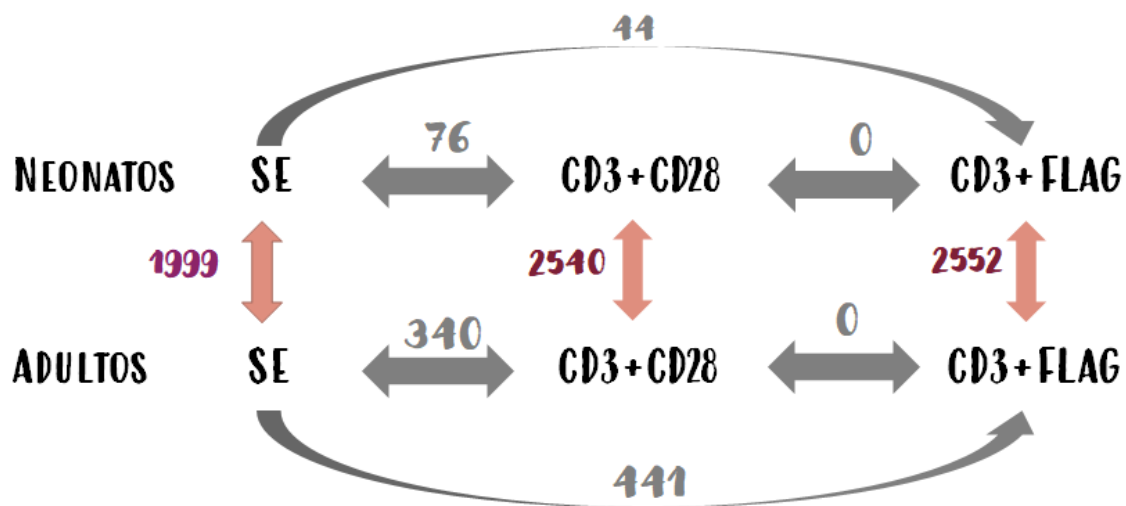
CD4 en el IGV, usando los archivos BAM de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos.

### Conteo de lecturas (reads) por gen

Se contaron las lecturas (reads) por gen de cada muestra, utilizando el archivo bam, que se generó del alineamiento con STAR y el GTF de referencia. Para esto se utilizó la herramienta de HTSeq-Count, la cual permite realizar un conteo de las lecturas (alineamientos únicos) que se alinearon a cada gen, de tal forma que obtengamos una aproximación a los valores de expresión de cada gen.

### Expresión diferencial con Deseq2

Para obtener los genes diferencialmente expresados, se realizó un análisis con DESeq2 y a los resultados se les realizó un filtrado, poniendo como condiciones un p-value ajustado (p-adj) < 0.05 y un fold change (log2FoldChange) >= |1|. Con el presente análisis, se garantizó la identificación de genes diferencialmente expresados con alta confianza. En la figura 12 se muestra la gráfica del número de genes diferencialmente expresados en cada comparación.



**Figura 12. Gráfica ilustrativa de los genes diferencialmente expresados (GDE) en todas las comparaciones.** Realizamos comparaciones entre todos los grupos.

A continuación, se describirán los resultados por cada comparación realizada.

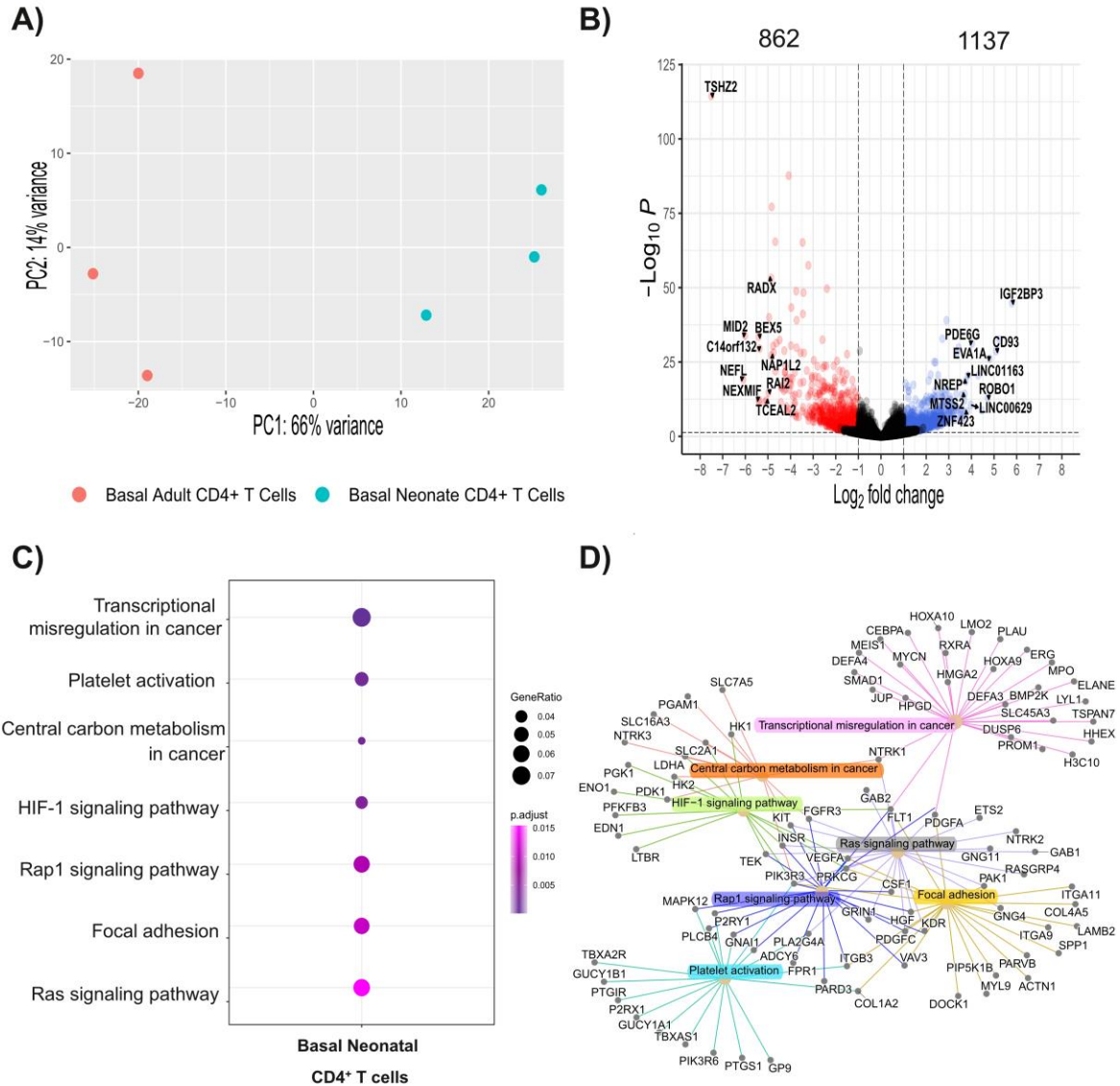
### **Comparación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos a nivel basal.**

Al realizar la comparación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos a nivel basal se realizó un PCA para ver la manera en que se agrupaban los datos. Como se logra ver en la Figura 13A, los datos de neonatos (azul) se agrupan con los neonatos y los datos de adultos se agrupan con los adultos, lo cual nos indicó que observaríamos diferencias al comparar estas dos condiciones. Logramos encontrar 1999 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales, 1137 corresponden a genes sobreexpresados con un log2 fold change  $\geq 1$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales y 862 a genes sobreexpresados con un log2 fold change  $\leq -1$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adulto, Figura 13B). Cabe mencionar, que en las comparaciones del RNA-seq entre dos condiciones, los genes diferencialmente expresados (GDE) son aquellos que cumplen con log2 fold change (lfc)  $\geq |1|$ , donde los valores de lfc de una condición quedan positivos, mientras que los de la otra quedan negativos.

### **Anotación funcional**

Se realizó la anotación funcional de los genes diferencialmente expresados con la herramienta EnrichKEGG de la paquetería clusterProfiler, usando las vías de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Como resultado, se obtuvieron varias vías de KEGG sobrerrepresentadas con un p-adj  $< 0.05$ , como se aprecia en la Figura 13. Cabe mencionar, que solamente al utilizar la lista de genes sobreexpresados en neonatos a nivel basal encontramos vías sobrerrepresentadas (Figura 13C).

Se realizó un diagrama donde se pueden observar los genes que participan en las 7 vías de señalización celular sobrerrepresentadas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonato (Figura 13D).



**Figura 13. Genes diferencialmente expresados en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos a nivel basal.** A) Análisis de componentes principales. B) volcano plot de los GDE, en rojo se observan a las muestras de adultos y en azul las muestras de los neonatos. C) Anotación funcional con enrichKEGG. D) red de los GDE que participan en las vías de señalización encontradas en los neonatos.

La primera vía, desregulación transcripcional en cáncer (Fig. 13D, rosado), incluye genes con funciones de linfocito T<sub>REG</sub>, tales como fms related receptor tyrosine kinase 1 (*FLT1*)<sup>61</sup>, plasminogen activator urokinase (*PLAU*)<sup>62</sup>, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (*HPGD*)<sup>63</sup>, genes sobreexpresados en

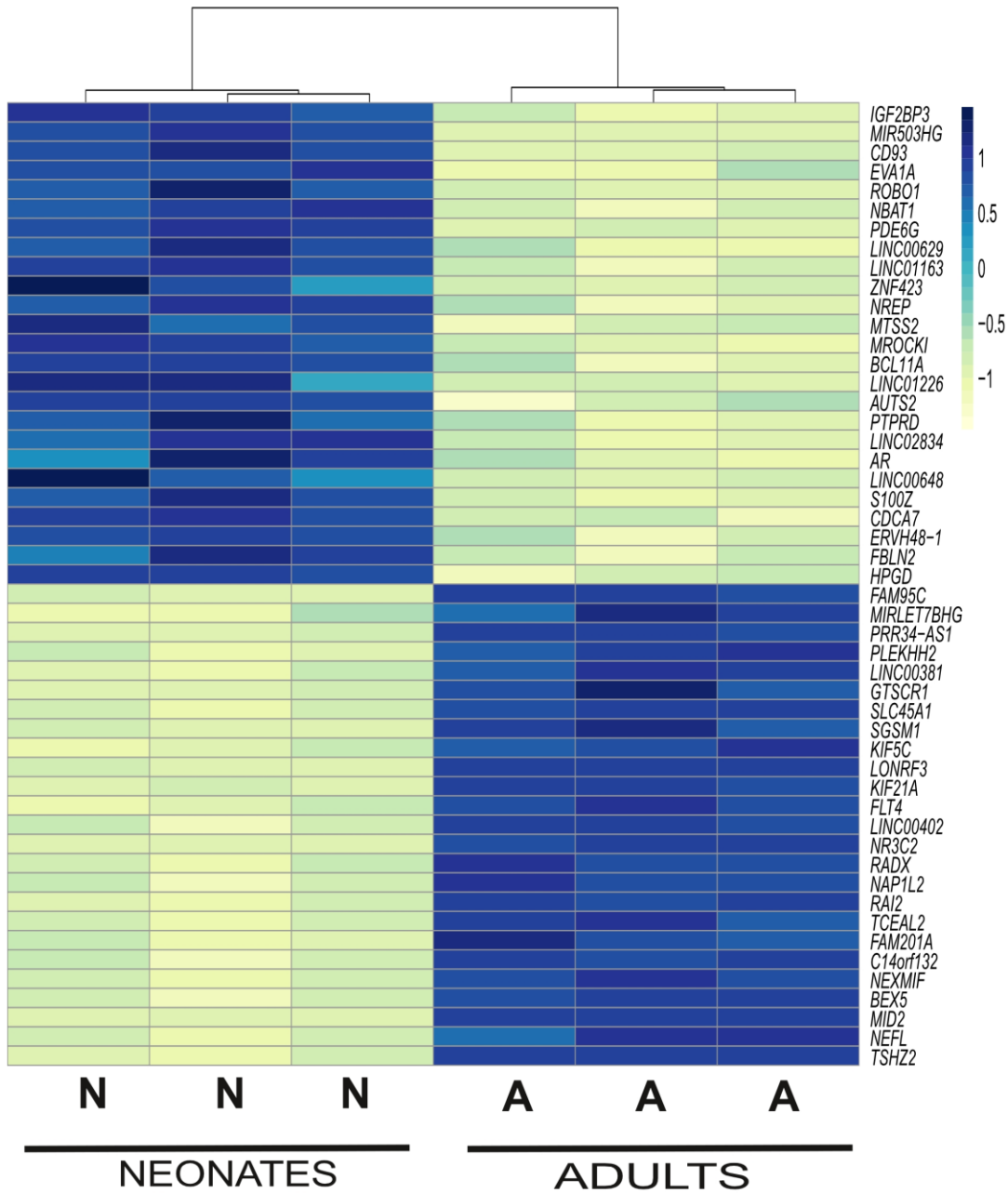
células hematopoyéticas y precursores de células T, varios de ellos relacionados con hiperproliferación y con la Leucemia linfoblástica aguda de células T, tales como prominin 1 (*PROM1*)<sup>64</sup>, homeobox 9, homeobox 10 (*HOXA9*, *HOXA10*)<sup>65,66</sup>, platelet derived growth factor subunit A (*PDGFA*)<sup>67</sup>, MYCN proto-oncogene (*MYCN*)<sup>68</sup>, LIM domain only 2 (*LMO2*)<sup>69</sup>, BMP2 inducible kinase (*BMP2K*)<sup>70</sup>, Meis homeobox 1 (*MEIS1*)<sup>71</sup>, high mobility group AT-hook 2 (*HMG2*)<sup>72</sup>, hematopoietically expressed homeobox (*HHEX*)<sup>73</sup>, ETS transcription factor ERG (*ERG*)<sup>74</sup>, H3 clustered histone 10 (*H3C10*)<sup>75</sup>, genes típicamente asociados a función antimicrobiana como myeloperoxidase (*MPO*)<sup>76</sup>, elastasa (*ELANE*)<sup>77</sup>, defensin alpha 3 (*DEFA3*), defensin alpha 4 (*DEFA4*)<sup>78</sup>; así como genes de señalización celular dual specificity phosphatase 4 (*DUSP4*), dual specificity phosphatase 6 (*DUSP6*)<sup>79</sup>, tetraspanin 7 (*TSPAN7*)<sup>80</sup>, solute carrier family 45 member 3 (*SLC45A3*)<sup>81</sup>, junction plakoglobin (*JUP*)<sup>82</sup>, retinoid X receptor alpha (*RXRA*)<sup>83</sup>, neurotrophic receptor tyrosine kinase 1 (*NTRK1*)<sup>84</sup>, particularmente con funciones reguladoras. Las vías del metabolismo central del carbono en cáncer (Central Carbon Metabolism in Cancer) y el factor 1-alfa inducible por hipoxia HIF-1 están enriquecidas en enzimas de la glucólisis aeróbica, como lactate dehydrogenase A (*LDHA*), hexokinase 1 (*HK1*), hexokinase 2 (*HK2*)<sup>85</sup>, pyruvate dehydrogenase kinase 1 (*PDK1*)<sup>86</sup>, phosphoglycerate kinase 1 (*PGK1*)<sup>87</sup> y enolase 1 (*ENO1*)<sup>85</sup> (Figura 13D, naranja). Las vías de activación de plaquetas y adhesión focal están involucradas en los reordenamientos del citoesqueleto y la migración celular (Figura 13D turquesa y amarillo), que de acuerdo con el enriquecimiento de la vía de señalización de Rap (Figura 13D, azul marino), controla la migración celular y los reordenamientos del citoesqueleto. Finalmente, la Vía de señalización RAS (Figura 13D, gris) controla la proliferación celular que, junto con los genes de hiperproliferación descritos anteriormente, sugiere que las células neonatales participan en la proliferación homeostática.

Además, en la Figura 14, se muestran los 50 genes que mostraron las mayores diferencias entre las células neonatales y de adulto y los factores de transcripción expresados diferencialmente (Figura 15). Los genes sobreexpresados en las células neonatales están involucrados en el citoesqueleto, la adhesión y migración celular,

como MARCKS cis regulating lncRNA promoter of cytokines and inflammation (*MROCK1*), Cluster of Differentiation 93 (*CD93*)<sup>88</sup>, MTSS I-BAR domain containing 2 (*MTSS2*), fibulin 2 (*FBLN2*), kinase insert domain receptor (*KDR1*), el control de la señalización celular phosphodiesterase 6G (*PDE6G*), protein tyrosine phosphatase receptor type D (*PTPRD*) y el desarrollo neuronal regeneration related protein (*NREP*), activator of transcription and developmental regulator AUTS2 (*AUTS2*), insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (*IGF2BP3*). Los genes sobreexpresados en células de adulto están más involucrados en la función celular como transmembrane protein 30B (*TMEM30B*), pleckstrin homology, MyTH4 and FERM domain containing H2 (*PLEKHH2*), small G protein signaling modulator 1 (*SGSM1*), kinesin family member 5C (*KIF5C*), kinesin family member 21A (*KIF21A*), fms related receptor tyrosine kinase 4 (*FLT4*) y en la estructura y estabilidad del genoma RPA1 related single stranded DNA binding protein, X-linked (*RADX*), nucleosome assembly protein 1 like 2 (*NAP1L2*), transcription elongation factor A like 2 (*TCEAL2*). Sobre los factores de transcripción expresados diferencialmente entre células neonatales y adultas, muchos de los factores de transcripción de las células neonatales están involucrados en el desarrollo y la hiperproliferación. Entre estos, encontramos zinc finger protein 423 (*ZNF423*), que se ha relacionado con la reparación de daños en el ADN<sup>89</sup>; BCL11A (BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11A), un importante regulador de la linfopoyesis temprana, también involucrado en la remodelación de la cromatina a través de su asociación con el SWI/SNF<sup>90</sup>; TOX(thymocyte selection associated high mobility group box), que interviene en la maduración de las células T y en la inhibición de las funciones efectoras, provocando también el agotamiento de las células T<sup>91</sup>. También es destacable la expresión de los genes homeobox, HOXA y HHEX, que están implicados en los procesos de desarrollo<sup>92</sup>, HOXA3 está especialmente implicado en el desarrollo del timo<sup>93</sup>. CEBPA codifica un factor de transcripción que controla la expresión de genes y regula la proliferación<sup>94</sup>. Por el contrario, los factores de transcripción sobreexpresados en células adultas están relacionados con la función típica de las células T, como T-bet (*TBX21*), los factores de transcripción EOMES y STAT4, que se activa en respuesta a la IL-12 y está implicado en la diferenciación

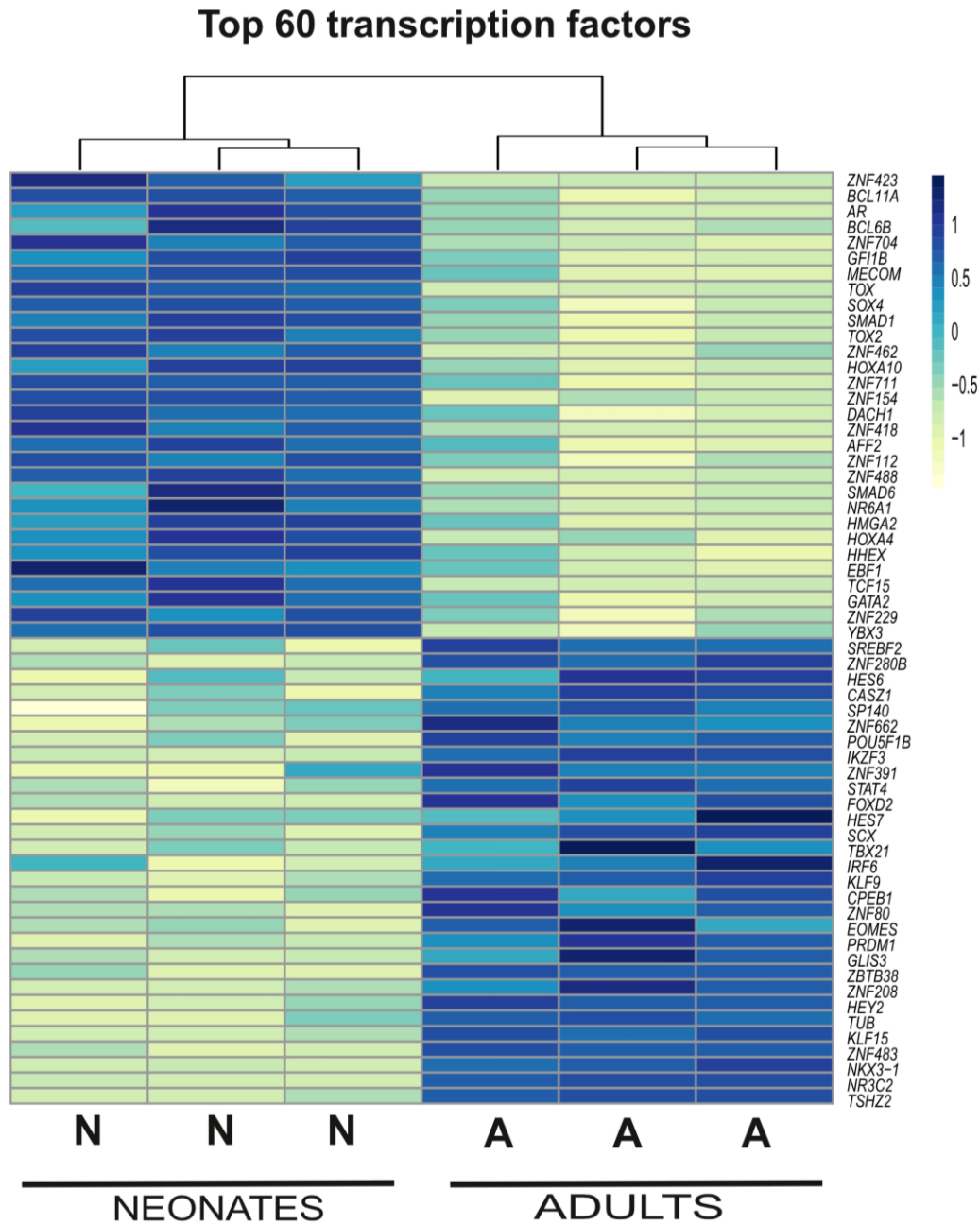
de Th1.

### Top 50 differentially expressed genes



**Figura 14. Heatmap de los principales GDE de la comparación entre neonatos y adultos a nivel basal.** Se muestran los top 50 genes más diferencialmente expresados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> entre adultos y neonatos en condiciones basales. El orden corresponde a los 25 GDE con un mayor log2foldchange tanto en linfocitos

T CD4<sup>+</sup> entre adultos y neonatos. La intensidad del color representa el valor del z-score usado para calcular los valores del heatmap.



**Figura 15.** Heatmaps de los factores transcripcionales de la comparación entre neonatos y adultos a nivel basal. Se muestran los top 60 factores transcripcionales diferencialmente expresados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> entre adultos y neonatos en condiciones basales. El orden corresponde a los 30 factores

transcripcionales con un mayor log<sub>2</sub>foldchange tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos. La intensidad del color representa el valor del z-score usado para calcular los valores del heatmap.

### **Validación experimental**

Se seleccionaron algunos genes que resultaron diferencialmente expresados entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos (sobre-expresados en células neonatales) en el análisis de RNA-seq, los cuales corresponden a receptores (INSR y PD1), factores transcripcionales (HOXA4, HOXA9 y BCL11A), enzimas (DUSP6) y transportadores (GLUT1) que podrían participar de forma importante en la función y proliferación de las células neonatales. Los niveles de expresión de las proteínas de estos genes fueron evaluados a través de citometría de flujo.

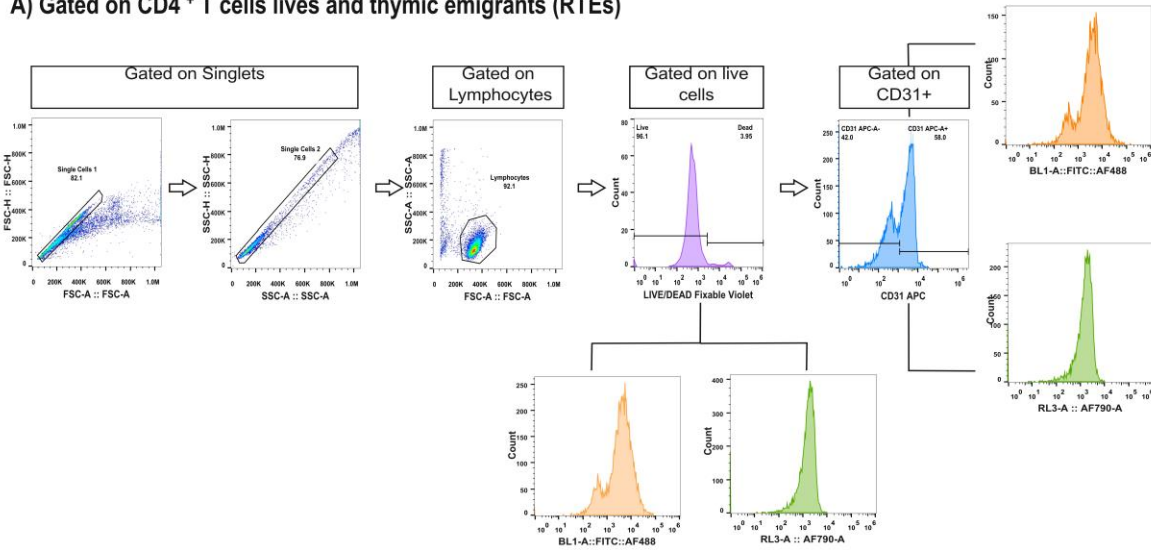
Entre las células vírgenes, hay dos poblaciones que se consideran distintivas, los Emigrantes Recientes del Timo (RTEs), que han completado más recientemente su desarrollo y salida del timo y las células vírgenes que ya proliferaron homeostáticamente (proceso que no implica el reconocimiento del antígeno). Para los RTEs, se encontró una proteína de superficie (marcador) que permite identificarlos, esta proteína es CD31<sup>95</sup>. Debido a que en la literatura se reporta que los linfocitos T neonatales tienen una elevada proporción de RTEs<sup>96</sup>, que expresan CD31 en su membrana, se decidió evaluar la expresión de las proteínas tanto en linfocitos T vírgenes de neonatos y adultos como en las subpoblaciones de RTEs (CD31+).

La estrategia para analizar los datos de citometría de flujo se describe en la figura 16. Para medir DUSP6, HOXA9, HOXA3, CEBPA, BCL11A se utilizaron los anticuerpos primarios específicos y después un anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo. Se muestra una imagen representativa del control del anticuerpo secundario anti-rabbit-FITC (histograma amarillo figura16B) en comparación con los histogramas sin teñir (histograma gris figura16B), y los histogramas de DUSP6, HOXA9, HOXA3, CEBPA, y BCL11A con la tinción de anticuerpo primario y secundario. Para medir INSR y Glut1 se utilizaron anticuerpos acoplados al

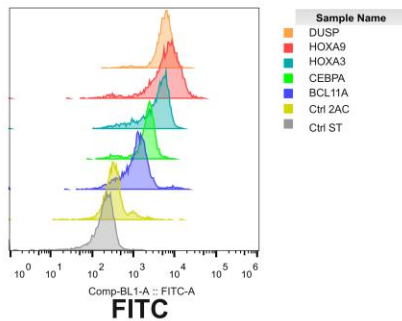


fluoróforo AlexaFluor 790. Se realizaron los controles FMO (fluorescencia menos uno), que contienen todos los anticuerpos de la muestra menos 1 (FITC o AF790 figura 16C).

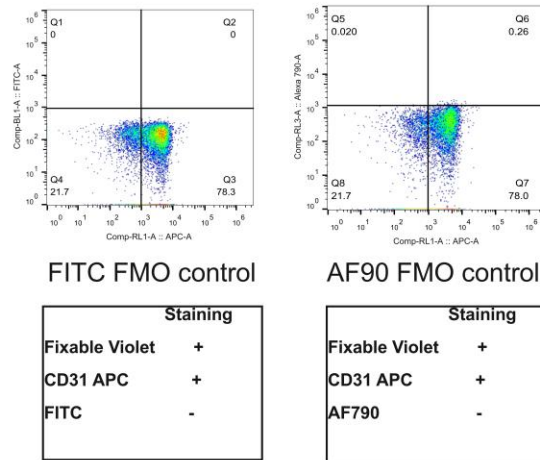
**A) Gated on CD4<sup>+</sup> T cells lives and thymic emigrants (RTEs)**



**B) Control secondary antibody**



**C) FMO controls**



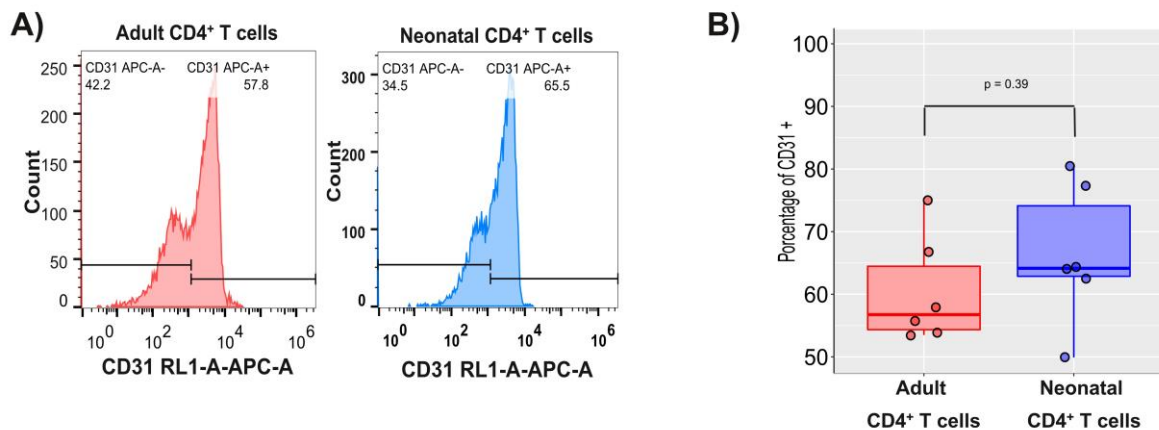
**Figura 16. Estrategia de gating para la validación de GDE por citometría de flujo.** Se purificaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos en estado basal para evaluar la expresión de INSR, CEBPA, HOXA4, HOXA9, BCL11A, DUSP6 y GLUT1. Las muestras fueron pasadas al citómetro, los datos se analizaron de la siguiente manera: 1. Se realizó la selección de células que están pasando una por una (gated on singlets). 2. Se seleccionó la región que corresponde a los linfocitos (gated on lymphocytes). 3. Se seleccionó mediante un histograma a las células vivas (gated

on live cells). 4. Se seleccionaron a las células CD31+ (gated on CD31+). 5. Se evaluó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de INSR, CEBPA, HOXA4, HOXA9, BCL11A, DUSP6 y GLUT1 tanto para las células vivas y las CD31+. B) Figura representativa de los histogramas del control del anticuerpo secundario anti-rabbit-FITC (historgrama amarillo figura16B) en comparación con los histogramas sin teñir (historgrama gris), histogramas de DUSP6, HOXA9, HOXA3, CEBPA, y BCL11A con la tinción de anticuerpo primario y secundario.

Para ver si las diferencias entre las células neonatales y de adultos no se debían a una proporción distinta de RTEs, evaluamos el porcentaje de expresión de CD31 en ambos tipos celulares. Los adultos expresaron en promedio un 62.7% de RTEs en linfocitos T CD4+ mientras que los neonatos expresaron un 68.3%, siendo esta diferencia no estadísticamente significativa (Figura 17B).

Se evaluó la expresión de los genes que se encontraron sobreexpresados en linfocitos T CD4+ de neonato y adulto, tanto en las poblaciones totales como en las CD31+ (marcador de RTEs) (Figura 17A Gate CD31+), con el fin de saber si los RTE pudieran afectar a los genes diferencialmente expresados. No se encontró ninguna diferencia en la expresión de proteínas entre el total de las células vivas y las células positivas para RTE (figura 17B)

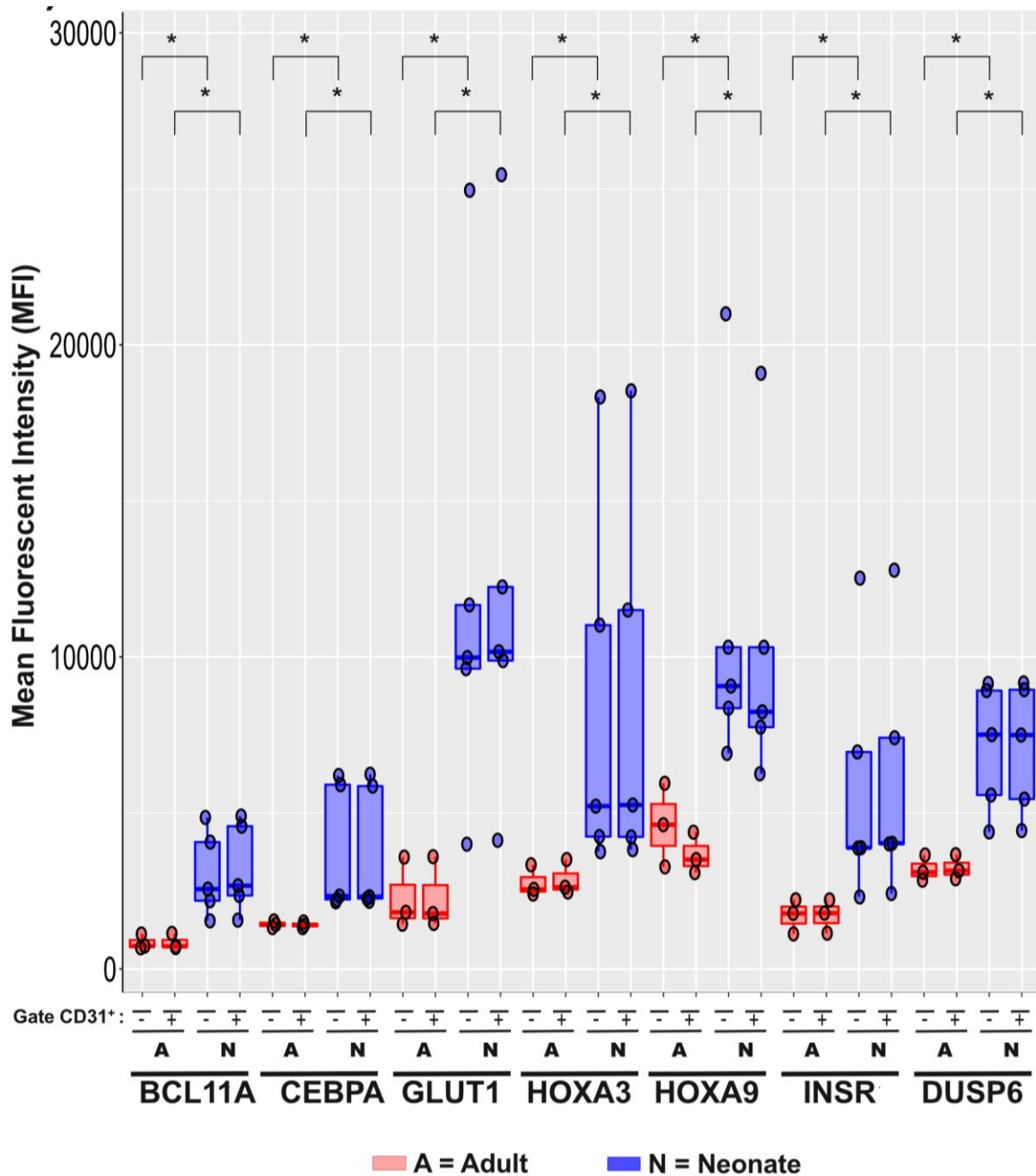
### CD31 expression in neonatal and adult naïve CD4+ T cells



**Figura 17. Evaluación de los RTEs en linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos**

**por citometría de flujo.** A) Selección de la población CD31<sup>+</sup> mediante el uso de histogramas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos (rojo) y neonatos (azul) de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. B) Boxplot del porcentaje de la población CD31<sup>+</sup> en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos (rojo) y neonatos (azul) de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. El análisis estadístico se hizo en R, usando la prueba U de Mann-Whitney. La n=6 en ambos casos.

Mediante el uso de anticuerpos acoplados a fluorocromos que dan señal en el canal Blue 1(FITC-BL-1), se evaluó BCL11A, CEBPA, HOXA3, HOXA9, DUSP6 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos. Se graficaron boxplots tomando en cuenta la intensidad media de fluorescencia (Figura 18) y se observó la expresión aumentada de BCL11A, CEBPA, HOXA3, HOXA9, DUSP6 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos (azul) en comparación de los adultos (rojo). Además, se evaluó la expresión de receptores relacionados con el metabolismo de glucosa (INSR y GLUT1), mediante el uso de anticuerpos acoplados a fluoróforos en el canal Red 3 (AF790-RL3), en las mismas células. Se graficaron boxplots tomando en cuenta la intensidad media de fluorescencia y se demostró la sobreexpresión de INSR y GLUT1 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos (azul) en comparación de los adultos (rojo).



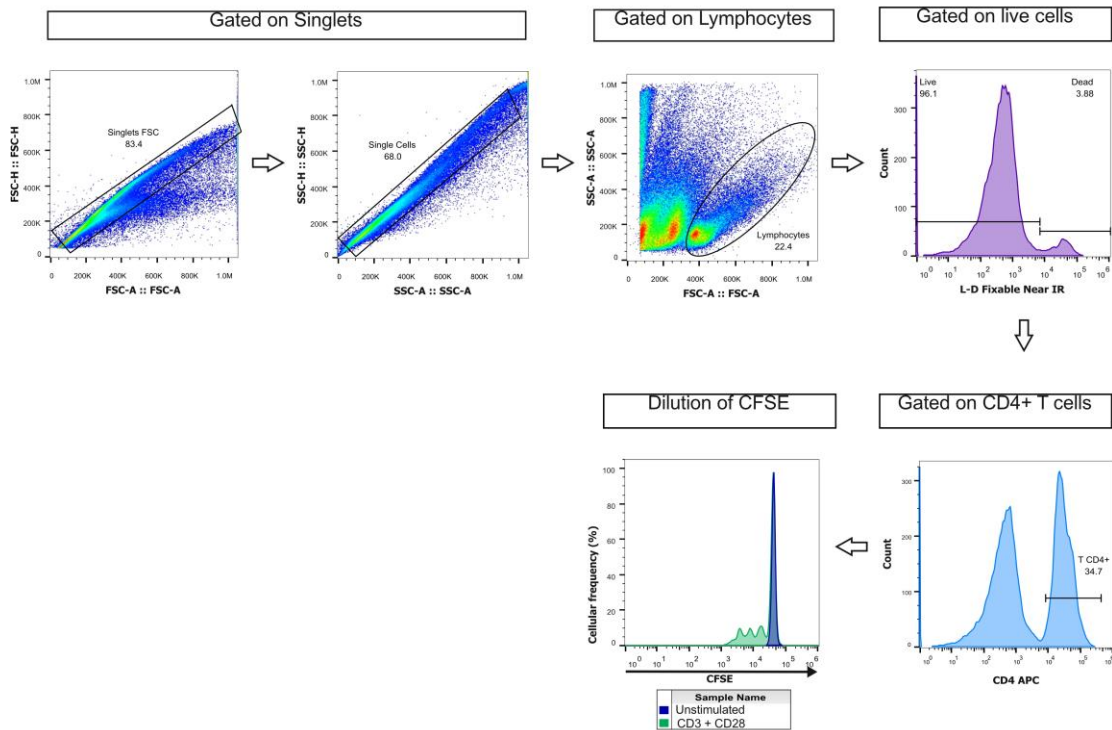
**Figura 18. Evaluación de la expresión de proteínas de genes sobreexpresados en neonato en la población de linfocitos y RTEs (CD31<sup>+</sup>).** Se muestra la expresión de las proteínas de BCL11A, CEBPA, GLUT1, HOXA3, HOXA9, INSR, DUSP6 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y RTEs (CD31<sup>+</sup>) de neonatos (azul) y adultos (rojo). En el eje vertical se muestra la IMF y en el eje de la x están las proteínas que se evaluaron. Para cada proteína se muestran tanto la región de CD31<sup>+</sup> como la de

células vivas (CD31<sup>-</sup>). El análisis estadístico se hizo en R, usando la prueba U de Mann-Whitney. Para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos la n=3, mientras en neonatos la n=5. \* indica p<0.05.

### **Ensayo de proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos**

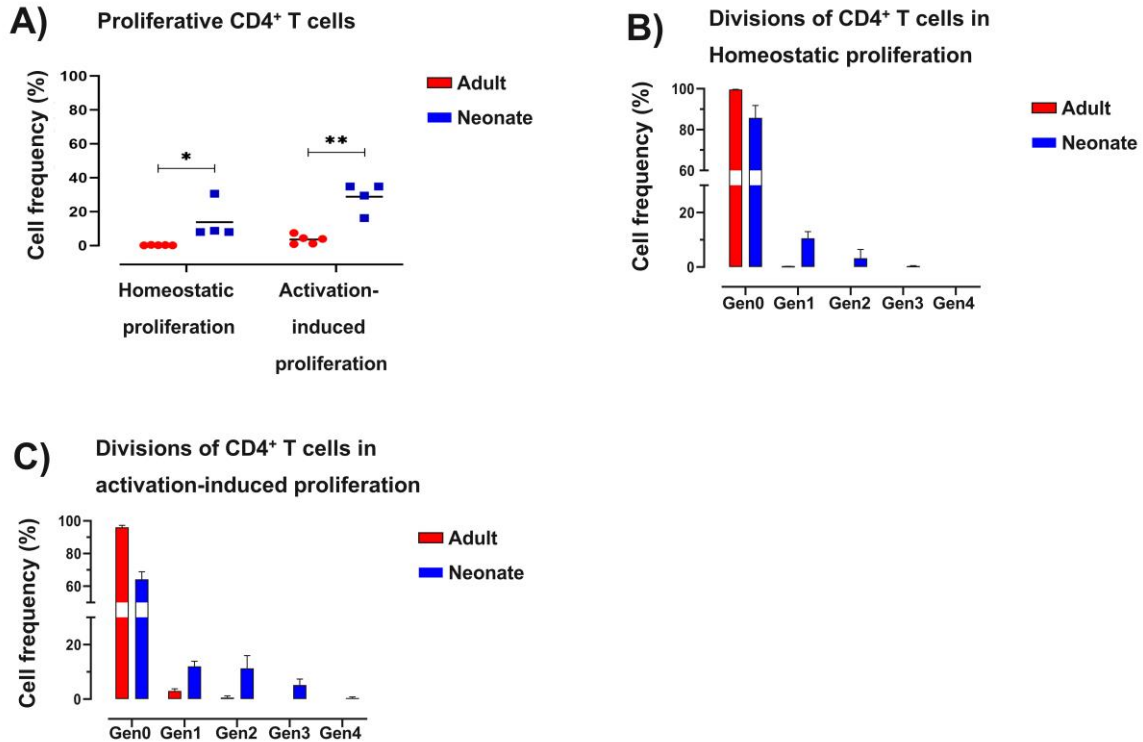
Se purificaron CBMCs de sangre de cordón umbilical y PBMCs de sangre periférica de adulto, a las PBMCs se les eliminó las células de memoria mediante la depleción de CD45RO usando un anticuerpo acoplado a perlas magnéticas como se describió anteriormente. Se evaluó la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes dentro de las poblaciones de CBMCs y PBMCs, en condiciones basales y estimuladas con anti-CD3/anti-CD28, durante 96 horas. Se tiñeron las células con el kit Live-Dead Fixable Near IR para medir su viabilidad. Para seleccionar a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se utilizó un anti-CD4-APC, y para medir a las células que proliferaron se midió la dilución del reactivo CFSE. Las muestras fueron evaluadas por citometría de flujo. Para analizar los datos se utilizó el programa flowjoX, para lo cual, primero se seleccionaron las regiones de las de células que estaban pasando una por una (singlets), después se seleccionó a la región de células vivas, enseguida se seleccionó la región de linfocitos, para después se seleccionar a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y finalmente, sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se analizaron los picos generados de la dilución del CFSE (Figura 19).

## Flow cytometry gating strategy for proliferation assay



**Figura 19. Estrategia de gating para la evaluación de la proliferación por citometría de flujo.**

Evaluamos la proliferación a nivel basal (homeostatic proliferation) y en respuesta a la activación con anti-CD3/anti-CD28 (activation-induced proliferation) tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos (azul) como de adultos (rojos) (Figura 20A). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales proliferaron más que los de adultos tanto a nivel basal y en respuesta a la estimulación, tal como se muestra en la frecuencia de las células (cell frequency) que diluyeron el colorante CFSE (Figura 20A). Después se analizó la frecuencia celular en cada generación, tanto a nivel basal como en respuesta al estímulo, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos (azul) y adultos (rojos). Se encontró que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales generaron hasta tres generaciones (Figura 20B), mientras que los de adultos no se dividen homeostáticamente, solo una pequeña proporción de las células alcanzaron una división después de la activación. Por otro lado, en respuesta a la activación, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales generaron hasta cuatro generaciones en comparación con los adultos que generaron dos (Figura 20C). Cabe mencionar que este experimento se realizó sin adicionar citocinas al medio.



**Figura 20. Ensayos de proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos.**

A) Proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonato (azules) y adulto (rojas) sin ningún estímulo (Homeostatic proliferation) o tras la estimulación de anti-CD3/ anti-CD28 durante 96 h (Activation-induced proliferation). Se muestra la frecuencia de células en cada generación (Gen) en las muestras en estado basal (B) y después de la estimulación (C). Para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos la n=5, mientras en neonatos la n=4. El análisis estadístico que se utilizó fueron el análisis de varianza de dos colas y el test de Sidak para comparaciones múltiples. \* indica  $P < 0.05$ , \*\* indica  $P < 0.01$ .

### Conclusiones de la comparación a nivel basal

- La proporción de emigrantes recientes del timo es similar entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos jóvenes y neonatos, y no afectó la expresión de las proteínas seleccionadas.
- Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos, a nivel basal, tienen aumentada la expresión de proteínas relacionadas con la hiperproliferación (HOXA3,

HOXA9, BCL11A), actividad antimicrobiana (ELANE, MPO, AZU1, etc), metabolismo de la glucosa (INSR y GLUT1) e inhibición de la señalización del TCR (DUSP6) en comparación con los adultos.

- El aumento de las proteínas INSR y GLUT1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos a nivel basal refuerza la idea de un metabolismo de glucosa aumentado en estas células.
- Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales proliferan más que los linfocitos T de adultos a nivel basal y en respuesta a la estimulación con anti-CD3/anti-CD28.

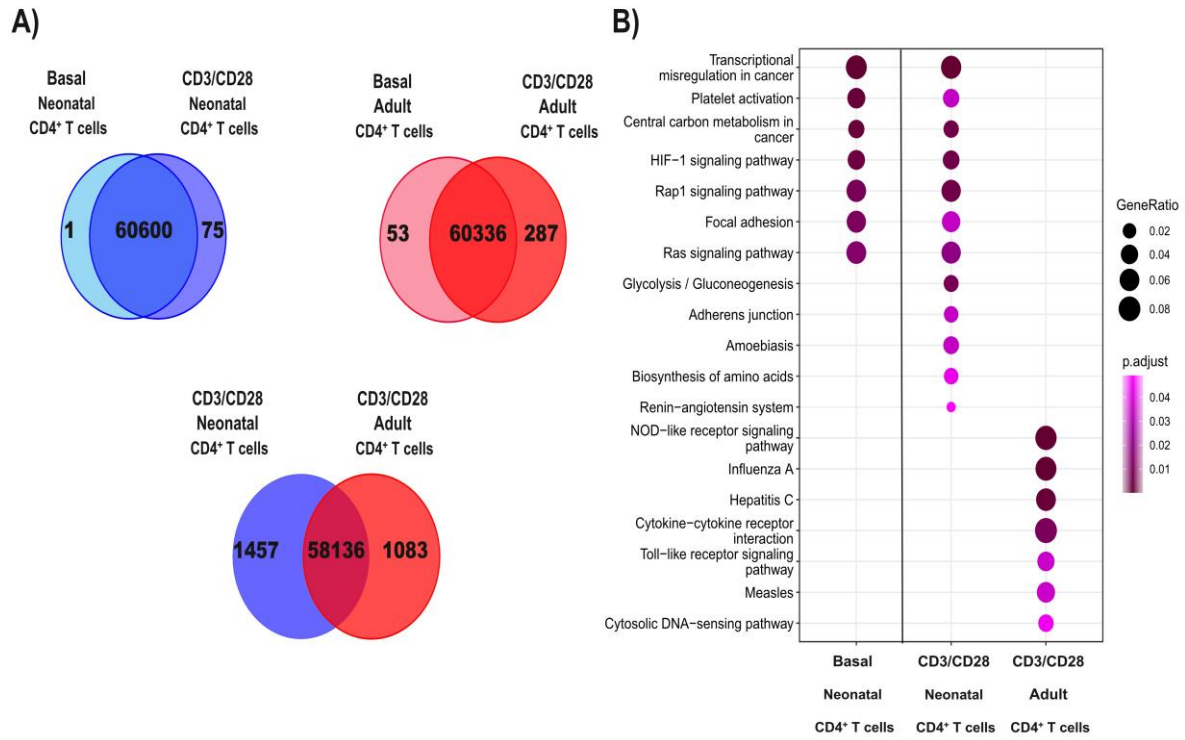
### **El perfil de expresión génica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales muestra una baja activación en comparación con los adultos.**

Además de las comparaciones a nivel basal, es de suma importancia conocer la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales al estímulo típico de TCR/CD28, por lo cual se realizó el RNA-seq de células estimuladas de esa forma.

La Figura 21 muestra el número de genes (Figura 21A) encontrados diferencialmente expresados en las distintas condiciones. Resulta muy claro que las células de adulto respondieron a la estimulación de manera robusta, con 340 genes diferencialmente expresados en tan solo 6h. En cambio, las células neonatales presentaron una baja respuesta a estas condiciones de estimulación con sólo 76 genes diferencialmente expresados (Figura 21A). En ningún caso, la comparación entre células no estimuladas y estimuladas de la misma población celular arrojó vías diferencialmente expresadas. Sin embargo, la comparación entre las células estimuladas a través de CD3/CD28 entre células neonatales y de adulto arrojó varias vías sobrerepresentadas, además de las ya encontradas a nivel basal. El estímulo provocó que el perfil de las células neonatales fuera aún más marcado hacia una glucólisis aerobia y proliferación. Asimismo, sobreexpresaron genes asociados a adhesión (*ITGA11*, *KDR*, *DOCK1* etc.) y migración (*ACTN1*, *ARG2*, *LAMC1*, *LAMB2* etc.). Por su parte, las células de adulto estimuladas a través de CD3/CD28 (Figura 21B) activaron la expresión de genes asociados a vías de señalización (vía de señalización de receptores NOD, TLR, TNF y TCR), de citocinas y receptores de



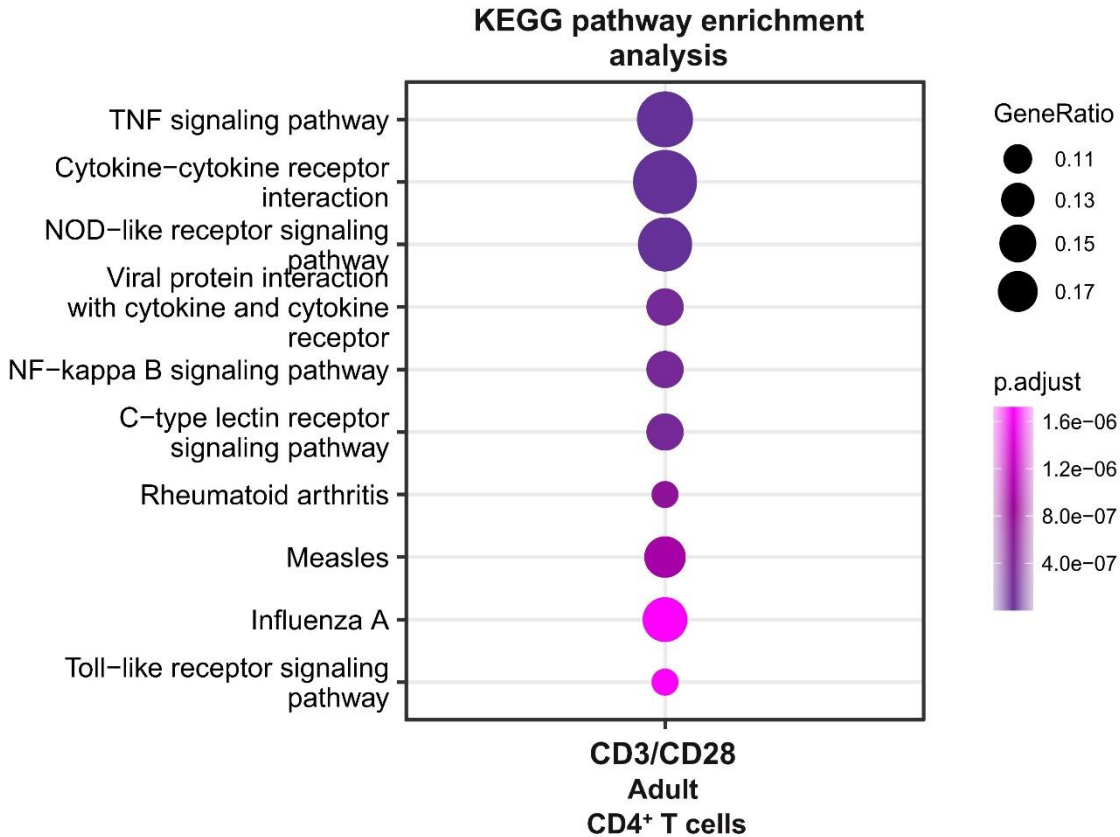
citocinas (*IL2*, *IFNG*, *IL1A*, *TNF*, *IL1RA* etc.), lo cual es de esperarse de acuerdo con el estímulo que recibieron.



**Figura 21. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en las distintas condiciones.** A) Diagramas de Venn de genes diferencialmente expresados entre las distintas condiciones: Comparaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos en estado basal y estimulados (CD3/CD28), linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos en estado basal y estimulados (CD3/CD28), y linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados (CD3/CD28) de neonatos (azul) y adultos (rojo) B) Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en las siguientes condiciones: Comparaciones entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos en estado basal, y entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados (CD3/CD28) de neonatos y adultos. Se muestran las vías que se identificaron de KEGG con un p-adj < 0.05.

En la anotación funcional de genes diferencialmente expresados entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos en condiciones basales y estimulados, se identificaron varias vías

relacionadas con la señalización intracelular y la producción y señalización mediada por citocinas en células estimuladas. Esto concuerda con lo esperado para las células de adulto que se activan a través de TCR/CD28 (Figura 22).

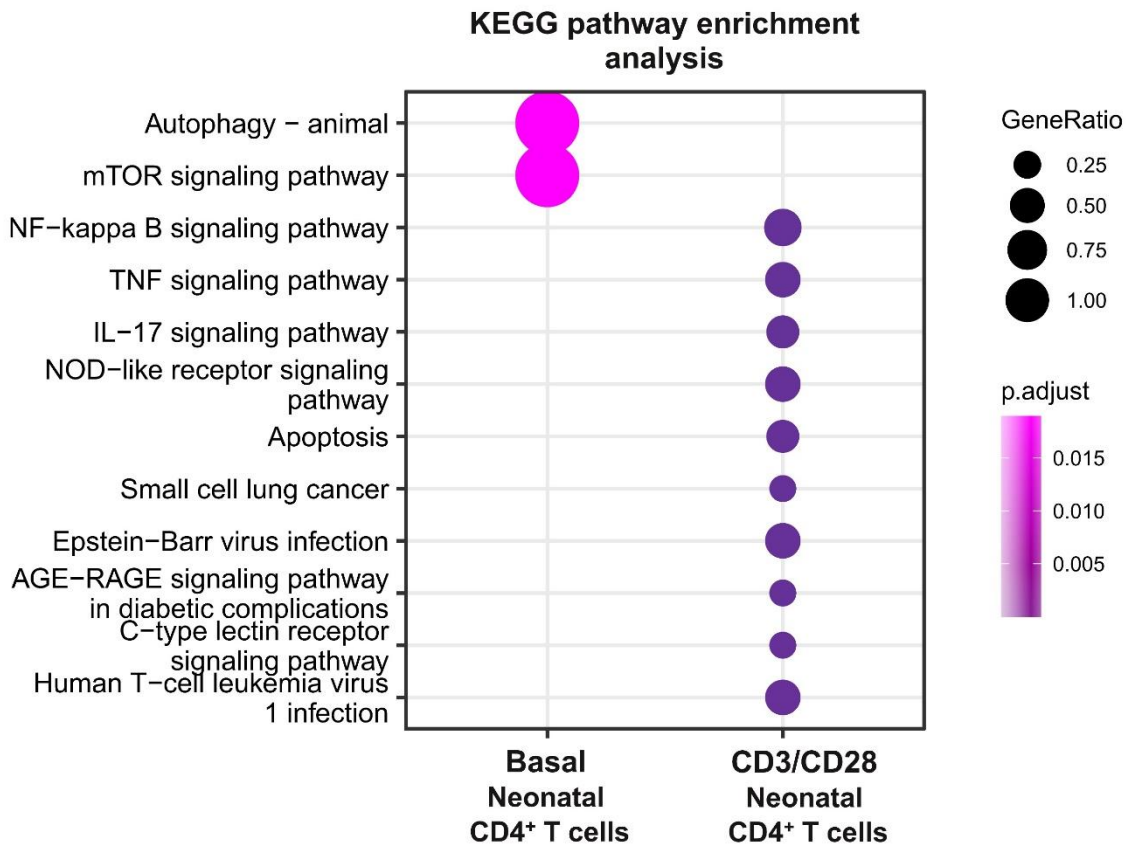


**Figura 22. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos tras la estimulación (CD3/CD28).** Se identificaron varias vías de KEGG sobrerrepresentadas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos estimulados con CD3/CD28 y ninguna vía en estado basal. Para lo cual se usó la herramienta de EnrichKEGG con un p-adj< 0.05

Al realizar la comparación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos a nivel basal y estimulados con CD3/CD28 encontramos 76 genes diferencialmente expresados (GDE), 1 sobreexpresados con un log2 fold change >=1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales a nivel basal y 75 sobreexpresados con un log2 fold change <=-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales estimulados.

Se realizó la anotación funcional usando las vías de KEGG. Como resultado, se obtuvieron varias vías de KEGG sobrerrepresentadas con un  $p\text{-adj} < 0.05$ , como se aprecia en la Figura 23.

En los linfocitos T  $CD4^+$  neonatales en condiciones basales encontramos sobrerrepresentada la vía de mTOR, mientras que la estimulación con CD3/CD28 genera la expresión de genes que participan en la vía de señalización intracelular y de vías de citocinas como TNF e IL-17 (Figura 23).



**Figura 23. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en de linfocitos T  $CD4^+$  de neonatos tras la estimulación (CD3/CD28).** Se identificaron varias vías de KEGG sobrerrepresentadas en los linfocitos T  $CD4^+$  de neonatos estimulados con CD3/CD28 y dos vías en estado basal. Para lo cual se usó la herramienta de EnrichKEGG con un  $p\text{-adj} < 0.05$

## **Conclusiones de las comparaciones entre las células estimulados mediante CD3/CD28**

- Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adulto estimulados con TCR/CD28 sobreexpresaron genes de vías de señalización, entre ellas vías de citocinas, receptores tipo NOD y receptores tipo Toll. Por su parte, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales no pudieron inducir la expresión de estos genes en respuesta al estímulo, lo que podría indicar una baja respuesta de activación.
- Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos sobreexpresan genes de citocinas y receptores de citocinas, lo cual es de esperarse debido al estímulo que recibieron y el papel de las citocinas y sus receptores en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>
- Por otro lado, en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonato estimulados mediante CD3/CD28, además de las vías sobre representadas a nivel basal, aparecen también la vía de la glucólisis/gluconeogénesis, la vía de síntesis de aminoácidos, y amebiasis.
- En general, pocos genes se sobreexpresaron en las células neonatales estimuladas comparado con su estado basal, y no corresponden con la respuesta observada en adultos, lo cual es interesante.

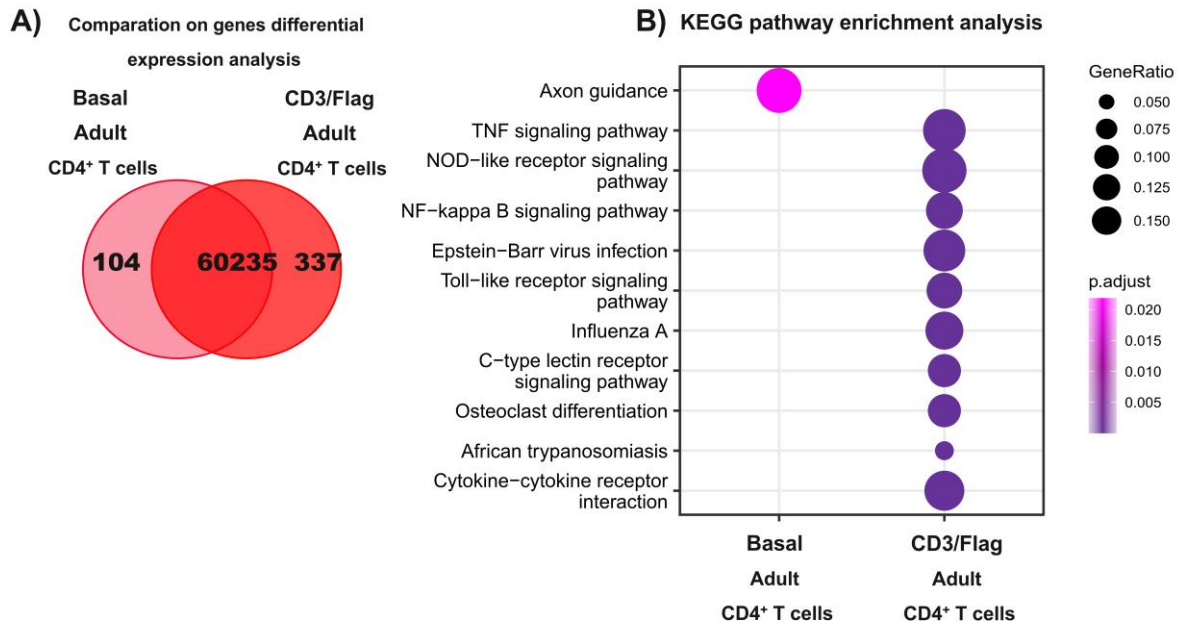
## **Expresión génica en respuesta a la activación a través de TCR/TLR5**

La activación de los TLRs por sus ligandos conduce a la inflamación, aumento de la función de las células inmunes y mejora el reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección, favoreciendo entonces la eliminación del patógeno. El TLR5 reconoce a la flagelina, componente del flagelo de bacterias móviles.

En estudios previos de nuestro laboratorio, encontramos que el TLR5 es uno de los TLRs que más se transcribe en linfocitos T tanto de adultos como neonatos (Tesis de licenciatura. Otoniel R.J.2010). Al inducir la activación del TLR5 con flagelina, se encontró que esta promueve la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 tanto en linfocitos T de adultos como neonatos<sup>22,49</sup>. También se demostró que la flagelina induce a la producción de IFN $\gamma$  en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales<sup>97</sup>.

Por esa razón, en este trabajo se evaluó el perfil transcriptómico que se expresó con la activación del TCR y el receptor tipo Toll 5 (TLR5) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos humanos.

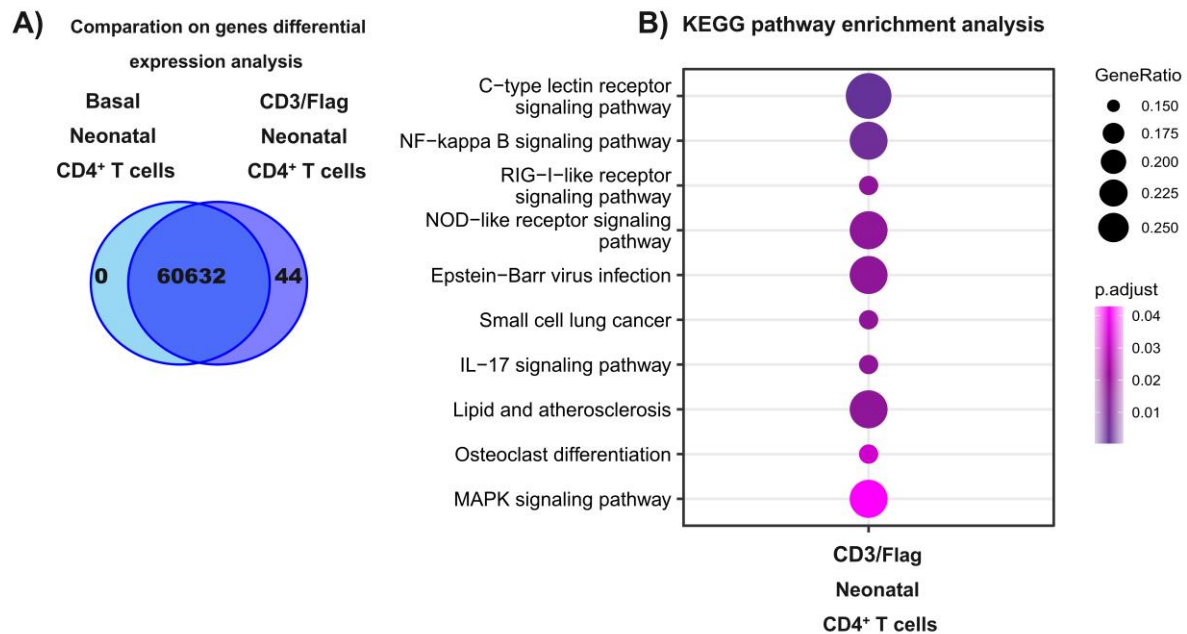
Al comparar el perfil de expresión génica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos a nivel basal y estimulados con CD3/Flag, encontramos 441 genes diferencialmente expresados (GDE) (Figura 24A), de los cuales, 104 estuvieron sobreexpresados ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$ ) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos a nivel basal y 337 estuvieron sobreexpresados ( $\log_2$  fold change  $\leq -1$ ) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> adultos estimulados con CD3/Flag. A continuación, se realizó la anotación funcional usando las vías de KEGG y el programa enrichKEGG en R. Como resultado, se encontraron sobrerrepresentadas varias vías de KEGG con un  $p$ -adj  $< 0.05$ , tras la estimulación con CD3/Flag, y solo se encontró una vía sobrerrepresentada a nivel basal, como se aprecia en la Figura 24B.



**Figura 24. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos tras la estimulación (CD3/Flag).** A) Diagramas de Venn de genes diferencialmente expresados entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos en estado basal y estimulados (CD3/Flag). B) Se muestran las vías de KEGG sobrerrepresentadas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos estimulados con CD3/Flag

y en estado basal. El análisis de enriquecimiento de vías se realizó con la herramienta EnrichKEGG en R, con un  $p\text{-adj} < 0.05$ .

Al realizar la comparación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos a nivel basal y estimulados con CD3/Flag, logramos encontrar 44 genes diferencialmente expresados (GDE) (Figura 25A), de los cuales, los 44 genes estuvieron sobreexpresados ( $\log_2$  fold change  $\leq 1$ ) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos estimulados con CD3/Flag. A continuación, se realizó la anotación funcional usando las vías de KEGG con EnrichKEGG en R. Como resultado, se obtuvieron varias vías de KEGG sobrerrepresentadas, con un  $p\text{-adj} < 0.05$ , tras la estimulación con CD3/Flag, y ninguna vía se encontró sobrerrepresentada a nivel basal en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos, como se aprecia en la Figura 25B.

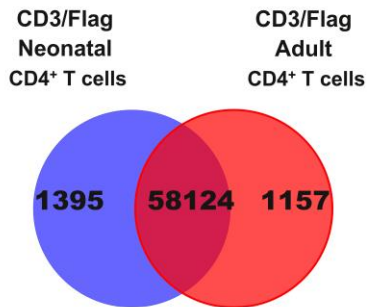


**Figura 25. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos tras la estimulación (CD3/Flag).** A) Diagramas de Venn de genes diferencialmente expresados entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos en estado basal y estimulados (CD3/Flag). B) Se muestran las vías de KEGG sobrerrepresentadas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos estimulados con CD3/Flag. El análisis de enriquecimiento de vías se realizó con la herramienta

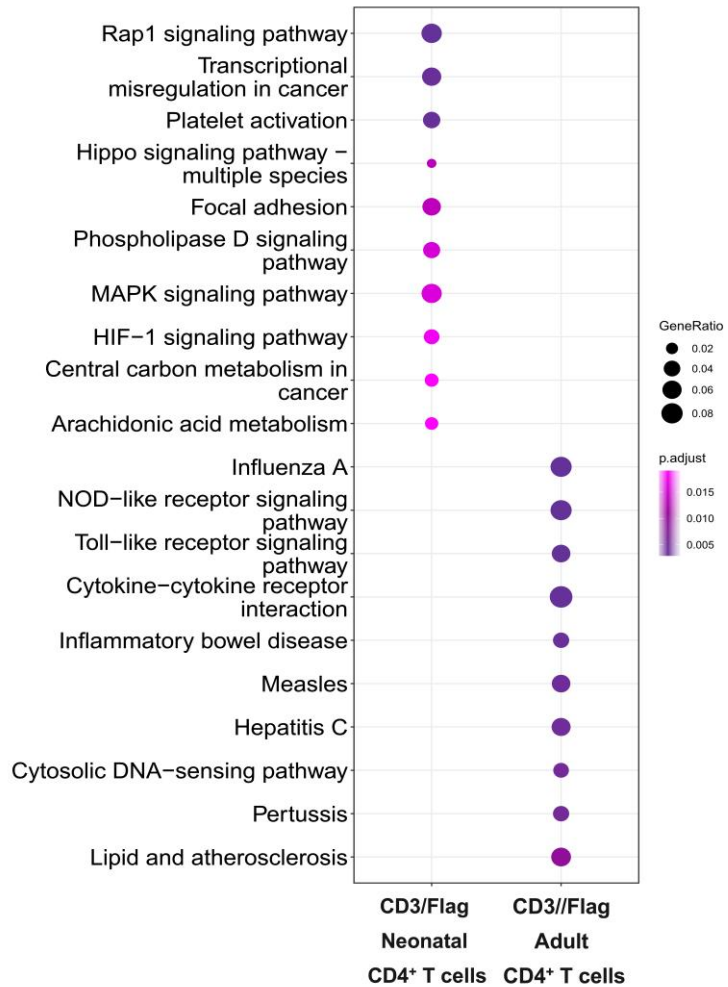
EnrichKEGG en R, con un  $p\text{-adj} < 0.05$ .

Al realizar la comparación entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos (azul) y adultos (rojo), estimulados con CD3/Flag, encontramos 2552 genes diferencialmente expresados (GDE) (Figura 26A), de los cuales, 1395 estuvieron sobreexpresados ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$ ) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos estimulados con CD3/Flag y 1157 estuvieron sobreexpresados ( $\log_2$  fold change  $\leq -1$ ) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> adultos estimulados con CD3/Flag. Se realizó la anotación funcional usando las vías de KEGG. Como resultado, se obtuvieron varias vías de KEGG sobrerrepresentadas, con un  $p\text{-adj} < 0.05$ , tras la estimulación con CD3/Flag tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos, como se aprecia en la Figura 26B.

**A) Comparison on genes differential expression analysis**



**B) KEGG pathway enrichment analysis**



**Figura 26. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en**

**de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos tras la estimulación (CD3/Flag).** A)

Diagramas de Venn de genes diferencialmente expresados entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos (azul) y adultos (rojo) estimulados (CD3/Flag). B) Se muestran las vías de KEGG sobrerrepresentadas tanto en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos como de

adultos estimulados con CD3/Flag. El análisis de enriquecimiento de vías se realizó con la herramienta EnrichKEGG en R, con un p-adj < 0.05.

En linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos, la estimulación con TCR/Flagelina generó la expresión de genes de señalización intracelular, así como genes de citocinas y respuesta a citocinas, de forma similar a lo que ocurrió en la estimulación con



TCR/CD28 (Figura 22). Por otro lado, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos estimulados con CD3/Flag, encontramos vías sobrerrepresentadas de señalización intracelular, como receptores tipo NOD y RIG, Map cinasas y NF- $\kappa$ B, como se esperaría de acuerdo con la señalización por receptores tipo toll (Figura 25). Nuevamente, similar a lo que se encontró para TCR/CD28 en células neonatales (Figura 24).

## Conclusiones

- En linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos, el estímulo con CD3/Flag lleva a la expresión de genes de vías de señalización intracelular, en particular la activación de NF- $\kappa$ B y MAP cinasas. Lo cual sugiere que la vía del TLR5 podría llevar a un mejor balance de los factores transcripcionales AP-1 y NF $\kappa$ B y una mejor activación de los linfocitos T neonatales. Sin embargo, en respuesta al estímulo (TCR/TLR5) solo se promueve la expresión de 44 genes en estas células.
- El estímulo TCR/TLR5 podría promover vías de señalización de citocinas, en particular IL-17, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales.
- En linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos, el estímulo con CD3/Flag induce la expresión de genes de vías de señalización intracelular como NOD, TLR, y NF- $\kappa$ B, así como genes de citocinas y receptores de citocinas, como la vía de TNF. A notar, en células de adulto el estímulo TCR/TLR5 promueve la expresión diferencial de 441 genes, 10 veces más que en células neonatales.
- Al comparar linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos estimulados por TCR/TLR5, encontramos grandes diferencias entre ambos tipos celulares, donde las células neonatales parecen conservar la expresión de genes de un metabolismo altamente glucolítico, y promover vías de señalización como Hippo, MAP cinasas y fosfolipasa D. Por su parte, en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos se sobreexpresan genes de vías de señalización intracelular, como TLR y NOD, y genes de citocinas y sus receptores.
- Al igual que el estímulo de TCR/CD28, el estímulo de TCR/TLR5 promueve una mayor reprogramación de la expresión génica en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de

adultos que de neonatos.

## **Capítulo 2: Expresión génica en linfocitos T CD4+ de neonatos de acuerdo con el tipo de nacimiento y edad estacional.**

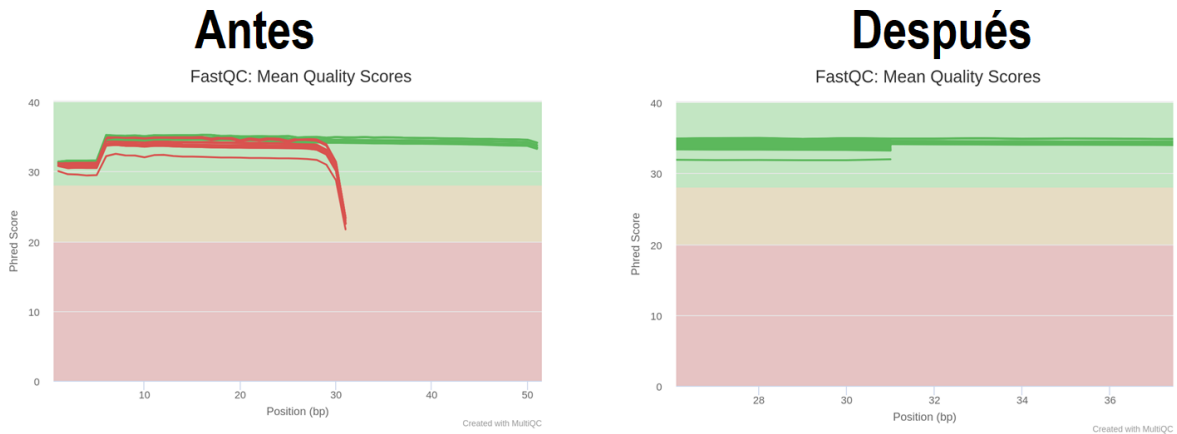
### **2.1 Secuenciación de las muestras**

La evaluación del transcriptoma de las células T CD4<sup>+</sup> de neonatos prematuros y de término nacidos por cesárea, se realizó mediante la técnica de RNA-seq. Se obtuvieron 5 muestras biológicas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos prematuros a nivel basal, 5 muestras biológicas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos de término a nivel basal. Las muestras se guardaron en trizol y se mandaron a secuenciar a la unidad de secuenciación (Transcriptomic and Genomic Platform Marseille Luminy) en Francia. En la plataforma se evaluó la integridad del RNA en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent), sometiéndose a secuenciación sólo las muestras con una integridad (RIN) mayor a 8. Se realizaron las librerías con el kit paired-end TruSeq mRNA (Illumina) y se secuenciaron usando el equipo NextSeq-500 Sequencer de Illumina.

Se obtuvieron 10 datos de RNA-seq de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los cuales se fueron analizando mediante el flujo de trabajo descrito anteriormente.

### **2.2 Análisis de calidad**

Se realizó el análisis de calidad de los datos crudos (archivos FASTQ) con el programa de FASTQC y se generó un reporte de calidad con MultiQC. Se seleccionaron los parámetros necesarios para mejorar la calidad y eliminar posibles secuencias de adaptadores, para lo cual se utilizó el programa de trimomatic. Posteriormente, se realizó un reporte de todos los datos con el programa MultiQC antes y después de mejorar la calidad. El análisis de la calidad de secuencia por base se muestra en la Figura 27.



**Figura 27. Calidad de los datos de RNA-seq.** a) Análisis de calidad de los datos crudos. b) Análisis de calidad de los datos procesados con trimmomatic. El eje Y proporciona las puntuaciones de calidad (score Phred), mientras que el eje x representa la posición de las bases en la lectura. El código de colores de la gráfica denota lo que se considera puntuaciones de calidad alta (verde), media (naranja) y baja (Roja).

### 2.3 Alineamiento y conteo

Una vez que los datos fueron procesados, tuvieron una muy buena calidad y se eliminaron las secuencias de los adaptadores, las lecturas se alinearon al genoma de referencia mediante el uso del programa STAR. Se evaluó el porcentaje (%) de alineamiento, donde se encontró que la mayoría de las muestras tuvo valores arriba de un 85%, lo cual se muestra en la Tabla 1.

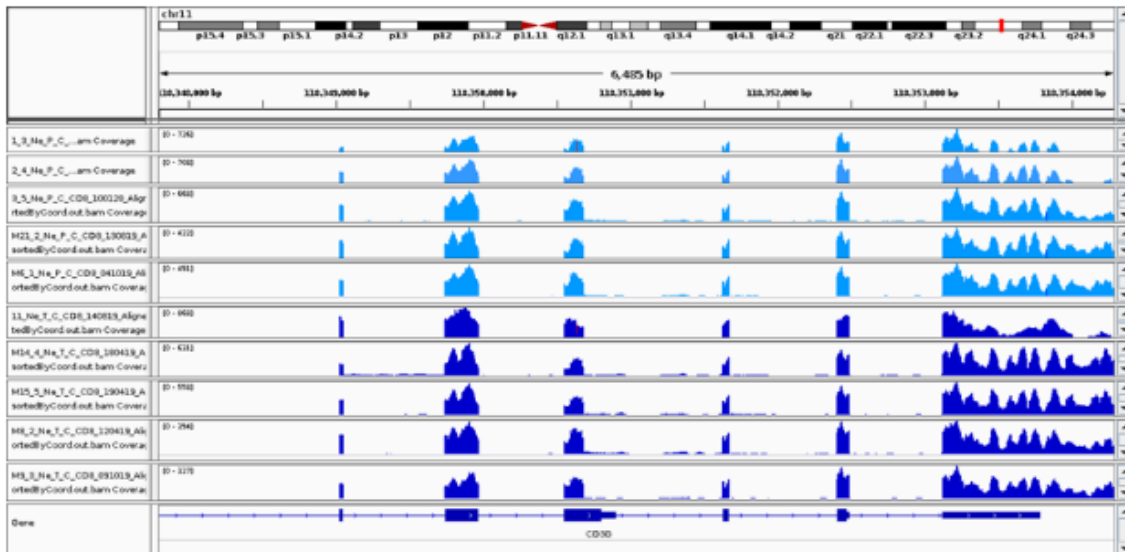
Condición	% Alineamiento
Prematuro 100120	87.43%
Prematuro 230120	86.92%
Prematuro 090719	86.04%
Prematuro 240719	85.74%
Prematuro 201119	85.85%
Termino 220819	87.64%
Termino 170719	85.95%
Termino 030719	83.97%
Termino130819	86.34%
Termino 211019	86.84%

**Tabla 1. Porcentaje de alineamiento.** Se muestran los porcentajes de alineamiento de cada muestra.

#### **2.4 Visualización de regiones importantes en el IGV**

Al realizar el alineamiento se generó un archivo BAM (Binary Aligment Map) para cada muestra, el cual fue visualizado en IGV en regiones de genes de interés, para corroborar un correcto alineamiento. A continuación, se muestra una imagen representativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos prematuros y de término nacidos por cesárea, Figura 28.

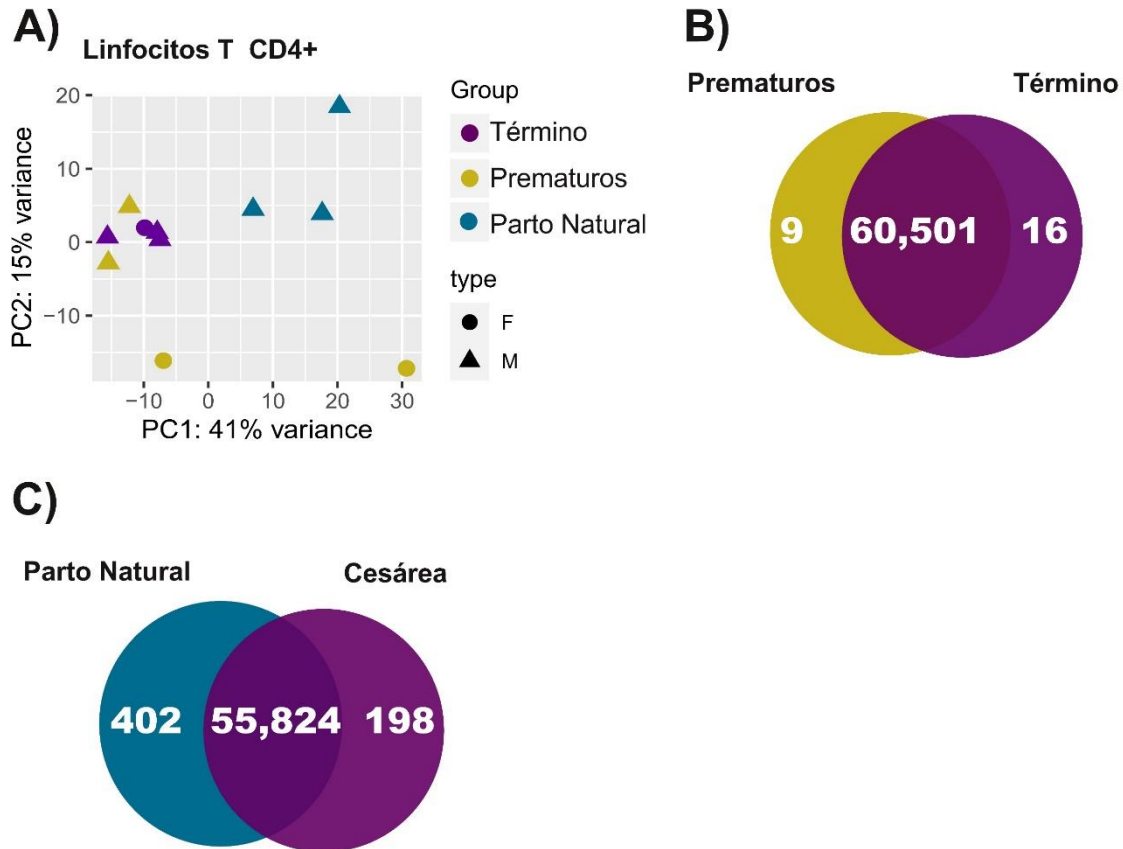
# CD4



**Figura 28. Visualización del alineamiento de las muestras.** Se muestra una figura representativa del alineamiento de las muestras alrededor del gen CD4. En azul cielo se muestran las muestras de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos prematuros, mientras que en azul marino se muestran las de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de término. La imagen se obtuvo con el programa IGV.

## 2.5 Comparación entre linfocitos T CD4 de neonatos prematuros y de término.

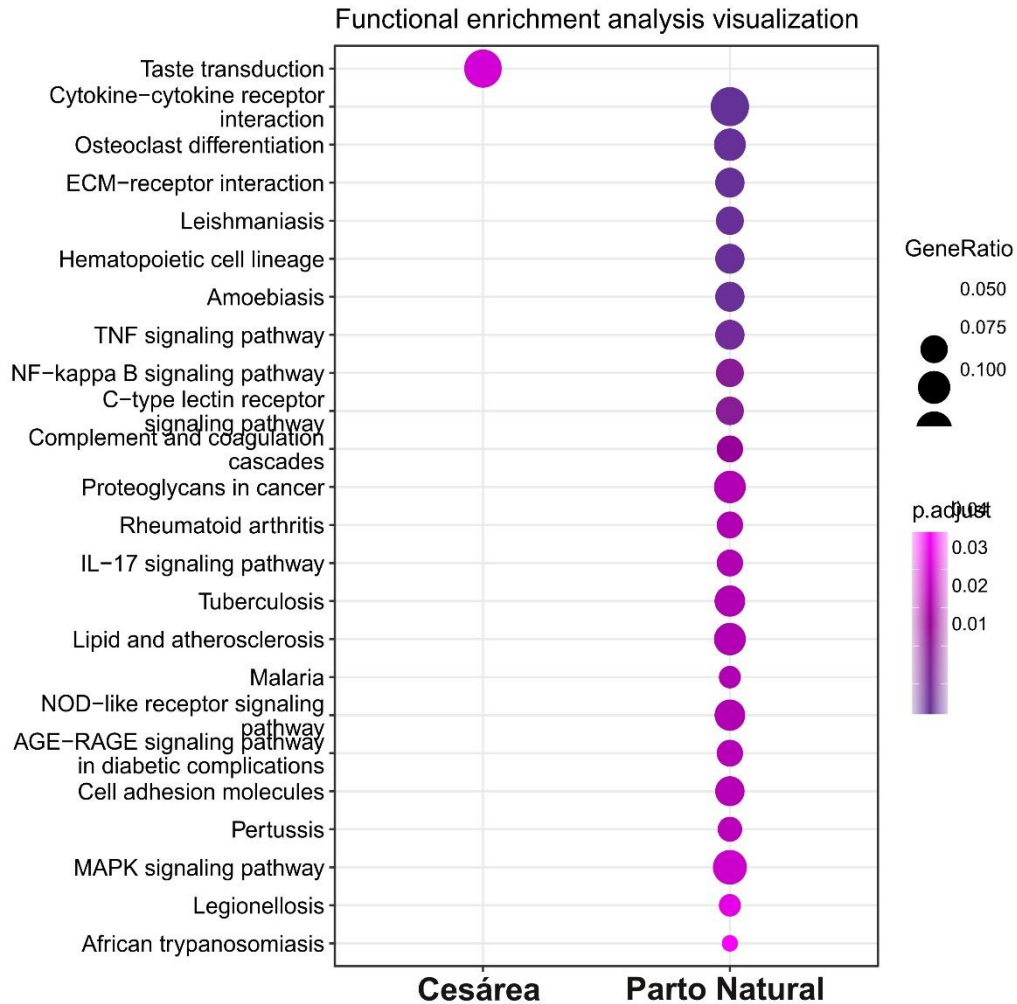
Al realizar el gráfico de PCA y de correlación pudimos observar que las muestras de neonatos de término nacidos por cesárea formaban un solo grupo, pero los prematuros (<37 SDG) nacidos por cesárea quedaban muy dispersos, algunos incluso agruparon con los de término. Por lo tanto, no esperábamos encontrar muchos genes diferencialmente expresados entre estas condiciones (figura 29 A). En el análisis de expresión diferencial, se obtuvieron 25 GDE con un log2 fold-change  $\geq 1$  y un p-ajustado  $< 0.05$ , los cuales no dieron vías sobrerrepresentadas (figura 29 B).



**Figura 29. Comparación de linfocitos T CD4 de neonatos de término nacidos por cesárea y parto vaginal, y prematuros.** A) Análisis de componentes principales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales en las siguientes condiciones: Término (>37 SDG) nacidos por cesárea (morado), Término (>37 SDG) nacido por parto natural y Prematuros (<37 SDG) nacidos por cesárea (amarillo). Las muestras que pertenecen a neonatos femeninos son marcadas como círculos y los masculinos están marcados en triángulos. B) Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados entre las comparaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos nacidos por cesárea prematuros (amarillo) y de término (morado) a nivel basal. C) Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados entre las comparaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos nacidos a término por parto natural (azul) y por cesárea (morado) a nivel basal.

Enseguida, se realizó la comparación de las muestras de neonatos de término nacidos por cesárea con las muestras de neonatos de término nacidos por parto natural. En el PCA se puede ver que las muestras forman dos grupos independientes, según el tipo de nacimiento (figura 29A). En esta comparación se obtuvieron 600 GDE con un  $\log_2$  fold-change  $\geq 1$  y un p-ajustado  $< 0.05$ . En el análisis de anotación funcional, los genes sobreexpresados en linfocitos T CD4+ de neonatos nacidos por parto natural arrojaron varias vías sobrerrepresentadas, mientras que los de cesárea dieron solo 1 vía (Figura 30).





**Figura 30. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados según el tipo de nacimiento.** Se muestran las vías de KEGG sobrerrepresentadas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos de término (>37 SDG) nacidos por parto natural y los nacidos por cesárea. El análisis de enriquecimiento de vías se realizó con la herramienta de EnrichKEGG en R, con un p-adj < 0.05.

En las muestras de cesárea solo la vía de transducción del gusto está sobrerrepresentada, que pudiera estar relacionada con señalización a través de proteínas G triméricas.

Por otro lado, en las muestras de parto natural se identificaron varias vías relacionadas con la señalización intracelular y la respuesta inmune, como la vía de

receptor de citocina-citocina, la vía de TNF, la vía de NF- $\kappa$ B, Artritis reumatoide, vía de IL-17, señalización de NLRs y la vía de las MAP cinasas. Esto nos sugiere que el parto natural implica la activación parcial o priming de los linfocitos T CD4+ neonatales durante el nacimiento por parto vaginal, lo cual pudiera llevar a un aumento del umbral de activación de estas células, como se ha reportado en las células neonatales<sup>98,99</sup>.

### **Conclusiones de la sección**

- Las diferencias más importantes en la expresión de genes se encontraron entre las muestras que se diferencian por el tipo de nacimiento (parto natural vs cesárea a término), las cuales tienen 600 genes diferencialmente expresados, y no por la edad gestacional (prematuros vs cesárea), entre las cuales solo hay 25 genes diferencialmente expresados.
- En la anotación funcional de las vías las vías sobrerrepresentadas en los linfocitos T CD4+ de parto natural se observan múltiples vías de señalización importantes para la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. Además, se encuentran genes de varias citocinas y quimiocinas (IL1B y CXCL2), el factor transcripcional específico para la diferenciación Th1 (TBX21), un receptor importante en la coestimulación (CD40) y genes de proteínas ribosomales. Esto podría sugerir que los linfocitos T CD4+ de neonatos nacidos por parto natural pasan por cierta activación o priming durante el parto, y que transcriben más genes de respuesta inmune que los neonatos nacidos por cesárea. Se ha reportado que la respuesta inmune promueve la labor de parto.
- Finalmente, los resultados parecen indicar que en los linfocitos T CD4+ neonatales importa más la forma del nacimiento que las semanas de gestación, al menos para la edad estacional investigada, y que el parto natural parece hacer una programación de los linfocitos T CD4+ durante el nacimiento.

## Discusión

En este proyecto realizamos una caracterización del transcriptoma de las células T CD4<sup>+</sup> neonatales y de adulto, donde para las células de neonato consideramos varias condiciones como los tipos de nacimiento (parto natural y cesárea) y la edad gestacional (prematuros y de término). Encontramos que las células T CD4<sup>+</sup> de neonatos nacidos por parto vaginal tienen una firma de expresión de genes asociados con la proliferación, la glucólisis aeróbica, las actividades antimicrobianas, la migración, funciones reguladoras y la regulación de la señalización intracelular. Los resultados del transcriptoma fueron confirmados por cambios en la expresión de un grupo de proteínas en condiciones basales (GLUT1, INSR, BCL11A, CEBPA, HOXA3, HOXA9, y DUSP6), la proliferación (homeostática y en respuesta al estímulo) y cambios en la expresión génica después de la activación (RNA-seq).

Nuestros datos arrojaron una alta expresión de tres genes importantes con funciones reguladoras en las células T CD4<sup>+</sup> neonatales: el gen FLT1, que está relacionado con un nuevo subconjunto de células T reguladoras, así como los genes PLAU y HPGD, también implicados en actividades supresoras<sup>61–63</sup>. Además, nuestro estudio reveló una expresión característica de factores de transcripción en células T CD4<sup>+</sup> neonatales, con sobreexpresión de reguladores maestros de la estructura de la cromatina, incluido ZFN423, que se ha relacionado con la reparación de daños en el ADN<sup>89</sup>, el factor de transcripción Bcl11a, que se une a los remodeladores de la cromatina SWI/SNF<sup>90</sup>. CEBPA es un factor de transcripción que controla la expresión de genes del metabolismo, la proliferación y el desarrollo de células mieloides<sup>94</sup>. El gen que codifica el factor de transcripción TOX también se encontró sobreexpresado en las muestras neonatales. TOX es un regulador maestro negativo de las funciones efectoras, previamente reportado durante el proceso de agotamiento de las células T<sup>91</sup>. De acuerdo con una respuesta tolerante, la expresión génica después de la activación de las células T fue mucho menor en las células neonatales en comparación con las células de adulto y no una respuesta típica de las células T. Sin embargo, la respuesta de proliferación fue mayor en las células neonatales que en las células de adulto estimuladas (en ausencia de

citocinas exógenas). Esto está de acuerdo con la alta expresión de genes característicos de hiperproliferación en células T CD4<sup>+</sup> neonatales, particularmente aquellos que codifican para la familia de factores de transcripción HOXA. Los factores HOXA juegan un papel clave en el control de la identidad celular y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas (HSC) y los progenitores de células T<sup>92,100</sup>. Se ha reportado una disminución progresiva de la expresión del gen HOXA durante la maduración de las células tímicas<sup>101 7</sup>, mientras que se ha demostrado que la expresión sostenida de los genes HOXA durante la diferenciación de las células T afecta su maduración e induce la transformación oncogénica<sup>101</sup>. Por lo tanto, la expresión mantenida de estos genes en las células T neonatales podría imponer un estado epigenético "inmaduro" que contribuye al fenotipo de respuesta inmune más tolerante de estas células.

El metabolismo es un determinante importante de la función inmunitaria e influye en la diferenciación de células efectoras y de memoria. En nuestro estudio encontramos que la expresión de genes metabólicos estaba alterada en las células neonatales, con una alta expresión de enzimas glucolíticas y el transportador de glucosa GLUT1. La glucólisis y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) son los dos principales procesos cooperativos que suministran ATP dentro de la célula. Cuando el piruvato se fermenta a lactato en el citoplasma, incluso cuando hay suficiente oxígeno para utilizar OXPHOS, se le conoce como efecto Warburg, o glucólisis aeróbica, que es característico de las células que se dividen rápidamente<sup>85</sup>. En nuestro estudio, encontramos que las células T CD4<sup>+</sup> neonatales sobreexpresan el transportador de glucosa GLUT-1 (SLC2A1) y genes implicados en la glucólisis aeróbica (HK1, HK2, LDHA, PDK1), así como genes de la vía de señalización de HIF-1. Se ha reportado que la vía de señalización de HIF-1 promueve la glucólisis en las células tumorales<sup>102</sup> y en linfocitos T activados. HIF-1 también es un sensor de hipoxia, que podría estar relacionado con la hipoxia temporal que se produce durante el parto vaginal. Es importante considerar que esto podría ser una limitación de nuestro estudio, sin embargo, nuestro protocolo para la purificación celular tomó dos días, en los que las células neonatales y adultas estaban en las mismas condiciones normóxicas. Durante este tiempo, la mayoría de los genes relacionados

con el estrés y la hipoxia deberían haberse dejado de expresar, como el propio gen HIF, que no estaba sobreexpresado en las muestras neonatales. También encontramos la sobreexpresión del gen transportador de monocarboxilato (SLC16A3), que funciona en la exportación de L-lactato y está altamente expresado en tejidos glucolíticos y anaeróbicos<sup>103</sup>. Nuestros resultados sugieren que las células T CD4<sup>+</sup> neonatales tienen un programa metabólico dependiente de la glucólisis aeróbica. Las células T CD4<sup>+</sup> neonatales podrían estar utilizando la glucólisis aeróbica para desviar el uso de glucosa para la biosíntesis de macromoléculas que se utilizarán para la proliferación.

Adicionalmente, esperamos cambios en el citoesqueleto y la migración en las células neonatales, ya que estas células no solo irán a los ganglios linfáticos, sino que también colonizarán los tejidos de la mucosa. En este sentido, la expresión de genes implicados en la migración a la mucosa en células no estimuladas también se observó en las células T CD8<sup>+</sup> neonatales no estimuladas<sup>46</sup>.

Además, encontramos un sesgo regulatorio en las células T CD4<sup>+</sup> neonatales. Este sesgo regulatorio también se observó en células T CD4<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical estimuladas (TCR/CD28) en comparación con células de adulto tratadas de manera similar, principalmente hacia células Th17 reguladoras, con una expresión más baja de IL 17 y su factor de transcripción característico ROR $\gamma$ T, y una expresión más alta de FoxP3<sup>104</sup>. Recientemente se publicó que las células T CD4<sup>+</sup> neonatales tienen un perfil Th17 inmunoregulador caracterizado por la expresión de IL-22, aparentemente debido a diferencias en la vía de señalización de TGF- $\beta$ <sup>105</sup>.

Los factores de transcripción sobreexpresados en las células T CD4<sup>+</sup> de adultos están relacionados con la función típica de las células T, como T-bet (TBX21) y STAT4, los factores de transcripción característicos de Th1, y EOMES, que caracteriza a las células de memoria. La presencia de estos factores no implica que las células no sean vírgenes, sino que la expresión basal, debido a la cromatina abierta en las células vírgenes adultas, puede prepararlas para la diferenciación efectora o de memoria, particularmente el perfil Th1. Lo que implica que las células neonatales tienen cerrada la cromatina en estas regiones, provocando una menor

expresión de estos genes, comparados con las células de adulto.

En este sentido, en un análisis epigenético realizado en el laboratorio, empleando los datos de ChIP-seq del consorcio BLUEPRINT, encontramos que los genes sobreexpresados en neonatos tienen menos marca de cierre (H3K27me3) en sus promotores y tienen regiones génicas con marcas de enhancers activos (H3Kme1, H3K27ac) e intergénicos (H3K27ac, H3K36me3), por lo que esta sobreexpresión está regulada a nivel epigenético. Esto es en congruencia con otros estudios donde se mostraron diferencias epigenéticas y transcriptómicas entre células T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos<sup>106</sup>.

Además, de acuerdo con los datos de RNA-seq, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonato expresan muy bajos niveles de citocinas Th, a comparación de las células de adulto en estado basal y activado. De hecho, las células de neonato en respuesta a las señales de CD3/CD28 solo expresan IL-2, a diferencia de las células de adulto. Por lo tanto, las células de neonato parecen ser hipo-responsivas ante las señales de CD3/CD28.

Por otro lado, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> nacidos por cesárea comparados con los de parto natural tienen diferencias en la expresión génica. En total, encontramos 600 genes diferencialmente expresados en estos tipos celulares, de los cuales 402 genes están sobreexpresados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos nacidos por parto vaginal y 198 en neonatos nacidos por cesárea. La anotación funcional arrojó varias vías sobrerrepresentadas en las células de los neonatos nacidos por parto vaginal, donde vías de señalización de diversas citocinas, como IL17 y TNF, receptores tipo NOD, MAPKs, NF- $\kappa$ B y enfermedades inflamatorias salieron sobrerrepresentadas. Esto sugiere que el parto natural representa un “priming inmunológico” o una leve activación del linfocito T CD4<sup>+</sup> neonatal. Por otro lado, las otras comparaciones no arrojaron vías sobrerrepresentadas.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el parto vaginal implica que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tengan cierta activación o priming que, sin embargo, deja a los neonatos con un perfil hiperproliferativo, glucolítico, pero tolerante o con una baja activación. Lo que, en el contexto del nacimiento, probablemente sea apropiado para evitar una fuerte respuesta inflamatoria a los antígenos inocuos del medio

ambiente al momento del nacimiento.

## Referencias

1. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S33–S40 (2010).
2. Abul K. Abbas. *Inmunología celular y molecular. Journal of Chemical Information and Modeling* vol. 53 (2015).
3. Kindt, T. J. *inmunología de Kuby. Katalog BPS* vol. XXXIII (2014).
4. Lee, H. G., Cho, M. Z. & Choi, J. M. Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp. Mol. Med.* **52**, 1255–1263 (2020).
5. Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C. & Sprent, J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2088–2094 (2009).
6. Fathman, C. G. & Lineberry, N. B. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 599–609 (2007).
7. Taghon, T. *et al.* Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: Implications for human T-cell development. *Leukemia* **17**, 1157–1163 (2003).
8. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
9. Nurieva, R. I. *et al.* A Costimulation-Initiated Signaling Pathway Regulates NFATc1 Transcription in T Lymphocytes. *J. Immunol.* **179**, 1096–1103 (2007).
10. Palmer, C. S., Ostrowski, M., Balderson, B., Christian, N. & Crowe, S. M. Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front. Immunol.* **6**, 1–7 (2015).
11. Chang, C. H. *et al.* XPosttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* **153**, 1239 (2013).

12. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C. H. & Jones, R. G. Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* (80-. ). **342**, (2013).
13. Michalek, R. D. *et al.* Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4 + T Cell Subsets . *J. Immunol.* **186**, 3299–3303 (2011).
14. Filigheddu, N. *et al.* Santiago M. Di Pietro,\* Juan M. Falco ´n-Pe ´rez,\* Danie `le Tenza,† Subba R.G. Setty,‡ Michael S. Marks,‡ Grac ´a Raposo,† and Esteban C. Dell’Angelica\*. *Mol. Biol. Cell* **18**, 986–994 (2007).
15. Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y. & Rathmell, J. C. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* **111**, 2101–2111 (2008).
16. Dimeloe, S., Gr, J. & Hess, C. T-cell metabolism governing activation , proliferation and differentiation ; a modular view. 35–44  
doi:10.1111/imm.12655.
17. Abul K. Abbas. *Inmunología celular y molecular. Journal of Chemical Information and Modeling* vol. 53 (2012).
18. Buck, M. D., O’Sullivan, D. & Pearce, E. L. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* **212**, 1345–1360 (2015).
19. Caron, G. *et al.* Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN-γ Production by Memory CD4+ T Cells. *J. Immunol.* **175**, 1551–1557 (2005).
20. Mccarron, M. & Reen, D. J. Immunomodulation by Direct TLR2 or TLR5 Stimulation 1. *J. Immunol.* (2009).
21. Lee, C. C., Avalos, A. M. & Ploegh, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 168–179 (2012).
22. Rodríguez-Jorge, O. *et al.* Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4+ T cell activation. *Sci. Signal.* **12**, 1–11 (2019).
23. López-Yglesias, A. H. *et al.* Flagellin Induces Antibody Responses through a TLR5- and Inflammasome-Independent Pathway. *J. Immunol.* **192**, 1587–1596 (2014).



24. Mizel, S. B. & Bates, J. T. Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. *J. Immunol.* **185**, 5677–5682 (2010).
25. Galindo-Albarrán, A. O. *et al.* CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Rep.* **17**, 2151–2160 (2016).
26. (UNICEF), U. N. C. F. *Child Levels & Trends in Mortality. Report 2022.* (2022).
27. (UNICEF), U. N. C. F. *Child Levels & Trends in Mortality. Report 2019.* (2019).
28. Basha, S., Surendran, N. & Pichichero, M. Immune responses in neonates. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1171–1184 (2014).
29. Zaghouani, H., Hoeman, C. M. & Adkins, B. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol.* **30**, 585–591 (2009).
30. Takase, K. & Saito, T. T cell activation. *Ryumachi* **35**, 853–861 (1995).
31. Brownlie, R. J. & Zamoyska, R. T cell receptor signalling networks: Branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 257–269 (2013).
32. Molina, G. *et al.* Relationship between cesarean delivery rate and maternal and neonatal mortality. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **314**, 2263–2270 (2015).
33. WHO Statement on caesarean section rates. *Reproductive health matters* vol. 23 149–150 (2015).
34. Angolile, C. M., Max, B. L., Mushemba, J. & Mashauri, H. L. Global increased cesarean section rates and public health implications: A call to action. *Heal. Sci. Reports* **6**, 1–5 (2023).
35. Uribe-Leitz, T. *et al.* Trends of caesarean delivery from 2008 to 2017, Mexico. *Bull. World Health Organ.* **97**, 502–512 (2019).
36. ARTETA, I. Más cesáreas que partos naturales en México. Por la pandemia, el sector salud deja a las mujeres sin opción a elegir | COVID-19: La pandemia que agravó la desigualdad de género. <https://mujeres-covid-mexico.animalpolitico.com/aumento-cesareas-sin-opcion> (2020).
37. Blustein, J. & Liu, J. Time to consider the risks of caesarean delivery for long

- term child health. *BMJ* **350**, 1–4 (2015).
38. Cardwell, C. R. *et al.* Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* **51**, 726–735 (2008).
  39. Abrahamsson, T. R. *et al.* Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin. Exp. Allergy* **44**, 842–850 (2014).
  40. Kozyrskyj, A. L., Bahreinian, S. & Azad, M. B. Early life exposures: Impact on asthma and allergic disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **11**, 400–406 (2011).
  41. Nielsen, N. M. *et al.* Cesarean section and offspring's risk of multiple sclerosis: A Danish nationwide cohort study. *Mult. Scler. J.* **19**, 1473–1477 (2013).
  42. Sevelsted, A., Stokholm, J., Bønnelykke, K. & Bisgaard, H. Cesarean section chronic immune disorders. *Pediatrics* **135**, e92–e98 (2015).
  43. Cho, C. E. & Norman, M. Cesarean section and development of the immune system in the offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **208**, 249–254 (2013).
  44. Zhang, X., Zhivaki, D. & Lo-Man, R. Unique aspects of the perinatal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 495–507 (2017).
  45. Qazi, K. R. *et al.* Extremely Preterm Infants Have Significant Alterations in Their Conventional T Cell Compartment during the First Weeks of Life. *J. Immunol.* **204**, 68–77 (2020).
  46. Gutiérrez-Reyna, D. Y. *et al.* IL-12 Signaling Contributes to the Reprogramming of Neonatal CD8+ T Cells. *Front. Immunol.* **11**, 1–14 (2020).
  47. Sánchez-Villanueva, J. A. *et al.* Contribution of ROS and metabolic status to neonatal and adult CD8+ T cell activation. *PLoS One* **14**, 1–12 (2019).
  48. Rodríguez-Jorge, O. Evaluación de la correulación de las vías de señañización de CD43 y los TLRs en linfocitos T CD4 de adultos y neonatos humanos. Tesis de Licenciatura. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2011).
  49. Rodríguez-Jorge, O. Modelado de la respuesta de activación de los Linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos humanos a las señales del receptor

- de células T (TCR) y el Receptor tipo Toll 5 (TLR5). (2018).
50. Kempis-Calanis, L. A. Evaluación de la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF-kB en linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos humanos. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2018).
  51. Labastida-Conde, R. G. Evaluación de las señales a través de TLR5 en la activación de células T CD4+ de neonatos y adultos humanos in vitro y en un modelo de vacunación neonatal por rotavirus in vivo. Tesis de Doctorado. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2019).
  52. Kempis-Calanis, L. A. Evaluación de la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF-kB en linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos humanos. Tesis de Maestría. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2018).
  53. Ares, M. Methods for processing high-throughput RNA sequencing data. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, 1139–1148 (2014).
  54. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
  55. Dobin, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
  56. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14**, 178–192 (2013).
  57. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
  58. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21 (2014).
  59. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.* **16**, 284–287 (2012).
  60. Elahi, S. New insight into an old concept: Role of immature erythroid cells in immune pathogenesis of neonatal infection. *Front. Immunol.* **5**, 1–7 (2014).
  61. Shin, J. Y. *et al.* CD4+ VEGFR1HIGH T cell as a novel Treg subset regulates

- inflammatory bowel disease in lymphopenic mice. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 592–603 (2015).
62. He, F. *et al.* PLAU inferred from a correlation network is critical for suppressor function of regulatory T cells. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 1–19 (2012).
  63. Schmidleithner, L. *et al.* Enzymatic Activity of HPGD in Treg Cells Suppresses Tconv Cells to Maintain Adipose Tissue Homeostasis and Prevent Metabolic Dysfunction. *Immunity* **50**, 1232-1248.e14 (2019).
  64. Sompallae, R. *et al.* A comprehensive promoter landscape identifies a novel promoter for CD133+ in restricted tissues, cancers, and stem cells. *Front. Genet.* **4**, 1–10 (2013).
  65. Beachy, S. H. *et al.* Isolated Hoxa9 overexpression predisposes to the development of lymphoid but not myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* **41**, 518-529.e5 (2013).
  66. Tremblay, C. S., Hoang, T. & Hoang, T. Early T cell differentiation: Lessons from T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **92**, 121–156 (2010).
  67. Piccaluga, P. P. *et al.* Platelet-derived growth factor alpha mediates the proliferation of peripheral T-cell lymphoma cells via an autocrine regulatory pathway. *Leukemia* **28**, 1687–1697 (2014).
  68. Astolfi, A. *et al.* MYCN is a novel oncogenic target in pediatric T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Oncotarget* **5**, 120–130 (2014).
  69. Cleveland, S. M. *et al.* Lmo2 induces hematopoietic stem cell-like features in T-cell progenitor cells prior to leukemia. *Stem Cells* **31**, 882–894 (2013).
  70. Cendrowski, J. *et al.* Splicing variation of bmp2k balances abundance of copii assemblies and autophagic degradation in erythroid cells. *Elife* **9**, 1–26 (2020).
  71. Wang, G. G., Pasillas, M. P. & Kamps, M. P. Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood* **106**, 254–264 (2005).
  72. Donangelo, I. & Melmed, S. Pituitary adenomas. *Handb. Neuroendocrinol.*

- 739–760 (2012) doi:10.1016/B978-0-12-375097-6.10034-4.
73. Jang, S. W. *et al.* Homeobox protein Hhex negatively regulates Treg cells by inhibiting Foxp3 expression and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 25790–25799 (2019).
  74. Thoms, J. A. I. *et al.* ERG promotes T-acute lymphoblastic leukemia and is transcriptionally regulated in leukemic cells by a stem cell enhancer. *Blood* **117**, 7079–7089 (2011).
  75. Boileau, M. *et al.* Mutant H3 histones drive human pre-leukemic hematopoietic stem cell expansion and promote leukemic aggressiveness. *Nat. Commun.* **10**, 1–12 (2019).
  76. Arnhold, J., Furtmüller, P. G. & Obinger, C. Redox properties of myeloperoxidase. *Redox Rep.* **8**, 179–186 (2003).
  77. Zeng, W., Song, Y., Wang, R., He, R. & Wang, T. Neutrophil elastase: From mechanisms to therapeutic potential. *J. Pharm. Anal.* **13**, 355–366 (2023).
  78. Linzmeier, R. M. & Ganz, T. Copy number polymorphisms are not a common feature of innate immune genes. *Genomics* **88**, 122–126 (2006).
  79. Hsu, W. C. *et al.* DUSP6 mediates T cell receptor-engaged glycolysis and restrains TFH cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E8027–E8036 (2018).
  80. Walther, D. *et al.* Tetraspanin 7 autoantibodies in type 1 diabetes. *Diabetologia* **59**, 1973–1976 (2016).
  81. Perner, S. *et al.* Loss of SLC45A3 protein (prostein) expression in prostate cancer is associated with SLC45A3-ERG gene rearrangement and an unfavorable clinical course. *Int. J. Cancer* **132**, 807–812 (2012).
  82. Nweke, E. *et al.* Increased expression of plakoglobin is associated with upregulated MAPK and PI3K/AKT signalling pathways in early resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol. Lett.* **19**, 4133–4141 (2020).
  83. Stephensen, C. B., Borowsky, A. D. & Lloyd, K. C. K. Disruption of Rxra gene in thymocytes and T lymphocytes modestly alters lymphocyte frequencies, proliferation, survival and T helper type 1/type 2 balance. *Immunology* **121**, 484–498 (2007).

84. Konen, J. M. *et al.* Ntrk1 promotes resistance to PD-1 checkpoint blockade in Mesenchymal Kras/p53 mutant lung cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
85. Geltink, R. I. K., Kyle, R. L. & Pearce, E. L. Unraveling the Complex Interplay between T Cell Metabolism and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 461–488 (2018).
86. Finlay, D. K. *et al.* PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **209**, 2441–2453 (2012).
87. Li, X. *et al.* Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Mol. Cell* **61**, 705–719 (2016).
88. Tossetta, G., Piani, F., Borghi, C. & Marzioni, D. Role of CD93 in Health and Disease. *Cells* **12**, 1–20 (2023).
89. Chaki, M. *et al.* Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell* **150**, 533–548 (2012).
90. Kadoch, C. *et al.* Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat. Genet.* **45**, 592–601 (2013).
91. Bordon, Y. TOX for tired T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 476 (2019).
92. Alharbi, R. A., Pettengell, R., Pandha, H. S. & Morgan, R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* **27**, 1000–1008 (2013).
93. Manley, N. R. & Capecchi, M. R. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* **121**, 1989–2003 (1995).
94. Tada, Y. *et al.* Epigenetic modulation of tumor suppressor CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  activity in lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 396–406 (2006).
95. Zakhour, R. *et al.* CD31 Expression on CD4 + Cells : A Simple Method for Quantitation of Recent Thymus Emigrant CD4 Cells. **95**, 970–972 (2016).
96. Sundvold, V. *et al.* Cutting Edge: T Cell-Specific Adapter Protein Inhibits T

- Cell Activation by Modulating Lck Activity. *J. Immunol.* **165**, 2927–2931 (2000).
97. Labastida-Conde, R. G. *et al.* Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4+ T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine* **36**, 4188–4197 (2018).
  98. Bogunia-Kubik, K., Perez-Cruz, I., Fallen, P. R., Madrigal, J. A., & Cohen, S. B. Cord blood lymphocytes have a low frequency of cytokine. *Immunol. Lett.* **72**, 145–146 (2000).
  99. Miscia, S. *et al.* Inefficient Phospholipase C Activation and Reduced Lck Expression Characterize the Signaling Defect of Umbilical Cord T Lymphocytes. *J. Immunol.* **163**, 2416–2424 (1999).
  100. Magli, M. C., Largman, C. & Lawrence, H. J. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* **173**, 168–177 (1997).
  101. Cieslak, A. *et al.* Blueprint of human thymopoiesis reveals molecular mechanisms of stage-specific TCR enhancer activation. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).
  102. Kouidhi, S., Elgaaied, A. B. & Chouaib, S. Impact of metabolism on T-cell differentiation and function and cross talk with tumor microenvironment. *Front. Immunol.* **8**, 1–13 (2017).
  103. Yu, S. *et al.* Comprehensive analysis of the SLC16A gene family in pancreatic cancer via integrated bioinformatics. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).
  104. Miyagawa, Y. *et al.* Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* **128**, 405–419 (2009).
  105. Razzaghian, H. R. *et al.* Neonatal T Helper 17 Responses Are Skewed Towards an Immunoregulatory Interleukin-22 Phenotype. *Front. Immunol.* **12**, 1–10 (2021).
  106. Bermick, J. R. *et al.* Differences in H3K4me3 and chromatin accessibility contribute to altered T-cell receptor signaling in neonatal naïve CD4 T cells. *Immunol. Cell Biol.* **100**, 562–579 (2022).

## Anexo

### Publicaciones realizadas

1. Kempis-Calanis, L. A., Rodríguez-Jorge, O., Ventura-Martínez, C. J., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Spicuglia, S., & Santana, M. A. (2023). Unique Characteristics of Neonatal T Cells. *Medical Research Archives*, 11(1).
2. Kempis-Calanis, L. A., Rodríguez-Jorge, O., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Ventura-Martínez, C. J., Spicuglia, S., Medina-Rivera, A., ... & Santana, M. A. (2023). Neonatal CD4+ T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with proliferation and yet a limited immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, qiad162.
3. Votos aprobatorios



Published: January 31, 2023

**Citation:** Kempis-Calanis LA, Rodríguez-Jorge O, et al., 2022. Unique Characteristics of Neonatal T Cells, Medical Research Archives, [online] 11(1).

<https://doi.org/10.18103/mra.v11i1.3568>

Copyright: © 2022 European Society of Medicine. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

DOI

<https://doi.org/10.18103/mra.v11i1.3568>

ISSN: 2375-1924

## RESEARCH ARTICLE

### Unique Characteristics of Neonatal T Cells

**Kempis-Calanis L. A.<sup>1</sup>, Rodríguez-Jorge O.<sup>1</sup>, Ventura-Martínez C.J.<sup>1</sup>, Gutiérrez-Reyna D.Y.<sup>1,3</sup>, Spicuglia S.<sup>2,4</sup>, Santana M.A.\*<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Celular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62210, Cuernavaca, México.

<sup>2</sup>Aix-Marseille University, Inserm, TAGC, UMR1090, 13288, Marseille, France.

<sup>3</sup>Present address Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62209, Cuernavaca, Mexico

<sup>4</sup>Equipe Labelisée Ligue contre le cancer

\*Correspondence: [santana@uaem.mx](mailto:santana@uaem.mx)

#### ABSTRACT

Birth causes complex changes in the individual physiology and organ systems and certainly poses a big immune challenge. The sudden encounter with an antigen full world, with the exposure to food antigens, and the colonization of the skin and mucosa with microbiota, require a tolerant immune system. Nevertheless, neonates must also be able to deal with pathogens, which makes their immune system unique. T lymphocytes are responsible for the coordination of the adaptive immune system response, the elimination of infected cells and the type of immune response and memory. It has been shown that neonatal cells have intrinsic differences with adult cells, biased towards an innate response and a tolerant phenotype.

In the perinatal period, the immune system changes from basal signaling and innate like responses, towards stimulus-specific signals, which increase with gestational age. After birth the cells of the immune system continue to change both in composition and function.

In this review, we present the intrinsic differences of neonatal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, as compared with adult naïve cells. A specific transcriptome profile is present in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> neonatal T cells, with overexpression of homeobox transcription factors. These cells also present differences in cell signaling and metabolic characteristics, which result in unique functional capabilities. Neonatal CD4<sup>+</sup> T cells respond differently from adult cells, with a high production of IL-8, a prevalent Th2 over Th1 profile, and an innate inflammatory response.

The neonatal period is one of the most vulnerable periods of life, with a high morbidity and mortality rate, approaching on average 17 deaths per 1000 live births worldwide. A better understanding of the neonatal immune system will help to ensure a better care of this vulnerable population.

## Introduction

Birth causes complex changes leading, among others, to increased oxygen levels, changes in blood circulation, endocrine and metabolic changes<sup>1</sup> and certainly poses a big immune challenge. The sudden encounter with an antigen full world, with the exposure to food antigens, and the colonization of the skin and mucosa with microbiota, require a tolerant immune system. Nevertheless, neonates must also be able to deal with pathogens, which makes their immune system unique<sup>2</sup>.

The neonatal period is one of the most vulnerable periods of life, with the highest morbidity and mortality rates, approaching on average 17 deaths per 1000 live births worldwide. Infections account for 24% of deaths and they often leave life-long sequels<sup>3</sup>.

The evaluation of the immune system of premature and mature neonates, with single-cell sequencing and the construction of an elastic net model, showed that it changes along gestational age. In the most premature neonates, basal signaling and innate-like responses are dominant, whereas the stimulus-specific signals increase with gestational age<sup>4</sup>. After birth cells continue to change both in composition and in function<sup>5-7</sup> and even in 12 years old children, some differences with the adult immune system still remain<sup>6</sup>.

T lymphocytes are responsible for the coordination of adaptive immune system response, the elimination of infected cells and the type of immune memory. It has been shown that neonatal cells have intrinsic differences with adult cells, biased towards an innate response and a tolerant phenotype, but an innate inflammatory response<sup>8-11</sup>.

This paper reviews some of the main intrinsic differences of neonatal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as compared to the naïve adult cells, from the transcriptomic, epigenetic and functional points of view. This will be addressed in five paragraphs, presenting the unique characteristics of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, the unique and puzzle role of homeobox transcription factors overexpressed by the neonatal cells, as well as their metabolic characteristics. A better knowledge of neonatal T cells could contribute to better address the medical care of the vulnerable population of newborn babies.

### Neonatal CD4<sup>+</sup> T cells and tolerant phenotype

CD4<sup>+</sup> T cells orchestrate the adaptive immune response. For this, T cell have to be activated, proliferate, and differentiate into an effector or memory phenotype. For T cell activation to occur, two types of signals are necessary: (1) the recognition of the MHC-bound antigen through its T

cell receptor (TCR), and (2) costimulatory signals through CD28, and/or cytokines produced by APCs. When the T cell receives both types of signals, gene transcription, cytokine secretion, expression of surface molecules, and cell proliferation are promoted<sup>12-14</sup>.

An activated CD4<sup>+</sup> T cell can differentiate into several effector phenotypes, the best reported being Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, and T<sub>reg</sub>, with distinctive functions. Th1 cells secrete IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and their main function is to fight intracellular pathogens<sup>15</sup>. Th2 cells secrete interleukin 4 (IL-4), IL-5 and IL-13, and eradicate helminths<sup>16</sup>. Th9 cells secrete IL-9 and are important for tumor immunity<sup>17</sup>. Th17 cells secrete IL-17A and IL-17F and have a protective role against extracellular bacteria and fungi<sup>18</sup>. Th22 cells secrete IL-22 and have a role in skin homeostasis and inflammation<sup>19</sup>. In contrast, T<sub>reg</sub> cells suppress the immune response of other effector cells by secreting IL-10 and TGF- $\beta$ <sup>20</sup>.

The adaptive immune response early in life is different to that of an adult, which is partly result of the gestational period. During pregnancy, the fetus has a limited exposure to antigens in the uterus and its adaptive immune response is tolerant. The mother's immune system also has to be tolerant to the fetus, which is achieved in part by the T<sub>regs</sub> that suppress the activation and function of effector cells<sup>21</sup>. If an infection occurs during pregnancy and the fetal immune system is activated, the suppressive activity of T<sub>regs</sub> could be reduced, the production of pro-inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$  and IL-1- $\beta$  augments and labor can be prematurely induced<sup>22-24</sup>. Besides, placental tissues secrete TGF- $\beta$ , prostaglandin E2 and progesterone, which promote a Th2 differentiation, to avoid a Th1 response that leads to pregnancy termination.

Two possible models have been proposed to explain the differences between neonate and adult T cells responses: (1) fetal and adult T cells arise from different hematopoietic progenitor cells, and neonatal cells have remnants of those fetal cells. (2) There is a continuous progression from the fetal to adult phenotypes, and the newborn cells suffer a progressive change that continues even a couple of months after birth<sup>11</sup>.

In general, neonatal CD4<sup>+</sup> T cells are considered immunotolerant, with minimal protective functions, which results in a high dependency of the neonates on their innate immune system<sup>25,26</sup>. It has also been reported that peripheral and cord blood from neonates have a predisposition to mount a Th2 response (IL-4, IL-5, IL-10) with the concomitant low production of Th1 cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF- $\alpha$ )<sup>27</sup>. As a result, neonates are highly susceptible to infections caused by viruses and

intracellular bacteria<sup>28</sup>. In addition, neonatal T cells produce CXCL-8 and express complement receptors (CR), typically considered innate immunity, in comparison to adult T cells<sup>29</sup>. IL-8 secreted by neonatal T cells play a role to recruit and activate neutrophils and  $\gamma\delta$  T cells during infection and inflammatory lung injury<sup>30,31</sup>.

Neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, like their CD8<sup>+</sup> counterparts, present a distinct transcriptomic and epigenetic landscape when compared to adult cells. They present differences in DNA methylation, chromatin landscape and micro-RNA expression. In fact, the long-standing observation that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells from cord blood present hypermethylation of CpG and non-CpG sites in the promoter of IFN- $\gamma$  gene<sup>32</sup>.

Single-cell and bulk RNA-seq technologies have been used to demonstrate that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells present a characteristic gene expression profile, which is different from the fetal and adult counterparts. Using a set of 33 differentially expressed genes, Bunis *et. al.* have shown that cord blood naïve CD4<sup>+</sup> T cells present an intermediate mean “developmental score” between fetal and adult CD4<sup>+</sup> T cells, where the expression of a set of genes is shared with fetal cells and others with adult cells. Of notice, the pathway annotation analysis shows that classical immune functions such as Th1, Th2 and Th17 differentiation is absent in these neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, which instead expressed genes related to intracellular signaling and cell cycle, and partially retain a T<sub>reg</sub> signature already present in fetal cells<sup>33,34</sup>. It has also been found that genes from the TCR signaling pathway (CD4, CD3, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , LAT, LCK and ITK) are downregulated in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells while others are upregulated (JUN, NFKB1), when compared to adult cells. This was associated with a low TCR/CD28-mediated signaling and low expression of activation related genes like CD69, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17A, and TNF- $\alpha$ . In this study, the downregulated genes of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells were linked to inaccessible chromatin, while overexpressed genes in adult cells had a strong association with the open chromatin mark H3K4me3 peaks and accessible chromatin (ATAC-seq)<sup>35</sup>. Another study has also shown differences in the accessibility of chromatin as a feature determining the level of gene expression in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells and other cord blood cells<sup>36</sup>.

We have also studied the transcriptomic profile of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells and found that these cells present an overexpression of metabolism related, innate-like and cell cycle genes, and a low expression of activation-related genes like IFN- $\gamma$ , and TBX21. We were able to link the

overexpression of genes in the neonatal cells with the epigenetic profile of promoters and putative enhancers (Kempis-Calanis *et.al.* submitted). We have also found that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells proliferate more than adult naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Altogether this shows that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells are able to respond to stimulation, but not in a conventional way, relying more in innate-like responses and a tolerogenic and Th2 bias.

### Neonatal CD8<sup>+</sup> T cells and innate behavior

The main function of CD8<sup>+</sup> T cells is to eliminate infected or nonfunctional cells. To characterize these cells in neonates, our group evaluated the transcriptome of neonatal CD8<sup>+</sup> T cells as compared to the adult naïve CD8<sup>+</sup> T cells. We observed that the neonatal cells overexpressed genes associated with a neutrophil-like innate immune response, including the genes of antimicrobial peptides (DEFA4, DEFA3 and CTSG), elastase (ELANE) and the transcriptional factor CEBPE involved in development of granulocytes<sup>8</sup>. The neonatal cells were deficient in IFN- $\gamma$  production and cytotoxic response and produced a higher level of reactive oxygen species, particularly in the mitochondria, which could contribute to the lower cytotoxic function of these cells<sup>37</sup>. We then asked whether this was a transitional immature population or if these neonatal cells were able to mature into a more adult-like phenotype. Indeed, upon activation in the presence of IL-12 signals, these cells downregulated the innate-like genes and expressed the genes associated with T cell receptor (TCR) signaling and the cytotoxic response<sup>9</sup>. This higher activation was related to a more balanced metabolic profile. In agreement with the capability of neonatal CD8<sup>+</sup> T cells to mount a strong response under strong challenges, it was reported that in neonatal mice, IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> T cells were observed after infection with the enteropathogen *Y. enterocolitica*<sup>38</sup>. The generation of effector cells under acute viral lung infections has been observed in the lungs of 6-week-old children and neonatal mice, with a prevalence of effector rather than memory cell generation<sup>30,39</sup>.

Among the specific characteristics of cord blood CD8<sup>+</sup> T cells is the high expression levels of the chemokine CXCR3 and the transcription factor Eomes, associated with memory T cells<sup>40</sup>. This Eomes<sup>+</sup> innate-like CD8<sup>+</sup> T cells were also identified in human fetal thymuses, and young infants up to 3 months old<sup>41</sup>. Remarkably, IL-4 promotes an innate-like program in CD8SP thymocytes, with the expression of CXCR3, CD44 and Eomes but not T-bet.

Another remarkable characteristic of the neonatal cells is the expression of NK cells-like

receptors, among these, the C-type lectin family NKG2 receptors (CD159) and the immunoglobulin (Ig) superfamily killer Ig-like receptors (KIR) expressed in 0.74% and 1.67% neonatal CD8<sup>+</sup> T cells respectively<sup>42</sup>. In addition, neonatal CD8<sup>+</sup> T cells express the co-inhibitory receptor killer-cell lectin like receptor G 1, which is present in the 20% of neonatal CD8<sup>+</sup> T cells<sup>43</sup>. This could also account for the higher activation threshold of the neonatal CD8<sup>+</sup> T cells<sup>44</sup>.

### The puzzling role of Homeobox gene expression in neonatal cells

An intriguing observation regarding the differential gene expression between neonatal and adult naive T cells is their transcription factor signature expression. Many transcription factors encoding genes expressed at higher level in neonatal T cells are generally expressed in hematopoietic and immature T cell precursors and found overexpressed in T-Acute Lymphocytic Leukemia (T-ALL). These genes include LMO2, HHEX, MEIS1, HOXA9, HOXA10 and BCL11A in CD4<sup>+</sup> T cells (Kempis-Calanis, submitted) and BCL11A, MYCN, HOXA3, and MEOX1 in CD8<sup>+</sup> T cells<sup>8,9</sup>. Remarkably, these genes are expressed in normal hematopoietic or early T cell precursors in the thymus (i.e. CD34<sup>+</sup> thymocytes) but are then switched off during T cell differentiation and maturation<sup>45,46</sup>. Moreover their ectopic or sustained expression in the T cell lineage is associated with a differentiation blockage and hyperproliferation<sup>45</sup>. For instance, the HOXA family of genes play a key role in controlling cell identity and differentiation of hematopoietic stem cells (HSC) and T cell progenitors<sup>47-49</sup>. The progressive down-modulation of HOXA transcripts has been reported during thymic cell maturation<sup>46,50</sup>, while the sustained expression of HOXA genes during T cell differentiation has been shown to impair T cell maturation and to induce oncogenic transformation<sup>47,50,51</sup>. Similarly, LMO2, MEOX1, MEIS1 are major T-ALL oncogenes and are normally expressed in HSCs and contribute to the stemness of the HSC cells<sup>45</sup>. Whether the expression of these transcriptional regulators might impose an “immature” epigenetic state contributing to the proliferative and more tolerant immune response phenotype of the neonatal T cells will require further investigation.

### Cell signaling in neonatal cells

T cells are activated upon recognition of the peptide-MHC complex by the TCR, and costimulatory molecules presented by dendritic cells or secreted by these or other neighboring cells in the lymph nodes. The costimulatory molecules CD80 and CD86 whose ligand is CD28 in the surface of T

cell is the best studied costimulatory pair, but other receptors, cytokines and parts of the antigens traveling in the lymph can also provide important activation signals.

In a very general way, signals through the TCR start by the phosphorylation of immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) present in the intracellular domains of the invariable molecules named CD3 and  $\zeta$ , which are associated with the antigen recognition pair ( $\alpha/\beta$  or  $\gamma/\delta$  chains). This phosphorylation is due to the enzymatic activity of Lck, which is associated with the intracellular domains of co-receptor molecules CD4 and CD8. Early signaling proceed with the recruitment of ZAP 70 kinase to the phosphorylated ITAMS, which in turn phosphorylates and activates Lat, a transmembrane protein that is responsible for the recruitment and activation of several intermediary proteins that end up activating three main families of transcription factors: AP-1, NF $\kappa$ B and NFAT, through the activation of MAP kinase cascades, PKC $\theta$  and Calcium waves, respectively<sup>52</sup>.

It has been reported that TCR early signaling could be impaired in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, due to differences in chromatin accessibility and a lower expression of important signaling molecules, such as Lat and Lck<sup>28,35</sup>. Other authors found, however, that calcium flux signals and MAP (Mitogen Activating Protein) kinase activation cascades were even higher in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, probably due to the higher expression of miR-181a. Despite these higher activation of the MAP kinase Erk, AP-1 transcription factor activation was impaired, compromising neonatal CD4<sup>+</sup> T cell activation<sup>53</sup>. The high calcium waves present in neonatal cells could potentially lead to an imbalance in transcription factors' activation. The transcription factor NFAT, activated by calcium waves, is implicated in both, activation and anergy. This is because NFAT binds to DNA motifs often associated with AP-1 in dual motifs sites. When AP-1 is diminished, however, as reported for neonatal cells, NFAT can form homodimers and bind to DNA motifs associated with T cell exhaustion and anergy<sup>54,55</sup>. A single-cell sequencing study of cord blood mononuclear cells, showed a higher expression of the inhibitor of NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , in the neonatal cells, which could potentially further contribute to an unbalance in the main transcription factors' activation in neonatal cells<sup>36</sup>. We have also found differences in the expression of signaling molecules in the neonatal cells, both in CD8<sup>+</sup> and in CD4<sup>+</sup> T cells (Kempis-Calanis et. al. submitted and<sup>8</sup>).

Among the genes that both neonatal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells overexpress are genes associated with cell cycle. This overexpression is related with

a higher rate of homeostatic proliferation in both cell types and a higher clonal expansion in response to stimulation only in the CD4<sup>+</sup> T cell population (Kempis-Calanis et. al. submitted and <sup>8</sup>).

The cytokine IL-12 is also important to induce T cell activation and differentiation, particularly into the Th1 phenotype and cytotoxic functions, which are important for the elimination of intracellular pathogens to which neonatal cells are particularly susceptible. In neonatal cells, IL-12 is not expressed, increasing slowly its levels during childhood <sup>6</sup>. We showed that neonatal CD8<sup>+</sup> T cells respond to activation in the presence of IL-12 with an adult-like expression profile <sup>9</sup>.

Downstream of the TCR signaling cascade, TCR signals are blocked by the overexpression of the phosphatase DUSP-9 and the ubiquitin ligase Cblb (Rodriguez-Jorge unpublished results), further inhibiting the TCR signaling cascade.

Altogether neonatal TCR signaling is inhibited at several points, from early signaling to downstream transcription factors' unbalanced activation and the overexpression of inhibitory molecules. Other signals should be used to reach a more balanced transcription factor activation, when neonatal T cell activation is required for vaccine formulations and during infections. We and others have shown that one such pathway to reach AP-1 and NFκB activation is through TLR engagement, particularly TLR5 <sup>56-58</sup>.

### **Nutrition and metabolism during neonatal T cell responses**

As we have previously stated, neonatal T cell activation is limited and biased towards an innate-like response. We and others have published transcriptomic analyses showing that neonatal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells have a basal glycolytic program (Kempis-Calanis, et.al. submitted and <sup>8,9,37</sup>). However, the metabolism of these cells has not been well characterized and metabolic reprogramming upon activation has not been evaluated.

A big amount of literature has shown an important cross-regulation of metabolism and the immune system, called immunometabolism. This cross-regulation is at the core of many inflammatory, chronic, and infectious diseases, and T cell function has been strongly linked to the metabolic activity of the cell.

Human T cells switch from their quiescent oxidative metabolic program to a highly anabolic one, characterized by elevated glycolysis, pentose phosphate, and glutaminolysis pathways, during an immune response, a process known as metabolic reprogramming or metabolic rewiring. Metabolic reprogramming is necessary to acquire the energy and biosynthetic precursors needed for

proliferation (cell division), differentiation, gene expression, and effector functions, upon T cell activation and has been widely studied in adult cells from human and animal models, especially in the tumor microenvironment <sup>59-61</sup>.

Nutrient uptake and nutrient availability have been linked to the activity of specific pathways in cells, to determine if specific metabolic pathways can alter the activation and differentiation of T cells. Indeed, specific metabolic pathways have a role in T cell differentiation and function, such as the need for aerobic glycolysis for pro-inflammatory Th1/Th17 responses and fatty acid oxidation for T<sub>reg</sub> activation <sup>62-64</sup>. Glucose metabolism is essential for a proper generation of effector T cells and the expression of pro-inflammatory cytokines such as IFN-γ (Buck et al., 2015).

In our previous work, we have shown that in order to reach adult-like expression of activation-related genes like T-bet, IFN-γ, GZMB expression, as well as glycolysis-related and OXPHOS related genes, neonatal CD8<sup>+</sup> T cells need IL-12 along with TCR/CD28 stimulus, which has been show to induce important metabolic changes to promote T cell proliferation and function <sup>9</sup>. Based on these studies, we have proposed that the metabolic status and high production of ROS impair the activation and function of neonatal CD8<sup>+</sup> T cells. We have also found that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells overexpress metabolism-related genes (Kempis-Calanis, submitted), potentially contributing to their activation profile and higher proliferation capacity.

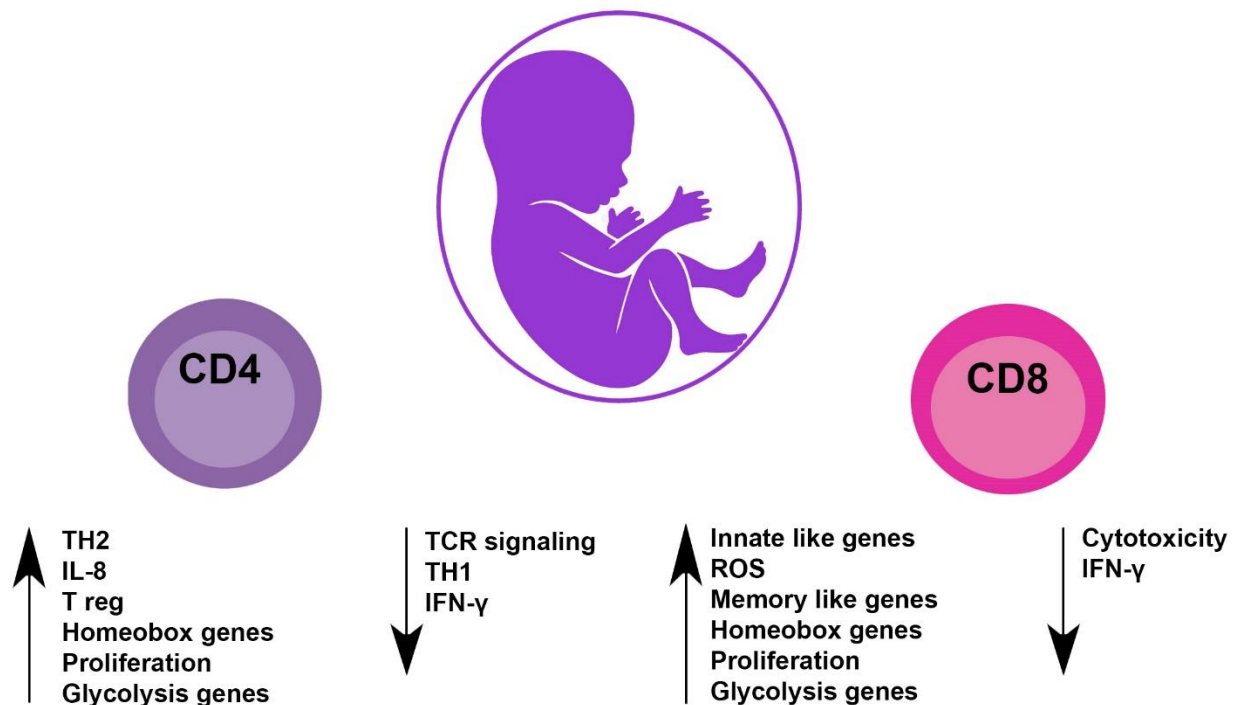
Altogether, studies in humans along with several studies in mice point towards highly proliferative (homeostatic) neonatal naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, which is accompanied by a highly glycolytic program already present in basal conditions <sup>8,65</sup> in agreement with the bias towards a rapid response with low memory generation of the neonatal cells <sup>11,44</sup>. In this regard, the metabolic program could negatively influence the activation response of these cells, since it is well established that in order to achieve full activation and generation of effectors and memory compartments, T cells have to engage an aerobic glycolysis program (effectors) which some cells abandon for an OXPHOS one (memory cells)<sup>62,66-68</sup>. If the metabolic profile of neonatal T cells controls T cell activation, the metabolic modulation of metabolism with specific nutrients could possibly restore T cell activation, differentiation, and function in neonates.

### **Concluding remarks**

The specific response of neonatal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells is associated with a particular transcriptome and epigenetic profile, which obeys

the birth transition but leaves newborn babies vulnerable to infections, causing a high morbidity and mortality rates. A graphical abstract of our findings is presented in Figure 1. The immunetolerant window of newborns is important for their healthy development; however, several avenues could be imagined to improve neonatal T cell response when needed. One of them is the use of alternative ways to balance transcription factors'

activation, in unblocked pathways in the neonatal cells. One such way is the TLR signaling pathway, for instance by the use of the TLR5 agonist, flagellin, to induce AP-1 and NFκB transcription factors and a protective Th1 response in vaccine formulations<sup>56,58</sup>. The other is through nutrient use to improve the metabolic state of the cells.



**Figure 1:** Graphical abstract of the characteristics of neonatal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells

It was reported that hypercholesterolemic mothers give birth to neonates with a stronger pro-Th2 gene expression profile and a propensity to allergy up to 3 years old (Lin et al., 2022). This highlights the importance of proper maternal and newborn nutrition, and diet composition, for the immune development of neonates and infants<sup>69</sup>.

A proper maternal diet, supplementation with immunonutrients and bioactive compounds, and the regulation of specific metabolic pathways, could be interesting therapeutic strategies to target immune cell maturation, metabolic fitness, and the immune response of neonates and adults (68-70). In the case of neonatal T cells, this could lead to improved cellular-mediated immune responses and health.

#### Conflicts of interest Statement

"The authors have no conflicts of interest to declare."

#### Funding Statement

Work in the MAS and OR-J laboratory was supported by CONACYT grants FC 1690 and CF 2019/1727995. Work in the laboratory of SS was supported by recurrent funding from INSERM and Aix-Marseille University, as well as by funding from INCA (PLBIO018-031 INCA\_12619). This work was also supported by ECOS/ANUIES/SEP/CONACYT grant M17S02.

#### Acknowledgments

We thank the blood donors, mothers, babies and staff of Hospital José G. Parres, Hospital Temixco, Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea and Servicios de Salud Morelos for granting the access to neonatal blood and leukocyte concentrates. We also thank the Transcriptomics and Genomics Marseille-Luminy (TGML) platform for sequencing RNA-seq samples. TGML is a member of the France Genomique consortium (ANR-10-INBS-0009).

## References

1. Morton SU, Brodsky D. Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life. *Clin Perinatol.* Sep 2016;43(3):395-407. doi:10.1016/j.clp.2016.04.001
2. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, et al. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol.* Mar 2011;12(3):189-94. doi:10.1038/ni0311-189
3. (<https://www.unicef.org/reports/levels-and-trends-child-mortality-report-2019>). Levels and trends in child mortality report.
4. Peterson LS, Hedou J, Ganio EA, et al. Single-Cell Analysis of the Neonatal Immune System Across the Gestational Age Continuum. *Front Immunol.* 2021;12:714090. doi:10.3389/fimmu.2021.714090
5. Tosato F, Buccioli G, Pantano G, et al. Lymphocytes subsets reference values in childhood. *Cytometry A.* Jan 2015;87(1):81-5. doi:10.1002/cyto.a.22520
6. Upham JW, Lee PT, Holt BJ, et al. Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infect Immun.* Dec 2002;70(12):6583-8. doi:10.1128/IAI.70.12.6583-6588.2002
7. Wang X, Mou W, Qi Z, et al. Neonates are armed with deviated immune cell proportion and cytokine reduction but higher T cell proliferation potentiality. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* Sep 1 2018;50(9):934-937. doi:10.1093/abbs/gmy079
8. Galindo-Albarran AO, Lopez-Portales OH, Gutierrez-Reyna DY, et al. CD8(+) T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Rep.* Nov 15 2016;17(8):2151-2160. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.056
9. Gutierrez-Reyna DY, Cedillo-Banos A, Kempis-Calanis LA, et al. IL-12 Signaling Contributes to the Reprogramming of Neonatal CD8(+) T Cells. *Front Immunol.* 2020;11:1089. doi:10.3389/fimmu.2020.01089
10. Razzaghian HR, Sharafian Z, Sharma AA, et al. Neonatal T Helper 17 Responses Are Skewed Towards an Immunoregulatory Interleukin-22 Phenotype. *Front Immunol.* 2021;12:655027. doi:10.3389/fimmu.2021.655027
11. Rudd BD. Neonatal T Cells: A Reinterpretation. *Annu Rev Immunol.* Apr 26 2020;38:229-247. doi:10.1146/annurev-immunol-091319-083608
12. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* Apr 2013;13(4):227-42. doi:10.1038/nri3405
13. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* Jul 2015;74(1):5-17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011
14. Takase K, Saito T. [T cell activation]. *Ryumachi.* Oct 1995;35(5):853-61.
15. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-58. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942
16. Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* Jun 2013;14(6):536-42. doi:10.1038/ni.2617
17. Chen J, Guan L, Tang L, et al. T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases. *DNA Cell Biol.* Oct 2019;38(10):1040-1047. doi:10.1089/dna.2019.4729
18. Puerta-Arias JD, Mejia SP, Gonzalez A. The Role of the Interleukin-17 Axis and Neutrophils in the Pathogenesis of Endemic and Systemic Mycoses. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:595301. doi:10.3389/fcimb.2020.595301
19. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol.* Aug 2009;10(8):857-63. doi:10.1038/ni.1767
20. Dowling MR, Kan A, Heinzl S, Marchingo JM, Hodgkin PD, Hawkins ED. Regulatory T Cells Suppress Effector T Cell Proliferation by Limiting Division Destiny. *Front Immunol.* 2018;9:2461. doi:10.3389/fimmu.2018.02461
21. Rackaityte E, Halkias J. Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. *Front Immunol.* 2020;11:588. doi:10.3389/fimmu.2020.00588
22. Dammann O, O'Shea TM. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin Perinatol.* Dec 2008;35(4):643-63, v. doi:10.1016/j.clp.2008.07.011
23. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, et al. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* Sep 2007;50(3):652-83. doi:10.1097/GRF.0b013e31811ebef6
24. Vitoratos N, Papadias C, Economou E, Makrakis E, Panoulis C, Creatsas G. Elevated circulating IL-1beta and TNF-alpha, and unaltered IL-6 in first-trimester pregnancies complicated by threatened abortion with an adverse outcome. *Mediators Inflamm.* 2006;2006(4):30485. doi:10.1155/MI/2006/30485
25. Burt TD. Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications

- for development and disease. *Am J Reprod Immunol.* Apr 2013;69(4):346-58. doi:10.1111/aji.12083
26. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* May 2007;7(5):379-90. doi:10.1038/nri2075
27. Zaghouani H, Hoeman CM, Adkins B. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol.* Dec 2009;30(12):585-91. doi:10.1016/j.it.2009.09.002
28. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol.* Sep 2014;10(9):1171-84. doi:10.1586/1744666X.2014.942288
29. Das A, Rouault-Pierre K, Kamdar S, et al. Adaptive from Innate: Human IFN-gamma(+)CD4(+) T Cells Can Arise Directly from CXCL8-Producing Recent Thymic Emigrants in Babies and Adults. *J Immunol.* Sep 1 2017;199(5):1696-1705. doi:10.4049/jimmunol.1700551
30. Connors TJ, Ravindranath TM, Bickham KL, et al. Airway CD8(+) T Cells Are Associated with Lung Injury during Infant Viral Respiratory Tract Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Jun 2016;54(6):822-30. doi:10.1165/rcmb.2015-0297OC
31. Gibbons D, Fleming P, Virasami A, et al. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nat Med.* Oct 2014;20(10):1206-10. doi:10.1038/nm.3670
32. White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol.* Mar 15 2002;168(6):2820-7. doi:10.4049/jimmunol.168.6.2820
33. Bunis DG, Bronevetsky Y, Krow-Lucal E, et al. Single-Cell Mapping of Progressive Fetal-to-Adult Transition in Human Naive T Cells. *Cell Rep.* Jan 5 2021;34(1):108573. doi:10.1016/j.celrep.2020.108573
34. Ng MSF, Roth TL, Mendoza VF, Marson A, Burt TD. Helios enhances the preferential differentiation of human fetal CD4(+) naive T cells into regulatory T cells. *Sci Immunol.* Nov 22 2019;4(41)doi:10.1126/sciimmunol.aav5947
35. Bermick JR, Issuree P, denDekker A, et al. Differences in H3K4me3 and chromatin accessibility contribute to altered T-cell receptor signaling in neonatal naive CD4 T cells. *Immunol Cell Biol.* Aug 2022;100(7):562-579. doi:10.1111/imcb.12561
36. Shi X, Ma W, Duan S, et al. Single-cell transcriptional diversity of neonatal umbilical cord blood immune cells reveals neonatal immune tolerance. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 11 2022;608:14-22. doi:10.1016/j.bbrc.2022.03.132
37. Sanchez-Villanueva JA, Rodriguez-Jorge O, Ramirez-Pliego O, et al. Contribution of ROS and metabolic status to neonatal and adult CD8+ T cell activation. *PLoS One.* 2019;14(12):e0226388. doi:10.1371/journal.pone.0226388
38. Siefker DT, Adkins B. Rapid CD8(+) Function Is Critical for Protection of Neonatal Mice from an Extracellular Bacterial Enteropathogen. *Front Pediatr.* 2016;4:141. doi:10.3389/fped.2016.00141
39. Zens KD, Chen JK, Guyer RS, et al. Reduced generation of lung tissue-resident memory T cells during infancy. *J Exp Med.* Oct 2 2017;214(10):2915-2932. doi:10.1084/jem.20170521
40. Nunes-Cabaco H, Ramalho-Dos-Santos A, Pires AR, Martins LR, Barata JT, Sousa AE. Human CD4 T Cells From Thymus and Cord Blood Are Convertible Into CD8 T Cells by IL-4. *Front Immunol.* 2022;13:834033. doi:10.3389/fimmu.2022.834033
41. Jacomet F, Cayssials E, Basbous S, et al. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. *Eur J Immunol.* Jul 2015;45(7):1926-33. doi:10.1002/eji.201545539
42. Warren HS, Rana PM, Rieger DT, Hewitt KA, Dahlstrom JE, Kent AL. CD8 T cells expressing killer Ig-like receptors and NKG2A are present in cord blood and express a more naive phenotype than their counterparts in adult blood. *J Leukoc Biol.* Jun 2006;79(6):1252-9. doi:10.1189/jlb.0905536
43. Marcolino I, Przybylski GK, Koschella M, et al. Frequent expression of the natural killer cell receptor KLRG1 in human cord blood T cells: correlation with replicative history. *Eur J Immunol.* Oct 2004;34(10):2672-80. doi:10.1002/eji.200425282
44. Fike AJ, Kumova OK, Carey AJ. Dissecting the defects in the neonatal CD8(+) T-cell response. *J Leukoc Biol.* Nov 2019;106(5):1051-1061. doi:10.1002/JLB.5RU0319-105R
45. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood.* Mar 2 2017;129(9):1113-1123. doi:10.1182/blood-2016-10-706465
46. Taghon T, Thys K, De Smedt M, et al. Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell



- progenitors: implications for human T-cell development. *Leukemia*. Jun 2003;17(6):1157-63. doi:10.1038/sj.leu.2402947
47. Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*. Apr 2013;27(5):1000-8. doi:10.1038/leu.2012.356
48. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*. May 1996;14(3):281-91. doi:10.1002/stem.140281
49. Magli MC, Largman C, Lawrence HJ. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol*. Nov 1997;173(2):168-77. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<168::AID-JCP16>3.0.CO;2-C
50. Cieslak A, Charbonnier G, Tesio M, et al. Blueprint of human thymopoiesis reveals molecular mechanisms of stage-specific TCR enhancer activation. *J Exp Med*. Sep 7 2020;217(9)doi:10.1084/jem.20192360
51. de Bock CE, Demeyer S, Degryse S, et al. HOXA9 Cooperates with Activated JAK/STAT Signaling to Drive Leukemia Development. *Cancer Discov*. May 2018;8(5):616-631. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0583
52. Santana MA, Esquivel-Guadarrama F. Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int Rev Cytol*. 2006;250:217-74. doi:10.1016/S0074-7696(06)50006-3
53. Palin AC, Ramachandran V, Acharya S, Lewis DB. Human neonatal naive CD4+ T cells have enhanced activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a. *J Immunol*. Mar 15 2013;190(6):2682-91. doi:10.4049/jimmunol.1202534
54. Hogan PG. Calcium-NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion. *Cell Calcium*. May 2017;63:66-69. doi:10.1016/j.ceca.2017.01.014
55. Martinez GJ, Pereira RM, Aijo T, et al. The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity*. Feb 17 2015;42(2):265-278. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.006
56. Labastida-Conde RG, Ramirez-Pliego O, Peleteiro-Olmedo M, et al. Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4(+) T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine*. Jul 5 2018;36(29):4188-4197. doi:10.1016/j.vaccine.2018.06.005
57. McCarron M, Reen DJ. Activated human neonatal CD8+ T cells are subject to immunomodulation by direct TLR2 or TLR5 stimulation. *J Immunol*. Jan 1 2009;182(1):55-62. doi:10.4049/jimmunol.182.1.55
58. Rodriguez-Jorge O, Kempis-Calanis LA, Abou-Jaoude W, et al. Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4(+) T cell activation. *Sci Signal*. Apr 16 2019;12(577)doi:10.1126/scisignal.aar3641
59. Slack M, Wang T, Wang R. T cell metabolic reprogramming and plasticity. *Mol Immunol*. Dec 2015;68(2 Pt C):507-12. doi:10.1016/j.molimm.2015.07.036
60. Wang R, Green DR. Metabolic reprogramming and metabolic dependency in T cells. *Immunol Rev*. Sep 2012;249(1):14-26. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01155.x
61. Yong CS, Abba Moussa D, Cretenet G, Kinet S, Dardalhon V, Taylor N. Metabolic orchestration of T lineage differentiation and function. *FEBS Lett*. Oct 2017;591(19):3104-3118. doi:10.1002/1873-3468.12849
62. Cluxton D, Petrasca A, Moran B, Fletcher JM. Differential Regulation of Human Treg and Th17 Cells by Fatty Acid Synthesis and Glycolysis. *Front Immunol*. 2019;10:115. doi:10.3389/fimmu.2019.00115
63. Shan J, Jin H, Xu Y. T Cell Metabolism: A New Perspective on Th17/Treg Cell Imbalance in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2020;11:1027. doi:10.3389/fimmu.2020.01027
64. Wik JA, Skalhegg BS. T Cell Metabolism in Infection. *Front Immunol*. 2022;13:840610. doi:10.3389/fimmu.2022.840610
65. Tabillas C, Wang J, Liu X, Locasale JW, Smith NL, Rudd BD. Cutting Edge: Elevated Glycolytic Metabolism Limits the Formation of Memory CD8(+) T Cells in Early Life. *J Immunol*. Nov 15 2019;203(10):2571-2576. doi:10.4049/jimmunol.1900426
66. Almeida L, Lochner M, Berod L, Sparwasser T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin Immunol*. Oct 2016;28(5):514-524. doi:10.1016/j.smim.2016.10.009
67. Chisolm DA, Weinmann AS. TCR-Signaling Events in Cellular Metabolism and Specialization. *Front Immunol*. 2015;6:292. doi:10.3389/fimmu.2015.00292
68. Cretenet G, Clerc I, Matias M, et al. Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions. *Sci Rep*. Apr 12 2016;6:24129. doi:10.1038/srep24129
69. Sanli E, Kabaran S. Maternal Obesity, Maternal Overnutrition and Fetal Programming: Effects of Epigenetic Mechanisms on the Development of Metabolic Disorders. *Curr*

Genomics. Sep 2019;20(6):419-427.  
doi:10.2174/1389202920666191030092225

# Neonatal CD4<sup>+</sup> T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with proliferation and yet a limited immune response

Linda Aimara Kempis-Calanis,<sup>1,†</sup> Otoniel Rodríguez-Jorge,<sup>1,\*†,‡</sup> Darely Yarazeth Gutiérrez-Reyna,<sup>1</sup> Carlos Jesús Ventura-Martínez,<sup>1</sup> Salvatore Spicuglia,<sup>2,‡</sup> Alejandra Medina-Rivera,<sup>3</sup> Denis Thieffry,<sup>4</sup> Aitor González,<sup>2</sup> and María Angélica Santana<sup>1,\*†,‡</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Celular y de Sistemas, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Chamilpa 62209 Cuernavaca, México

<sup>2</sup>Aix-Marseille University, Inserm, TAGC, UMR1090, Equipe Labélisée LIGUE contre le Cancer, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

<sup>3</sup>Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM 3002, Blvd. 3001, 76230 Juriquilla, Querétaro, México

<sup>4</sup>Département de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, PSL University, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

\*Corresponding authors: Email: [santana@uaem.mx](mailto:santana@uaem.mx); [orj@uaem.mx](mailto:orj@uaem.mx)

## Abstract

The adaptive immune response is coordinated by CD4<sup>+</sup> T cells, which determine the type and strength of the immune response and the effector cells involved. It has been reported that CD4<sup>+</sup> T cells are less responsive in neonates, leading to low activation of the cellular response and poor antibody production by B cells. This low response is essential for the tolerant window that favors birth transition from the sterile environment in the womb to the outside world but leaves neonates vulnerable to infection, which is still an important health issue. Neonates have a high morbidity and mortality rate due to infections, and the molecular reasons are still understudied. We asked whether the neonatal naive CD4<sup>+</sup> T cells have a genomic program that predisposes them to a low response. Therefore, we evaluated the transcriptome and epigenome of human neonatal and adult naive CD4<sup>+</sup> T cells. Our results point to a gene expression profile forming a distinct regulatory network in neonatal cells, which favors proliferation and a low T-cell response. Such expression profile is supported by a characteristic epigenetic landscape of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, which correlates with the characteristic transcriptome of the neonatal cells. These results were confirmed by experiments showing a low response to activation signals, higher proliferation, and lower expression of cytokines of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells as compared to adult cells. Understanding this network could lead to novel vaccine formulations and better deal with life-threatening diseases during this highly vulnerable period of our lives.

**Keywords:** enhancers, epigenetic, neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, T-cell activation, transcriptomics

## 1. Introduction

Comprising the first 28 d of life, the neonatal period is the most vulnerable period for a child's health and survival. The number of deaths has declined over recent years, but on average, 1.7 deaths per 1,000 live births still occur worldwide. Infections account for around 24% of neonatal deaths, and they are usually more severe and longer lasting.<sup>1</sup> Infections mediated by intracellular pathogens are particularly dangerous in neonates, suggesting that T-cell-mediated immunity is limited in the early stages of life. Neonates have limited exposure to antigens in the mother's uterus, and so the absence of memory lymphocytes has been suggested as being responsible for its low response, particularly to intracellular pathogens.<sup>2,3</sup> However, it has been published that neonatal T cells have their own characteristics, adapted to the particular needs of the neonatal period, biased to a more innate inflammatory response.<sup>4,5</sup> A poor antibody response is also observed, perhaps due to a limiting expansion of T follicular helper cells and a high expression of miR-181b.<sup>6–11</sup>

It has been shown that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells respond differently from adult cells, with a high production of IL-8,<sup>12</sup> a prevalent Th2 over Th1 profile that has been shown in mice, and an innate inflammatory response.<sup>3,4</sup> The IL-13 locus is open in neonatal cells and remains open upon differentiation into Th1 populations, confirming an epigenetic bias of neonatal cells toward the Th2 phenotype,<sup>13</sup> and higher levels of IL-13 were reported in neonatal serum and cord blood mononuclear cells (CBMC) stimulated with phytohaemagglutinin.<sup>14</sup> This is, however, still controversial, as many studies, including ours, show a rather low production of cytokines of all major Th phenotypes at first stimulation. The Th2 bias was found to be more clear at restimulation and dependent on CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>15</sup> At the level of cell signaling, neonatal CD4<sup>+</sup> T cells display enhanced calcium signals, probably mediated by miR181a, but reduced AP-1 activation, probably contributing to the lower activation of the cells.<sup>16</sup> A recent study evaluating open chromatin regions of neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells showed that the chromatin of adult cells is more open as compared to that of neonatal cells.<sup>17</sup>

In our previous studies on neonatal CD8<sup>+</sup> T cells, we found a unique transcriptomic profile, biased toward innate immunity and homeostatic proliferation, with a low expression of

<sup>†</sup> These authors equally contributed to this work.

<sup>‡</sup> These authors share the last authorship.

cytotoxicity and signal transduction genes.<sup>18</sup> Further, we found that these cells had an increased expression of glycolysis genes and a high production of reactive oxygen species, which could lead to a lower activation.<sup>19</sup> Based on a qualitative dynamical model of the corresponding network, we predicted that this could negatively impact cell activation.<sup>19</sup> Activation of neonatal CD8<sup>+</sup> T cells, however, was possible under strong activation conditions in the presence of IL-12, which induced a more balanced cell metabolism, among other changes.<sup>20</sup>

Several lines of evidence have suggested that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells respond differently as compared to the adult cells,<sup>21,22</sup> but the regulatory mechanisms and specific molecules involved have not been studied. In this study, we hypothesize that through a full-spectrum analysis of the transcriptome and epigenome of the neonatal cells, as compared to the naive adult CD4<sup>+</sup> T cells, we would be able to identify this regulatory network to expand our knowledge of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells. As expected, they have a characteristic transcriptome, in which pathways related to proliferation, aerobic glycolysis, a low response, innate inflammation, and cell signaling control were overrepresented, explaining the high threshold of cell activation. A specific set of hyperproliferative-related transcription factors, such as *BCL11A* and *HOX* genes, and metabolism-related genes were found overexpressed in the neonatal cells, at both the transcriptome and protein levels. Indeed, the neonatal cells proliferated more than adult naive cells, under basal conditions as well as after activation. Furthermore, we analyzed a panel of 12 cytokines in stimulated neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells and found that the only cytokine significantly induced in neonatal cells upon activation was IL-2.

We further analyzed the corresponding profiles of histone modification marks in neonatal and adult naive CD4<sup>+</sup> T cells and the combination of these marks along the genome. First, focusing on the most representative chromatin marks, the most significant difference between the promoters of genes differentially expressed in adult vs neonatal CD4<sup>+</sup> T cells involved the closed chromatin mark H3K27me3, which maintains closed the adult-specific genes in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells. Then, using ChromHMM, we generated a model of chromatin states to characterize the specific epigenetic landscape of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells. Our analysis points to striking differences in promoters and enhancers between neonatal and adult cells, with remarkable changes in the regions identified as active enhancers, showing a good correspondence with the transcriptomic results. We also found differences in the functional annotation analysis of genes near these active regulatory regions, with the strongest differences found in active enhancers (H3K27ac<sup>+</sup>H3K4me1<sup>+</sup>). Neonatal CD4<sup>+</sup> T-cell active regulatory regions are enriched in pathways similar to those revealed by the transcriptome analysis, particularly tolerance-inducing pathways and cell signaling genes, stressing the importance of histone marks in the differences between neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T-cell function.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Cell purification and stimulation

Neonatal blood was collected from the umbilical cord vein of healthy full-term neonates, born through vaginal delivery at Hospital General Parres (Cuernavaca, Morelos, Mexico), with full informed consent from the mothers and the ethical approval of the hospital (CONBIOÉTICA-17-CEI-001-20160329). No samples were taken from mothers having any health condition such as

preeclampsia, hypertension, diabetes, or infections. Adult cells were obtained from Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, Cuernavaca. The permission to use blood samples was given by Servicios de Salud Morelos, through the establishment of an official agreement (File 1372/1706). To ensure that cord blood represents the baby's blood, we obtained the samples before the placenta expulsion, to avoid mixing with the mother's blood and the presence of coagulation factors, which changes the proportion of the cells and the serum in the samples. A routine evaluation of the purity of all samples and the absence of CD45RO<sup>hi</sup> cells was performed to ensure that no contamination with the mother's blood occurred.

Samples were processed the same day to obtain mononuclear cells by density gradient centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield) and cultured overnight in tissue culture dishes (Corning 353003) to eliminate adherent cells. CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from mononuclear cells using the RosetteSep CD4<sup>+</sup> T-cell enrichment cocktail (STEMCELL), with 1 mL of erythrocytes from the same blood sample, kept in culture for 1 d, and used in a second density gradient. Memory and effector cells were eliminated from adult blood with magnetic beads (Pierce) coupled to anti-CD45RO (UCH-L1, TONBO biosciences). Naive cells were cultured in RPMI medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 5% of fetal bovine serum, 1% glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The purity of our populations of CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> cells was at least 95%, using anti-CD4 (20-0048-T100; TONBO biosciences) and anti-CD3 antibodies (20-0037-T100; TONBO biosciences) (Supplementary Fig. 1A and 1B). The tissue culture dishes used were from Corning, maintaining a cell concentration of 3 to 5 × 10<sup>6</sup> cells/mL. Cells were stimulated by crosslinking CD3 and CD28 with a secondary antibody, each at 1 µg/mL concentration.

### 2.2 RNA preparation and sequencing

RNA was prepared using Trizol (Thermo Fisher Scientific, 15596-018, Invitrogen), following the manufacturer's instructions. A cell count of at least 5 million cells was used. Purified RNA was analyzed for integrity with a Bioanalyzer nano-RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific), and only samples with an RNA integrity number (RIN) above 8.0 were used. Three neonatal and 3 adult cell samples were sequenced in Transcriptomic and Genomic Platform Marseille Luminy, in France, using the HiSeq-2500 Sequencer System—illumina. Sequencing was performed single-ended, the length of reads was 75, and the sequencing depth was on average of 47.04 ± 11.3 × 10<sup>6</sup>.

### 2.3 Data analysis

Data quality was evaluated using the FASTQC program.<sup>23</sup> Adaptors and low-quality reads were cut using Trimmomatic<sup>24</sup> version 0.39 with the following parameters: "ILLUMINACLIP:Truseq3-SE:2:30:10 TRAILING:3 MINLEN:40"9. The reads were aligned against reference transcriptome GRCh38/hg38, using the STAR 2.4.2<sup>a</sup> software with the following parameters: "runMode alignReads -outSAMtype BAM SortedByCoordinate-outFilterMultimapNmax 1"10. The Binary Alignment Map (BAM) files generated by alignment were visualized in regions of interest with IGV.<sup>25</sup> Read counts per gene were obtained using the software HTSeq-count.<sup>26</sup> To identify differentially expressed genes, we used the DESeq2 package in R (Bioconductor).<sup>27</sup> An adjusted *P* value <0.05, with a log fold change ≥1, was considered for differentially expressed genes, which were used for functional annotation. To evaluate the overrepresented pathways, we used the

ClusterProfiler package in R, using the function `EnrichKEGG`, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. Overrepresented pathways were visualized using `enrichplot` (Bioconductor). To expand our search for enriched pathways, we used the `stringAPP` in Cytoscape to generate functional interaction networks with high confidence and perform a wider functional annotation analysis including pathways, STRING clusters, and Gene Ontology (GO) terms.

For comparison with our transcriptome results, we obtained RNA sequencing (RNA-seq) data available in the BLUEPRINT Consortium of naive CD4<sup>+</sup> T cells, 2 from neonatal donors and 8 from adult donors (<https://www.blueprint-epigenome.eu/>). The primary analysis was performed by the BLUEPRINT Consortium.

## 2.4 Flow cytometry

Neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells were purified, and gene expression was assessed with specific antibodies. The experimental gating strategy is illustrated in [Supplementary Fig. 1](#).

A selection of differentially expressed genes was evaluated by flow cytometry with antibodies targeting BCL11A (MA5-34678, Thermo Fisher), CEBP-alpha (aEbs-1630R, Thermo Fisher), HOXA3 (PA5-56077, Thermo Fisher), HOXA9 (PA5-102516, Thermo Fisher), GLUT1 (sc-377228 AF790, Santa Cruz Biotechnology), INSR (sc-57342 AF790, Santa Cruz Biotechnology), and DUSP6 (MA5-31988, Thermo Fisher), together with the secondary antibody Goat Anti-Rabbit IgG FITC (35-8067, TONBO). Proteins were evaluated in the living cells' gate and in the CD31<sup>+</sup> cells' gate (anti-CD31 clone WM59, Biolegend). Protein expression was evaluated in an Attune cytometer (Life Technologies) and analyzed using the Flow-Jo X software. The flow cytometry strategy for protein expression is shown in [Supplementary Fig. 2](#).

## 2.5 Evaluation of proliferation and early activation in response to TCR/CD28 signals

For assays of cell division, mononuclear cells from neonate and adult donors were left untreated or activated by crosslinking CD3 (70-0037-U100, TONBO) and CD28 (70-0289-U100, TONBO) with a secondary antibody (Goat Anti-Mouse IgG Antibody (H + L) bs-0296G, Bioss Antibodies), each at 1 µg/mL concentration. Dividing cells were specifically evaluated by double staining with CFSE (21888, Sigma) 50 nM and CD4-PerCP-Cyanine 5.5 (65-0048-T100, TONBO). Dilution of CFSE on the CD4<sup>+</sup> gate was measured after incubation for 96 h in an Attune cytometer (Life Technologies) and analyzed using the Flow-Jo X software.

Early activation response from neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells was assessed by transcriptome analysis (RNA-seq) of the same cells, after crosslinking CD3 and CD28 with a secondary antibody (1 µg/mL each), Goat Anti-Mouse IgG Antibody (H + L) (bs-0296G, Bioss Antibodies), for 6 h. Gene expression analysis was performed as indicated previously.

We used the Th Legendplex kit (cat. 741028) to evaluate the production of cytokines corresponding to the Th phenotypes: Th1 (IFN $\gamma$  and TNA $\alpha$ ), Th2 (IL-13, IL-5, IL-6, and IL-4), Th9 (IL-9), Th17 (IL17A and IL17F), Th22 (IL-22), Treg (IL-10), and IL-2. We purified neonatal and adult naive CD4<sup>+</sup> T cells and stimulated them by crosslinking CD3 and CD28 for 72 h. Cells were cultured at a density of  $2 \times 10^6$  cells/mL, after which we evaluated cytokine production following the manufacturer's instructions.

## 2.6 Chromatin states and chromatin marks levels

We used chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) data of chromatin marks (H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac, H3K27me3, H3K36me3, H3K9me3) from 3 naive (CD45RA<sup>+</sup>) neonatal CD4<sup>+</sup> T-cell samples and 4 naive (CD45RA<sup>+</sup>) adult CD4<sup>+</sup> T-cell samples, made available by the BLUEPRINT Consortium. The primary analysis was performed by the BLUEPRINT Consortium, and the peaks (bed files) and coverage files (bigwig files) were downloaded from their latest release (2016) for further analysis.

To gain a more quantitative comparison at the level of promoters, we extracted the chromatin marks scores for the regions within  $\pm 2$  kb from the start of each differentially expressed gene, as a measure of the intensity of the mark in the promoter region. For this, we used the coverage (bigwig) files from the BLUEPRINT Consortium and the software `deepTools` (<https://deeptools.readthedocs.io/en/develop/>) to extract the scores of 3 neonatal and 4 adult samples. Once we obtained the levels of 4 chromatin marks (H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac, H3K27me3) in the promoter regions of the differentially expressed genes, we performed the statistical analysis to compare the level of each mark in adult and neonatal cells using R. Since the data were not normally distributed according to the Shapiro-Wilk's test, Mann-Whitney U tests were performed.

Further, ChIP-seq peak files of histone modifications were given as input to the software `ChromHMM` (<http://compbio.mit.edu/ChromHMM/>), which segments the genome in different regions and computes a model of chromatin states (combination of marks). For these analyses, we used the parameters `BinerizeBed-center`, `assembly hg38`; `LearnModel 12` to generate a 12-state chromatin model. Using the `ChromHMM` results, we evaluated the enrichment of each state in relevant regions genome-wide to validate our results, as well as in promoters and gene bodies of the differentially expressed genes. We then selected the regions (states) associated with marks of active promoters (H3K4me3+H3K27ac+H3K4me1<sup>+</sup>; state 12) and enhancers (H3K4me1+H3K27ac<sup>+</sup>; state 9), which were annotated using the software `GREAT` (<http://great.stanford.edu/public/html/>). `GREAT` assigns a regulatory domain overlapping each gene and then annotates each genomic region given (query regions) to a gene (or genes). We annotated our active promoter regions (state 12) by selecting the single nearest gene to our regions (states), whose domain extends within  $\pm 2$  kb around the transcription start (TSS), while active enhancer regions (state 9) were annotated by selecting the single nearest gene to our regions, whose domain extends  $\pm 100$  kb of the TSS. Then, using the list of genes annotated to states 12 and 9 in neonatal and adult cells, we generated a Venn diagram to identify the genes exclusively annotated to 1 type of regulatory region (state 9 or 12) generating 4 unique gene lists. Next, we performed the functional annotation analysis for the 4 gene lists using `EnrichKEGG`.

## 2.7 Association of single-nucleotide polymorphisms identified by genome-wide association studies with active enhancers and promoters enriched in the adult or neonatal cells

To further explore the potential function of regulatory regions enriched in the neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells, we aligned single-nucleotide polymorphisms (SNPs) identified in 413 genome-wide association studies (GWAS), obtained from the IEU OpenGWAS project (<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>), with the DNA regions

corresponding to active promoters and enhancers from our ChromHMM analysis in neonatal and adult cells. The 413 GWAS were selected based on these 4 criteria: (i) molecular phenotypes such as proteome or methylome were excluded; (ii) only studies from the European population were kept because more studies are available; (iii) only well-defined medical or physiological conditions were kept, and environmental phenotypes such “employment status” or “self-reported” medical conditions were excluded; and (iv) only GWAS studies with at least 10,000 subjects, 2,000 controls, and 2,000 cases were kept.

To compare active promoter (state 12) and enhancer (state 9) regions in neonatal vs adult cells with regions associated with diseases in GWAS, we implemented the following workflow:

1. Unique peaks in the 2 sets of peaks were computed.
2. These unique peaks were binned in windows of 500 nt.
3. For a list of 413 GWAS (Supplementary Table 2) from the IEU OpenGWAS project (<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>), the number of peaks with and without significant GWAS signals was counted.
4. A statistical Fisher’s test was used to evaluate the significance of the counting in the 2 sets of peaks with and without GWAS signals.
5. The results of the 413 GWAS were concatenated, and a Bonferroni multitest correction was applied.

### 3. Results

#### 3.1 Neonatal CD4<sup>+</sup> T cells have a unique transcriptome

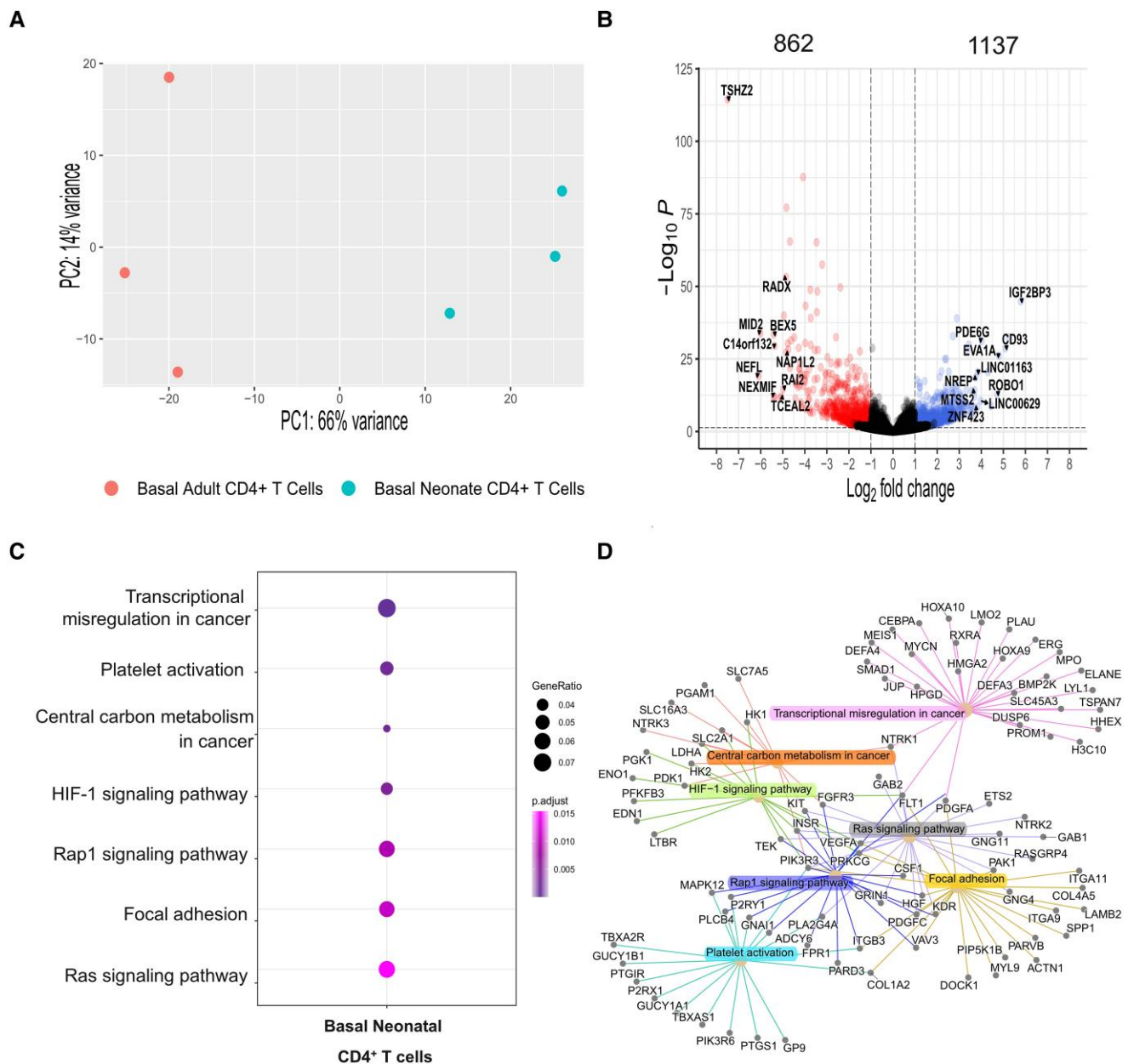
CD4<sup>+</sup> T cells coordinate adaptive immune response, are crucial for the activation of other immune cells, and can shape antibody responses. In neonates, however, CD4<sup>+</sup> T cells have a high threshold of activation and a low effector function.<sup>7–9,28,29</sup> To better understand the functionality of these cells, we performed RNA-seq analysis of unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells purified from cord blood, as compared to naive adult cells. Samples were taken from 3 neonates and 3 adults and were processed for transcriptome sequencing. After aligning the reads to the human genome (GRCh38), we obtained 60,676 gene transcripts annotated in Ensembl<sup>30</sup> and a total of 1,999 differentially expressed genes (DESeq2; *P*-adjusted <0.05 and a log2FoldChange ≥1) (Supplementary Table 1). Among these gene transcripts, 862 and 1,137 were found overexpressed in adult and neonatal cells, respectively. A principal component analysis (PCA) revealed that the neonatal and adult samples separated well from each other, indicating they have specific transcriptome signatures, which is also illustrated by the volcano plot (Fig. 1A and 1B).

The functional annotation of the differentially expressed genes was performed with EnrichKEGG (ClusterProfiler), using the KEGG database. Seven pathways were enriched with overexpressed genes in the neonatal cell samples with a *P*-adjusted <0.05 (Fig. 1C), while the overexpressed genes in adult cells were not significantly enriched in any pathway. In general, the pathways overexpressed in the neonatal cells are involved in functions associated with hyperproliferation and T-cell acute lymphoblastic leukemia or T-ALL (PROM1, HOXA9, HOXA10, PDGFA, MYCN, LMO2, BMP2K, MEIS1, HMGA2, HHEX, ERG, H3C10),<sup>31</sup> genes typically associated with neutrophils and antimicrobial activities (MPO, ELANE, DEFA3, DEFA4), and control of cell signaling (PDE6G, PTPRD, DUSP6) and development (NREP, AUTS2, IGF2BP3). The network of the overrepresented pathways is shown in Fig. 1D.

The genes overexpressed in adult cells were not enriched in specific pathways but were more involved in cell function (TMEM30B, PLEKHH2, SGSM1, KIF5C, KIF21A, FLT4) and genome structure and stability (RADX, NAP1L2, TCEAL2).

In Supplementary Fig. 3A, we represent the 50 genes that showed the highest differences between neonatal and adult cells in our transcriptome. To corroborate that this transcriptomic signature was not due to the population studied but a general transcriptomic signature of neonatal cells, we compared the expression levels of the same genes using RNA-seq data from the BLUEPRINT Consortium (Supplementary Fig. 3B). A good correspondence was observed between our data and those of BLUEPRINT, particularly for the differential expression between the neonatal and adult genes. The transcription factors differentially expressed between neonatal and adult cells are shown in Supplementary Fig. 4A for our transcriptome and in Supplementary Fig. 4B for the BLUEPRINT transcriptome, for comparison. The adult cells’ gene expression profile in the BLUEPRINT data was dimer (Supplementary Fig. 3) or more variable (Supplementary Fig. 4) as compared to our data, which could be due to the fact that our adult samples were from young adults (20 to 30 yr old) and those of BLUEPRINT were from donors on average 60 yr old. Many of the transcription factors highly expressed in neonatal cells are involved in development and hyperproliferation. Among these, we found ZNF423, which has been related to DNA damage repair<sup>32</sup>; BCL11A, an important regulator of early lymphopoiesis, also involved in chromatin remodeling through its association with the SWI/SNF<sup>33</sup>; and TOX, which is involved in the maturation of T cells and in the inhibition of effector functions, driving also T-cell exhaustion.<sup>34</sup> Also remarkable is the expression of the homeobox genes, HOXA and HHEX, which are involved in developmental processes<sup>35</sup>; HOXA3 is particularly involved in thymus development.<sup>36</sup> CEBPA codes for a transcription factor controlling enhancer expression and function and regulates proliferation.<sup>37</sup> In contrast, the transcription factors overexpressed in adult cells are related to typical T-cell function, such as T-bet (TBX21), the EOMES transcription factor, and STAT4, which is activated in response to IL-12 and is involved in Th1 differentiation. Together, these results are consistent with previous reports, in which a low Th1 response in neonatal T cells has been described<sup>38,39</sup> and suggests that these cells are prone to proliferation. In addition, our results are consistent with previous publications where CD93, TOX, and SOX4 were found overexpressed in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>40–42</sup>

We performed a second functional annotation analysis to search for pathways in adult and neonatal cell populations using the STRING app in Cytoscape. Again, no pathways were found enriched in the overexpressed genes of adult cells. The genes overexpressed in the neonatal cells form a large network of functional interactions (Supplementary Fig. 5), in contrast to adult overexpressed genes, which were dispersed and only form small networks (Supplementary Fig. 6). The significant pathways found in STRING for neonatal cells are shown in Supplementary Table 2 and the neonatal cell clusters in Supplementary Table 3. These pathways corresponded to those found in the KEGG database. Then we analyzed the GO components for neonatal (Supplementary Table 4) and adult cells (Supplementary Table 5), showing an enrichment in basic cellular components in the adult cells and an enrichment in growth factor responses in the neonatal cells. This shows that a big network of interconnected genes/proteins regulates the neonatal state.



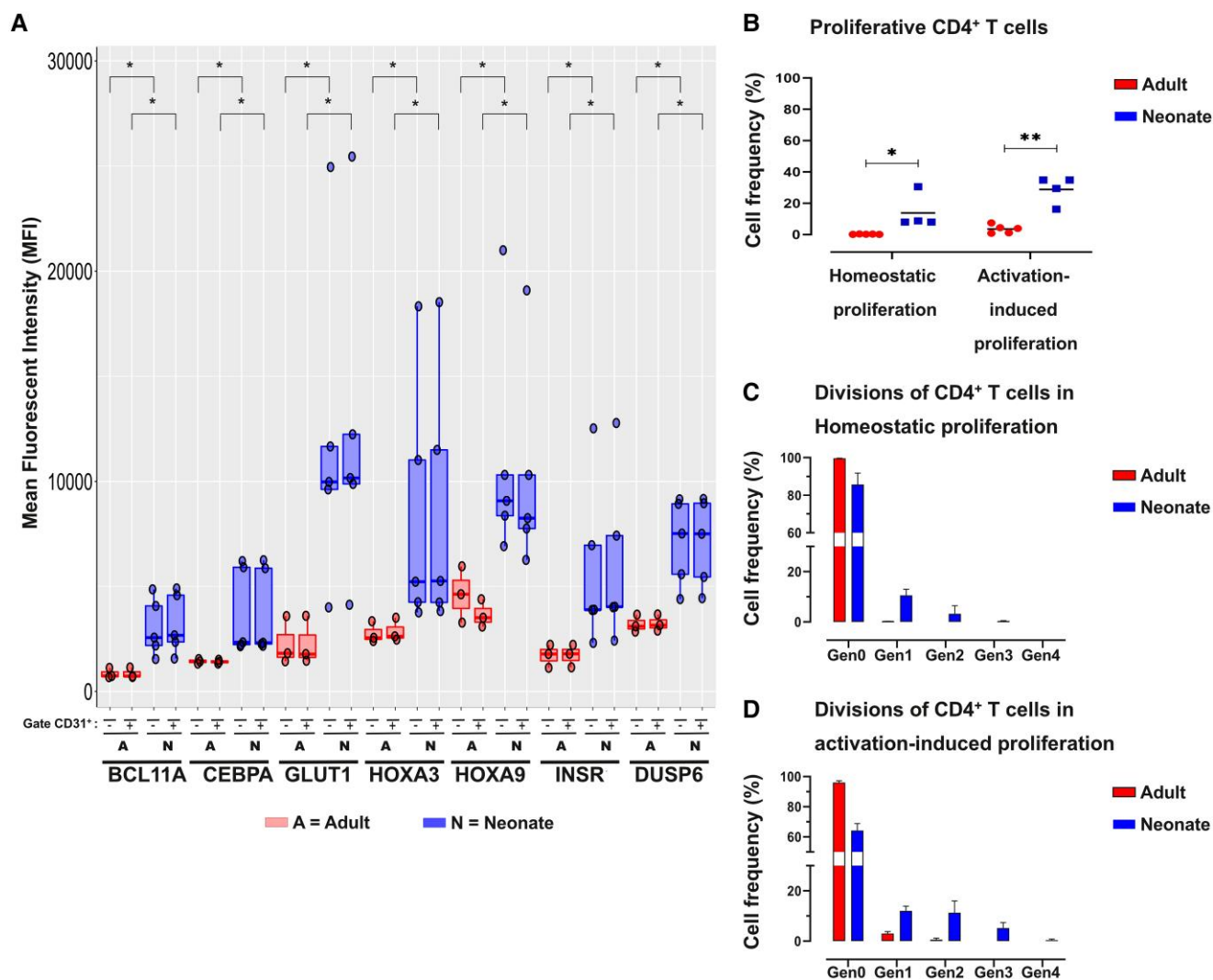
**Fig. 1.** Differentially expressed genes between unstimulated naive neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells. (A) Principal components analysis showing naive neonatal and adult cells. (B) Volcano plot displaying the differentially expressed genes in basal adult vs neonatal CD4<sup>+</sup> T cells. (C) Functional analysis of pathways enriched in neonatal cells overexpressed genes. (D) Network of pathways in the neonatal overexpressed genes.  $N = 3$  in each condition. Differentially expressed genes considered a log fold change of 1 and an adjusted  $P$  value  $< 0.05$ . The statistical analysis was performed using the Wald test.

### 3.1.1 Protein expression, proliferation, and early activation in response to TCR/CD28 signals

To confirm our transcriptome results, we evaluated the protein expression of several genes overexpressed in neonatal cells by flow cytometry using independent samples. The selection of the proteins was based on the high difference in gene expression, the appearance of the proteins in several pathways, and the relevance of the genes in immune function. For the analysis, in addition to the live cells gate, we also analyzed the CD31<sup>+</sup> cells in the same samples to exclude that the observed differences could result from a different proportion of recent thymus emigrants (RTEs) in neonatal and adult cell populations. The gating strategy to analyze CD31 is shown in [Supplementary Fig. 1C](#) and

[Supplementary Fig. 2A](#). CD31 is an accepted marker for RTEs in CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>43</sup> The adult T cells came from young adults, aged 20 to 30 yr, and CD31 expression was highly variable, but no differences were found in the proportion of RTEs between neonatal and adult cells ([Supplementary Fig. 7](#)). We found that the 7 proteins evaluated, which correspond to glycolysis, proliferation, and intracellular signaling markers, were significantly increased in the neonatal cells, and the analysis on the CD31<sup>+</sup> population did not change the general protein expression profile ([Fig. 2A](#)).

Next, we evaluated neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation by CFSE dilution (the gating strategy to analyze proliferation is shown in [Supplementary Fig. 8](#)). In agreement with the transcriptome profile, the neonatal cells proliferated more ([Fig. 2B](#)), both without stimulation (homeostatic proliferation) and after



**Fig. 2.** Changes in protein expression and proliferation assays. (A) Protein expression in unstimulated cells was evaluated by intracellular flow cytometry in the general living cells gate and the CD31<sup>+</sup> cells gate of the same samples to evaluate simultaneously protein expression in the CD4<sup>+</sup> T populations and in RTEs. N corresponds to the neonatal samples and A to the adult ones. For statistical analysis, we used the Mann-Whitney *U* test. (B) Proliferation of neonatal and adult cells without any stimulus (homeostatic proliferation) or after stimulation by crosslinking CD3 and CD28 for 96 h (activation-induced proliferation). Statistical comparisons for these experiments were performed with 2-way analysis of variance and Sidak's multiple comparisons test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. The frequency of cells in each number of divisions in samples after stimulation (C) and without stimulation (D) was also evaluated. For the protein expression evaluation, 3 neonatal and 5 adult samples were used, while for the proliferation experiments, 4 neonatal and 5 adult independent samples were used. For proliferation statistical analysis, we used Student's *t* test. \**P* < 0.02.

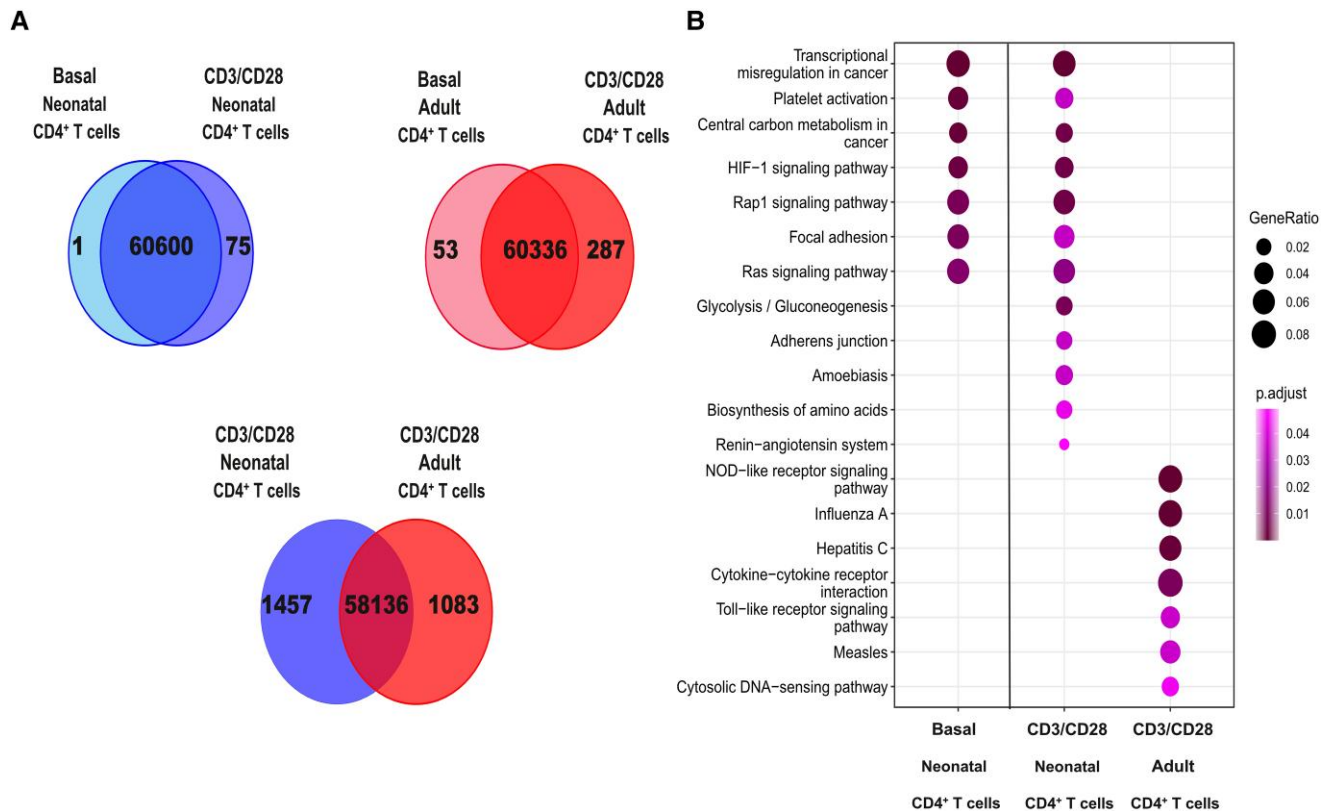
CD3/CD28 signals (activation-induced proliferation). Neonatal cells generated up to 2 generations without stimulus (Fig. 2C) and up to 3 generations after activation (Fig. 2D), while the naive adult cells did not divide homeostatically, with only a small proportion of the cells reaching 1 division after activation. Of notice, the high proliferation of neonatal cells is in congruence with the high expression of glycolytic and cell cycle genes.

We then evaluated the transcriptome of early activated neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells. After 6 h of incubation with CD3/CD28 signals, cells were collected and sequenced, and differential gene expression analysis was performed. In neonatal cells, only 1 gene was found downregulated, while 75 genes were overexpressed after 6 h of cell activation. In contrast, in adult cells, 53 genes were downregulated, and 287 genes were upregulated, under the same activation conditions (Fig. 3A). The top 80 differentially expressed genes in neonatal and adult cells upon activation are shown in Supplementary Fig. 9. The comparison between

activated neonatal and adult cells showed 1,457 genes overexpressed in the neonatal cells and 1,083 genes in the adult ones (Fig. 3A). An analysis of KEGG pathways enrichment (Fig. 3B) revealed an upregulation of metabolic-, adhesion-, and cytoskeleton-related pathways upon activation in neonatal cells (see middle column), while in the adult cells, both T-cell receptor, cytokine-cytokine receptor signaling, and innate receptor pathways were upregulated (see right column of Fig. 3B), outlining the activation of the cells and suggesting an important function of Toll and NOD receptor pathways in naive cell activation, as we previously reported for TLR5.<sup>44,45</sup>

We also evaluated the cytokine response of the major Th effector pathways in cells stimulated for 48 h after CD3/CD28 crosslinking (Supplementary Fig. 10). A significant induction of IL-2 was observed in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, which was lower than that of adult cells, even though this difference did not reach statistical significance. The expression of all the other cytokines was much





**Fig. 3.** Gene expression analysis of neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells after stimulation with CD3/CD28 signals. (A) Venn diagrams show the number of differentially expressed genes upon stimulation in neonatal or adult cells. (B) Functional annotation of the differentially expressed genes showing the enriched KEGG pathways.

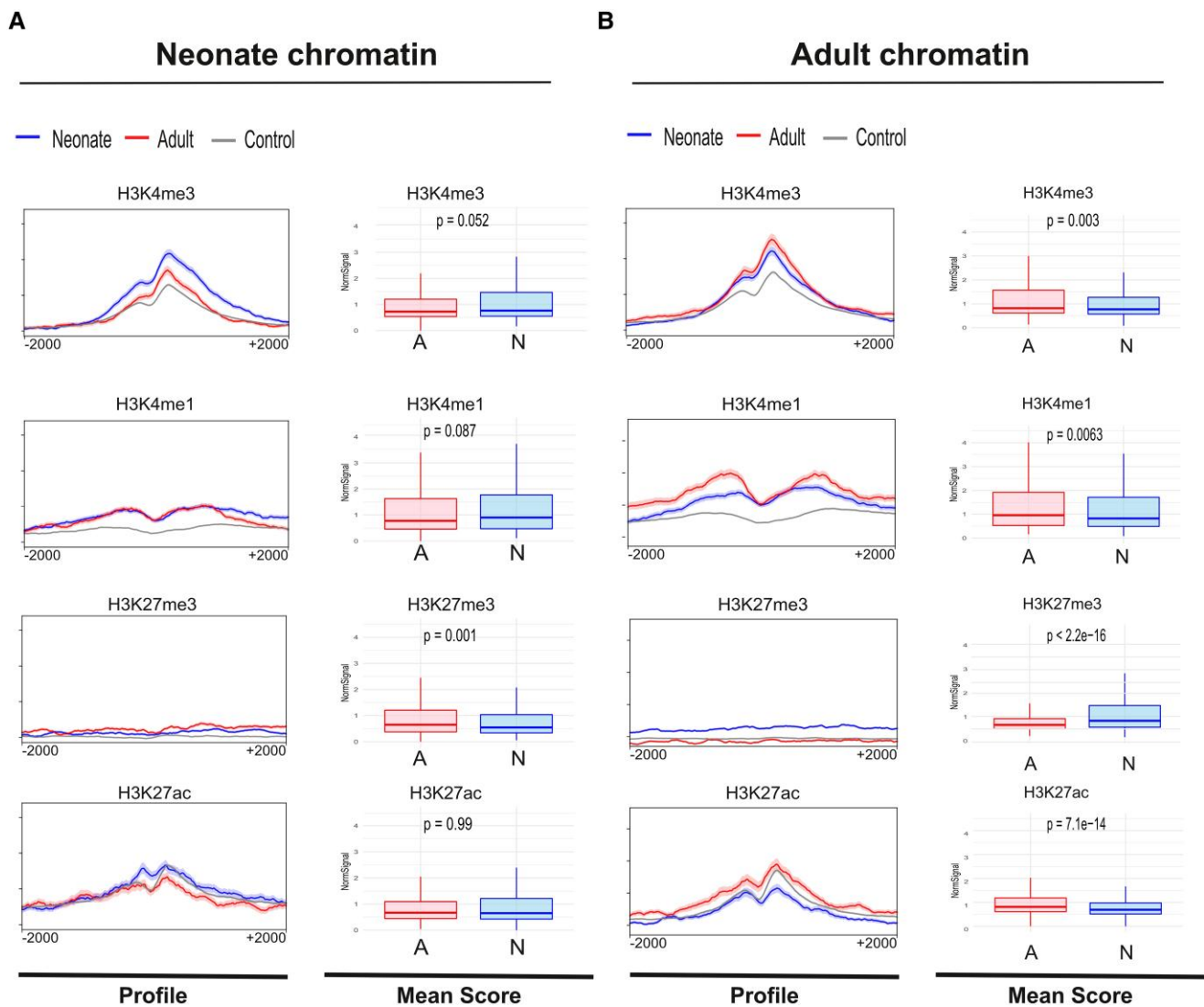
lower in the neonatal cells, in agreement with a proliferative response and yet a low effector function.

### 3.1.2 An epigenetic signature of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells

Next, we aimed to explore the epigenetic landscape underlying the characteristic gene expression profile of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells. To start our epigenetic analysis, we focus first on the role of each epigenetic mark in the regulation of gene expression in neonatal and adult cells. We extracted the scores of the chromatin opening (H3K4me3, H3K27ac, and H3K4me1) and repression (H3K27me3) marks along the promoter regions ( $\pm 2$  kb from the gene start) of the differentially expressed genes. **Figure 4A** shows the presence and distribution (histograms) of the marks along the promoters of overexpressed genes in neonatal cells (left). The neonatal chromatin presents slightly higher levels of the opening marks H3K4me3 and H3K27ac, with a slight reduction in the closed chromatin mark H3K27me3 in the promoters of the overexpressed genes (blue lines) as compared to the promoters of genes overexpressed in adult cells (red lines) or genes that were not differentially expressed (gray line). This mark is difficult to visualize because of its broad presence along the genes. Also, boxplots (right) show the mean score of each chromatin mark in the promoters of the genes differentially expressed between neonate vs adult. When we evaluated the average levels of the marks in the promoters of genes, the only significant difference involved the closing mark H3K27me3, which was slightly lower in the genes overexpressed in neonatal cells. On the other hand, in the adult cells, genes overexpressed in these cells (**Fig. 5B**) have higher

levels of the H3K4me3, H3K4me1, and H3K27ac open chromatin marks, and a much lower level of the H3K27me3 closed chromatin mark along the promoters, as compared with the presence of this mark in the genes overexpressed in neonatal cells. In the average levels of the marks in the genes overexpressed in adult cells, changes were significant for all the marks, but the closed chromatin mark was remarkably much higher in the neonatal cells. This suggests that during the maturation of neonatal cells toward the adult epigenome, gene promoters lose neonatal-enriched closed chromatin marks and open the adult-enriched regions and that the regulation of the H3K27me3 mark is very important for this change.

Epigenetic marks are combined in epigenetic landscapes to give specific functions to different genomic regions. Thus, to better understand the epigenetic differences between neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells, we compared the epigenetic landscape of the neonatal and adult cells. For that, we used ChIP-seq data from the BLUEPRINT Consortium (<https://www.blueprint-epigenome.eu/>) for human neonatal and adult naive CD4<sup>+</sup> T cells. We analyzed 6 different chromatin mark profiles, including H3K27ac, H3K4me3, and H3K36me3 denoting open chromatin, H3K27me3 and H3K9me3 denoting closed chromatin, and the enhancer mark H3K4me1. We generated a 12-state chromatin model, named E1 to E12, and evaluated the enrichment of each chromatin state in relevant chromatin regions (**Fig. 5A and 5B**). We focused on chromatin states with histone marks of active promoters (E12), closed chromatin (E2, E3, and E4), and active (E9), poised (E8), and intragenic (E7) enhancers. Using these results, we evaluated the enrichment of chromatin states in the promoters and bodies of genes overexpressed in



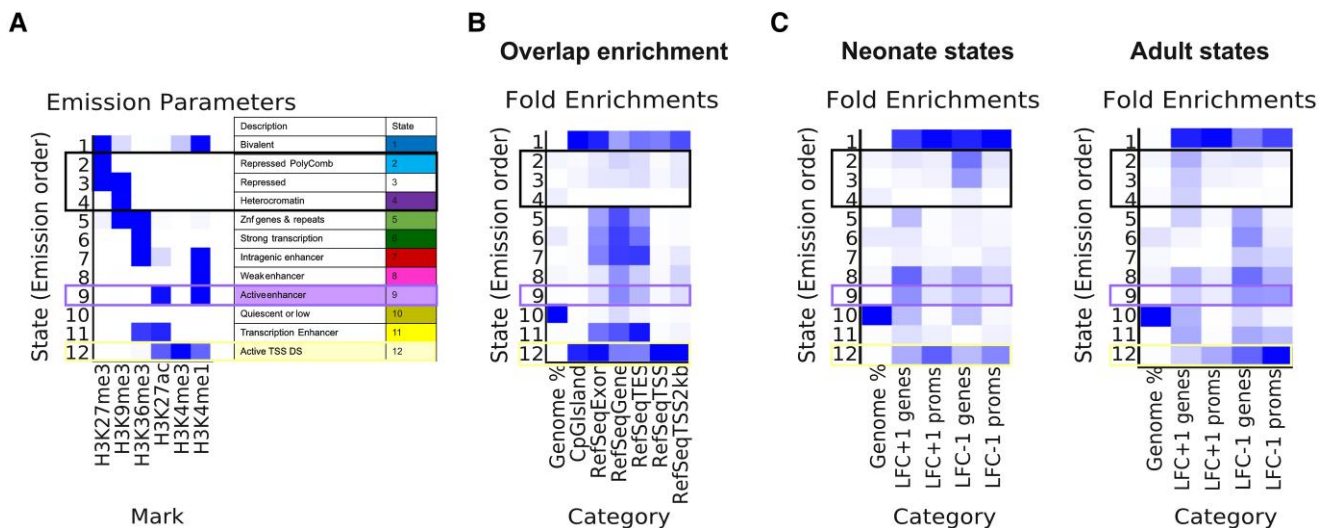
**Fig. 4.** Histone marks in promoter regions of genes overexpressed in neonatal or adult CD4<sup>+</sup> T cells. Representative histone mark profiles (H3K4me3, H3K4me1, H3K27me3, and H3K27ac) in promoter regions (around TSS) of genes overexpressed in neonatal (A) and adult cells (B), as compared to genes that were not differentially expressed and the overexpressed genes of the opposite population. We show the average distribution (profiles) of the mark in the promoters of the genes and the average score (boxplots) of the mark in the neonatal (N) and adult (A) cells. ChIP-seq data were obtained from the BLUEPRINT Consortium. We performed the Mann-Whitney test, since our data were not normally distributed according to the Shapiro-Wilk test.

neonatal or adult cells in the transcriptome. As expected, in the chromatin of neonatal cells, the promoters of genes overexpressed in neonatal cells are enriched in E12, corresponding to active promoters. Remarkably, the bodies of the same genes are enriched in states E9 and E8, corresponding to active and poised enhancers, respectively, while the genes downregulated in neonatal cells are enriched in states E2 and E3, corresponding to closed chromatin. On the other hand, in the chromatin of adult cells, the promoters of genes overexpressed in these cells present enrichment of E12, and the bodies present enrichment of E9, E8, and E7, while the downregulated genes present enrichment of E2, E3, and E4. These results suggest that the gene expression profile is underlined by the epigenomic landscape of neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells. Specifically, the genes overexpressed in neonatal cells have opening marks along the promoters and gene bodies, while the genes underexpressed in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells but overexpressed in adult cells are closed along the gene body by H3K27me3 and/or H3K9me3. Also, to achieve adult-like gene expression, neonatal genes

must be closed, and new promoters and gene bodies must open in adult cells.

We then explored the changes in chromatin states from neonate to adult CD4<sup>+</sup> T cells as shown in the Sankey plot (Fig. 6A) and found that the biggest changes occurred in enhancers (active, intergenic, and poised) and bimodal regions, showing a great dynamic chromatin remodeling from neonatal to adult CD4<sup>+</sup> T cells.

We then used IGV to visualize the RNA-seq signal along with the chromatin states generated with ChromHMM at some relevant genes. Figure 6B shows the landscape along the GLUT1 gene, overexpressed in neonatal cells, while Fig. 6C shows the landscape along CAMK2N1, overexpressed in adult cells. In the case of GLUT1, although active promoters are present in neonatal and adult cells, additional active enhancer regions are present in neonatal cells, possibly inducing a higher expression of this gene. In the case of CAMK2N1, overexpressed in adult cells, the active promoter state is found only in adult cells. The visualization of the HOX cluster expression peaks and its regulatory regions are shown in Supplementary Fig. 11.



**Fig. 5.** The epigenetic landscape of the neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells. Chromatin states were computed with the software ChromHMM (A) generating a 12-state model. The color code for the ChromHMM states is shown. (B) Genome-wide region enrichment for the chromatin states. (C) Enrichment of relevant chromatin regions (differentially expressed genes and promoters) with chromatin states for adult and neonatal cells. LFC + 1: overexpressed in neonatal cells with log<sub>2</sub> fold change >1. LFC-1: overexpressed in adult cells with log<sub>2</sub> fold change <-1. Proms: promoters.

To further understand the potential function of regulatory regions enriched in the neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells, we aligned the chromatin regions that were designated as active enhancers or active promoters in our ChromHMM analysis with SNPs identified in 413 GWAS, obtained from the IEU OpenGWAS project. We found a significant enrichment of SNPs associated with rheumatoid arthritis and asthma in the adult cell active promoters, in agreement with the typical high activation profile of the adult cells. No correlation was found in the neonatal promoters with GWAS data. In contrast, 2 hits were found in the active enhancers of neonatal cells with prostate cancer, in agreement with the high expression of the HOX genes and the higher proliferative profile of these cells. No correlations were found in the adult cells' enhancers (Fig. 6D).

We next focused on the active enhancers and active promoters' regions (states 9 and 12, respectively), annotated them to the nearest gene using the GREAT tool, and identified the genes annotated exclusively to neonatal or adult cells. [Supplementary Fig. 12A](#) displays the enhancer and promoter regions of neonatal and adult cells, showing very few shared regions, with the number of regions associated with each of them. [Supplementary Fig. 12B](#) shows the top 20 enriched pathways with the genes annotated to active enhancer regions only in neonatal cells, while no pathways were enriched with the genes annotated to regulatory regions present only in adult cells. Among the pathways enriched in neonatal cells, we found overrepresented the PD-L1-PD1 pathway, which has been reported as a master regulator of tolerance in tumor microenvironments,<sup>46</sup> as well as the senescence pathway, also associated with immunosuppression. Antiviral response pathways and other pathways already revealed by the transcriptomic signatures were also enriched, including the HIF pathway and proliferation. TCR signaling genes were also found associated with active enhancers, including positive and negative signal receptors (CD3, CTLA4, and PD-1). Genes involved in AP-1, NF-κB, and NFAT activation, as well as in NOD pathways, were also found enriched.

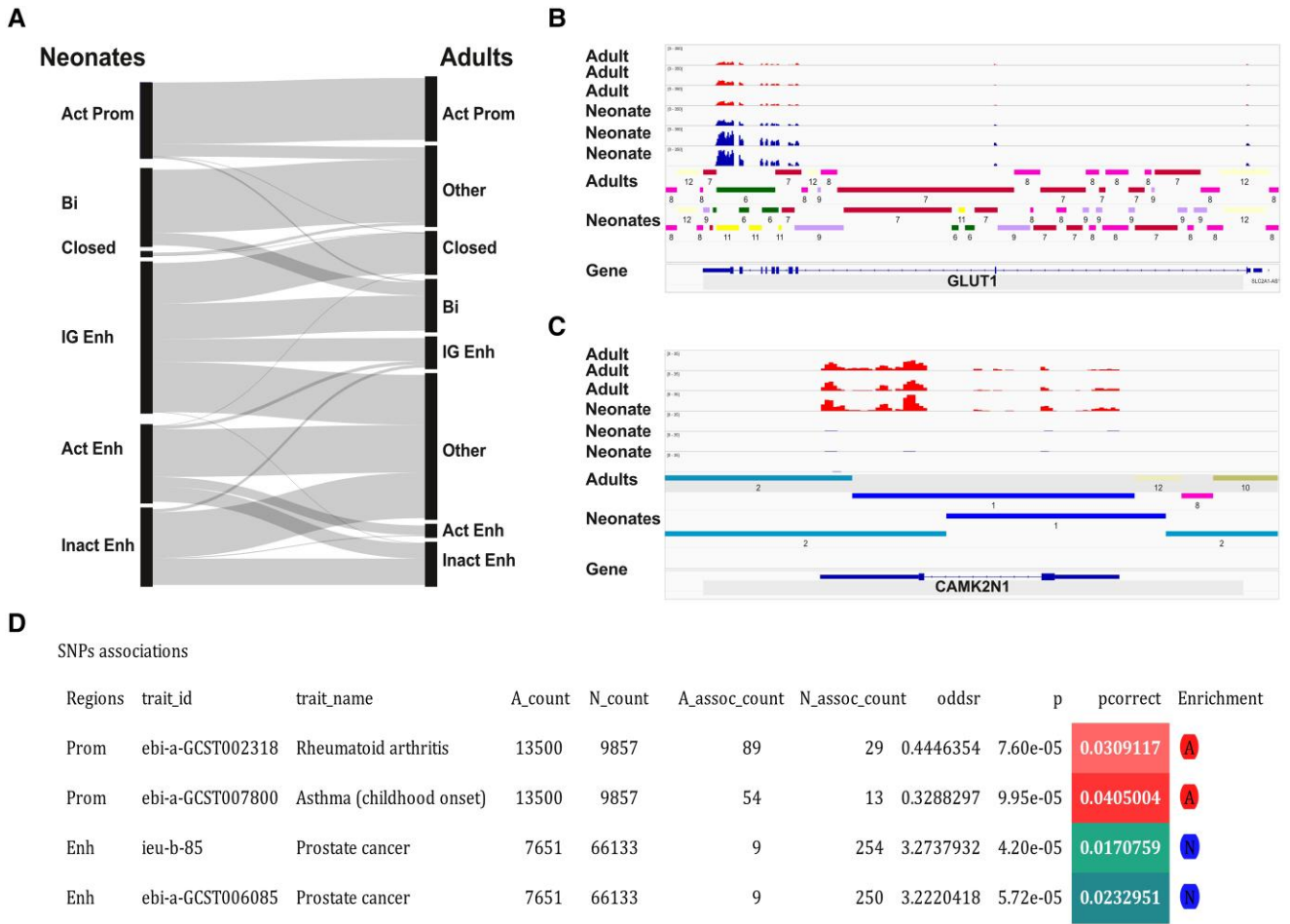
Finally in the summary figure, we present the main conclusions of our study, showing that neonatal cells are characterized by a specific epigenetic and gene expression profile, pointing to

particular physiological adaptations, which should be considered in the design of vaccines or therapeutic strategies targeting the neonatal immune response.

#### 4. Discussion

In accordance to our hypothesis, this study provides an identification of the unique regulatory network for neonatal and adult CD4<sup>+</sup> T cells. The main signature of the unstimulated neonatal cell transcriptome is the expression of genes associated with proliferation, aerobic glycolysis, antimicrobial activities, and regulation of cell signaling. Our study reveals a characteristic expression of transcription factors in neonatal cells, with overexpression of master regulators of chromatin structure, including ZNF423, which has been related to DNA damage repair<sup>32</sup>; Bcl11a transcription factor, which binds the SWI/SNF chromatin remodelers<sup>33</sup>; CEBPA, a transcription factor controlling enhancer expression and function, metabolism, proliferation, and myeloid cell development<sup>37</sup>; and the transcription factor TOX, which is a master negative regulator of effector functions, reported for T-cell exhaustion.<sup>34</sup>

In agreement with a rather limited response, the gene expression after T-cell activation was much lower in the neonatal as compared with adult cells and was not a typical T-cell response. On the contrary, the proliferation response was higher in the neonatal than in the adult cells. This is in agreement with our identification of the high expression of hyperproliferative genes in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, particularly those coding for the family of HOXA transcription factors.<sup>47,48</sup> This was unexpected, as a progressive downmodulation of HOXA transcripts has been reported during thymic cell maturation,<sup>31,49</sup> while sustained expression of HOXA genes during T-cell differentiation has been shown to impair T-cell maturation and induce oncogenic transformation.<sup>31</sup> Therefore, the maintained expression of these genes in neonatal T cells might impose an "immature" epigenetic state contributing to the higher proliferation and yet more tolerant immune response phenotype of these cells. In agreement with proliferation and yet limited adult-like effector functions of the neonatal cells, we found a significant induction of IL-2 in neonatal cells, and a



**Fig. 6.** Changes in the chromatin states between neonate and adult cells. (A) Sankey plot showing the changes between relevant chromatin states. (B, C) Genomic tracks for 2 selected genes overexpressed in neonatal cells or in adult cells, with their chromatin state annotations shown, with the color and number codes depicted in Fig. 5. (D) Assignment of SNP-associated diseases, from 413 GWAS to neonatal or adult regulatory regions classified as active promoters or enhancers, from our ChromHMM analysis. Act Enh, active enhancer; Act Prom, active promoter; Bi, bimodal regions; Closed, closed chromatin; IG Enh, intergenic enhancer; Inact Enh, inactive enhancer; Other, other unidentified marks.

much lower amount of effector cytokines of the major Th pathways was observed in the neonatal as compared to that of adult cells. The levels of IL-2 expression were still higher in adult cells, yet they proliferated less than neonatal cells. This could be due to the high expression in neonatal cells of hyperproliferative genes, glycolytic enzymes potentially increasing glycolysis, which is needed to sustain proliferation or other inflammatory cytokines.

The transcription factors overexpressed in adult cells are related to typical T-cell function, such as the T-bet (TBX21) and STAT4, which are the Th1 signature transcription factors, and EOMES, which marks memory cells. The presence of these factors does not imply that cells are not naive but that the basal expression, due to the open chromatin in the adult naive cells, may prepare them for effector or memory differentiation, particularly the Th1 profile.

The unique transcriptome of the neonatal CD4+ T cells is further accompanied by a characteristic epigenomic landscape. Overexpressed genes in adult cells have higher levels of open chromatin marks, H3K4me3, H3K4me1, and H3K27ac in their promoter regions, with a significantly lower level of the closed chromatin mark H3K27me3. In contrast, upregulated genes in neonatal cells have slightly higher levels of open chromatin marks, with a slight but significant difference in the closed

chromatin mark H3K27me3. This suggests that the change of neonatal toward adult cells involves a fine regulation of histone marks, particularly H3K27me3. A potential caveat of this study is the origin of the samples used for transcriptome analysis (Mexican population and young adults) and the European population for the epigenomic data and the SNP analysis. We found, however, a similar transcriptomic signature of the top neonatal overexpressed genes and transcription factors with those from BLUEPRINT data. Furthermore, the transcriptomic and epigenetic analysis results are in agreement with each other, suggesting that the profiles shown are not particular for a human ethnic population but broad to all humans.

Combining the chromatin marks analyzed, we defined 12 chromatin states and found a good correspondence between gene expression (RNA-seq) and epigenomic landscape (chromatin state) for neonatal and adult cells (Fig. 5). We then visualized the chromatin states along the RNA-seq signal for selected genes and found that these states corresponded with the level of expression of the genes (Fig. 6). Overexpressed genes in neonatal cells are associated with intergenic active enhancer regions (H3K4me1+H3K27ac+) as well as active promoters. To further evaluate the role of active enhancers on gene expression, we performed the functional annotation analysis of the genes associated

with active enhancers in neonatal cells. This led us to identify 146 enriched pathways. One of these pathways was the same as in the transcriptomic signature (HIF-1 signaling pathway), which is related to the central carbon metabolism in cancer. Other genes were part of other signaling pathways, with functions related to the genes overexpressed in the neonatal cells. For instance, cancer-related pathways, presumably related to the overexpression of the hyperproliferative genes, focal adhesion, and migration events (also related to Rap1 signaling pathway), were also found in genes close to the active enhancers. We also found a strong enrichment in pathways related to tolerance and the regulatory Th17 pathway. The epigenetic landscape expands the transcriptome analysis, which shows what is happening in the cells at a precise moment, to the readiness of the cells to respond in particular ways. Hence, we do not expect the corresponding annotations to be identical.

We have previously published the transcriptomic and epigenomic analysis of neonatal CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>18</sup> Several characteristics are shared in the neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, such as cell cycle, antiviral response pathways, and antimicrobial peptides expression, but there are also important differences. Specifically, in neonatal CD4<sup>+</sup> T cells, genes of the TCR signaling pathway were associated with active enhancers, which suggests that CD4<sup>+</sup> T cells are readier to activate cell signaling upon the proper maturation stimuli. Negative signaling is also more strongly associated with the CD4<sup>+</sup> T cells, including exhaustion-like gene expression (PD-1/PD-L1, cellular senescence, apoptosis, necroptosis). Another difference consists of the higher proliferation of neonatal CD4<sup>+</sup> T cells in response to stimulation, which was not found in the CD8<sup>+</sup> T-cell population. Remarkably, neonatal CD4<sup>+</sup> T cells appear to be ready to activate all cell functions, while they have strong regulatory regions. It could be very interesting to find which signals regulate the expression of either group of genes.

The limitations of our study are the number of samples sequenced, although we obtained a statistically significant signature of differentially expressed genes. In addition, our transcriptome results were confirmed by comparison with the BLUEPRINT RNA-seq data, epigenetic analysis, changes in protein expression in basal conditions, and changes in gene expression, proliferation, and cytokine secretion upon activation. Although the differences between neonatal and adult overexpressed genes are maintained in both data sets, there were differences in the adult cells' gene expression between our data and that of BLUEPRINT. One explanation could be that the mean age of BLUEPRINT samples was over 60 yr, and our transcriptome was on young adults, even if in both cases the data were from naive cells. Another limitation of our study is that it was performed in cord blood cells, because to be able to purify CD4<sup>+</sup>, we needed at least 15 mL of blood, which would be impossible to obtain otherwise. Cord blood remains an important reference, and a good correlation has been found between cord blood parameters and infants' output in many studies, cited in Ariyakumar et al.<sup>50</sup> It has been claimed that cord blood does not represent neonates' blood,<sup>51</sup> but it has been shown that after birth, there are changes in immune cells within hours, making it difficult to evaluate the best time to pick a sample.<sup>50</sup>

In any case, our data show that neonatal CD4<sup>+</sup> T cells have a unique transcriptomic and epigenomic signature, enriched in proliferation, low response, and glycolysis, which predisposes them to lower immune responses. In a recent single-cell sequencing study, it was shown that in the transition of human fetal to adult T cells, the cells evolve in a progressive way, rather than in waves, suggesting that the neonatal T cells mature into adult cells<sup>52</sup> and are not a unique population that is replaced by the adult-like cells.

In a different study, it was shown that immune cells follow a stereotypic developmental pattern toward the adult-like cells.<sup>51</sup> We found that histone marks, particularly H3K27me3, are important in the establishment of the unique genomic structure of neonatal cells. Several enzymes participating in the methylation of this particular histone mark have been found.<sup>53</sup> It will be interesting to characterize these enzyme functions in the neonatal T cells.

Altogether, our results explain many characteristics of the neonatal CD4<sup>+</sup> T cells and identify the potential molecules and pathways associated with these, which could be considered in attempts to better treat the newborn population.

## Acknowledgments

We thank the blood donors, mothers, babies, and staff of Hospital José G. Parres and Servicios de Salud Morelos for granting access to neonatal blood and leukocyte concentrates. We also thank the Transcriptomics and Genomics Marseille-Luminy (TGML) platform for sequencing RNA-seq samples. TGML is a member of the France Genomique Consortium (ANR-10-INBS-0009).

## Author contributions

L.A.K.-C., O.R.-J., and M.A.S. conceived experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. O.R.-J. and M.A.S. conceived and supervised the project, revised the manuscript, and secured funding. D.G.-R. and C.J.V.-M. performed experiments. S.S. financed the RNA-seq experiments and contributed to the analysis of the data and writing of the manuscript. A.G. performed the analysis of the alignment of GWAS/SNPs with the regulatory sequences and A.M.-R. and D.T. provided expertise and feedback.

## Supplementary material

Supplementary materials are available at *Journal of Leukocyte Biology* online.

## Funding

Work in the M.A.S. and O.R.-J. laboratory was supported by Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías CONAHCYT grants FC 1690 and CF 2019/1727995. Work in the laboratory of S.S. was supported by recurrent funding from Institut national de la santé et de la recherche médicale INSERM and Aix-Marseille University, as well as by funding from International Career Grant INCA (PLBIO018-031 INCA\_12619). AMR was supported by Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías grants no. [11311] and [6390], and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) grants no. IA203021 and IN218023. This work was also supported by Evaluation-orientation de la Coopération Scientifique/Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior/Secretaría de Educación Pública, México/Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (ECOS/ANUIES/SEP/CONACYT) grant M17S02.

Conflict of interest statement. None declared.

## References

- Levels and trends in child mortality report. [accessed 2019 Aug 1]. <https://www.unicef.org/reports/levels-and-trends-child-mortality-report-2019>.



- malignancy. *Nat Genet.* 2013;45(6):592–601. <https://doi.org/10.1038/ng.2628>
34. Bordon Y. TOX for tired T cells. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(8):476. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0193-9>
  35. Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia.* 2013;27(5):1000–1008. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.356>
  36. Manley NR, Capecchi MR. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development.* 1995;121(7):1989–2003. <https://doi.org/10.1242/dev.121.7.1989>
  37. Tada Y, Brena RM, Hackanson B, Morrison C, Otterson GA, Plass C. Epigenetic modulation of tumor suppressor CCAAT/enhancer binding protein alpha activity in lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(6):396–406. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj093>
  38. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, Chirico G. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol Neonate.* 2003;84(4):297–303. <https://doi.org/10.1159/000073638>
  39. Zaghouani H, Hoeman CM, Adkins B. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol.* 2009;30(12):585–591. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.09.002>
  40. Aliahmad P, Kadavallore A, de la Torre B, Kappes D, Kaye J. TOX is required for development of the CD4 T cell lineage gene program. *J Immunol.* 2011;187(11):5931–5940. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101474>
  41. Ikewaki N, Sonoda T, Inoko H. Unique properties of cluster of differentiation 93 in the umbilical cord blood of neonates. *Microbiol Immunol.* 2013;57(12):822–832. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12097>
  42. Shi X, Ma W, Duan S, Shi Q, Wu S, Hao S, Dong G, Li J, Song Y, Liu C, et al. Single-cell transcriptional diversity of neonatal umbilical cord blood immune cells reveals neonatal immune tolerance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;608:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.132>
  43. Tanaskovic S, Fernandez S, Price P, Lee S, French MA. CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+ T-cells or gammadelta T-cells, in HIV patients responding to ART. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(3):321–327. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.108>
  44. Labastida-Conde RG, Ramirez-Pliego O, Peleteiro-Olmedo M, Lopez-Guerrero DV, Badillo-Godinez OD, Gutierrez-Xicotencatl ML, Rosas-Salgado G, Gonzalez-Fernandez A, Esquivel-Guadarrama FR, Santana MA. Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4(+) T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine.* 2018;36(29):4188–4197. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.005>
  45. Rodríguez-Jorge O, Kempis-Calanis LA, Abou-Jaoude W, Gutierrez-Reyna DY, Hernandez C, Ramirez-Pliego O, Thomas-Chollier M, Spicuglia S, Santana MA, Thieffry D. Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4(+) T cell activation. *Sci Signal.* 2019;12(577):eaar3641. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar3641>
  46. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10:727–742.
  47. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells.* 1996;14(3):281–291. <https://doi.org/10.1002/stem.140281>
  48. Magli MC, Largman C, Lawrence HJ. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol.* 1997;173(2):168–177. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199711\)173:2<168::AID-JCP16>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<168::AID-JCP16>3.0.CO;2-C)
  49. Taghon T, Thys K, De Smedt M, Weerkamp F, Staal FJ, Plum J, Leclercq G. Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: implications for human T-cell development. *Leukemia.* 2003;17(6):1157–1163. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402947>
  50. Ariyakumar G, Gee S, Das A, Kamdar S, Tribe RM, Gibbons DL. Activation of lymphocytes in healthy neonates within hours of birth. *Front Immunol.* 2022;13:883933. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.883933>
  51. Olin A, Henckel E, Chen Y, Lakshmikanth T, Pou C, Mikes J, Gustafsson A, Bernhardsson AK, Zhang C, Bohlin K, et al. Stereotypic immune system development in newborn children. *Cell.* 2018;174(5):1277–1292.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.045>
  52. Bunis DG, Bronevetsky Y, Krow-Lucal E, Bhakta NR, Kim CC, Nerella S, Jones N, Mendoza VF, Bryson YJ, Gern JE, et al. Single-cell mapping of progressive fetal-to-adult transition in human naive T cells. *Cell Rep.* 2021;34(1):108573. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108573>
  53. Pan MR, Hsu MC, Chen LT, Hung WC. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):209–223. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2596-8>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas



Cuernavaca, Mor., al 01 de febrero de 2024

**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS**

Presente

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS LINFOCITOS T CD4+ DE ADULTOS Y NEONATOS HUMANOS EN FUNCIÓN DE LA ACTIVACIÓN, LA EDAD GESTACIONAL Y EL TIPO DE NACIMIENTO, que presenta la alumna **M. en C. Linda Aimara Kempis Calanis** (10021250) para obtener el título de Doctor en Ciencias.

Director de tesis: Dra. María Angélica Santana Calderón

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC - UAEM	APROBADO	
Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay IBT - UNAM	APROBADO	
Dra. Vanessa López Guerrero FN - UAEM	APROBADO	
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva IBT - UNAM	APROBADO	
Dra. Gabriela Rosas Salgado FM-UAEM	APROBADO	
Dra. María Angelica Santana Calderón CIDC - UAEM	APROBADO	





Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2024-02-01 12:48:36 | Firmante

i76KFRzY7ilpj5ibbiT8mr9inaUZaQiuas4dcuRF8CAp+hDZZU+JHdQxNZXC0ntt6lqrmFSBXzZQ48HswcK879Lzj/Ux9XwsN+q7nliX5zW6lPmN7uvvQsYe9/7WaNdEyUPbcYzXst4MS/LZgqe3OvXQyRRphp5UmjNaxkpRw7jL+DHDTgXGdPJ7pGwU1EKmfKak5f70fwSjLcNBS8Ug04Pmbiwu5xvFLuyRKY68IZVUzypEve3XHbFUVLioR877UvGuqX9DopKeDN S3FB4Bkhx2E/AkXvTfu/le5TclLasSPhbyYgyZYzxF6GrODUWpj1LHAIP3XaR3DXBGuTMg==

MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA | Fecha:2024-02-01 14:29:01 | Firmante

xDqjNlxcDtlJhzWRRPpfqYudNuulF7xg7POWi+xyq+KAVd38rEE4RrNqNpNh8y5nEHl2P/Xuo2MxhpYtrsZFbCDfXfDQFHqfom9sVqyf9QqRu/0ueoISGjHtVQw+3d2WGQBgZYdk gxWEM1zGy13/1dd76gBHZB2gzm8WNQqOIPouVD+QP1HYz4+NT9Cf7v1xat2aKDbZn1X3ZU3oZfcjE4Dq/IYZ1BM5I3bCruhZ+Mmtaif3rs/LlBdZoaB7U5N0zOeQ4lJXouzeC7 2Rsezi8j7ZU0rDE4+tvHhSa7Qp8ypGll0ST1eBl5QauB/cK/qjASXU6d2+aFqKYAW84g==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2024-02-01 14:41:47 | Firmante

gcyuKtPyc8eUMA6cWGV2daPGf4CmQZhcflPtGCyteWnM9Bvrc1h1rGTO5W+bQgYTIwzLluEJSIs/AYoI56wrAG04ZbBs2dyUeHr7+NDKJ1ZunTwDZtdcmUmBFeXMjkUU5K2DAj ZHvZbBR09DATIbEHvrQuKITw25oCfQQd/VQ9dffiXjYZtlLkpBa460+g0ot6/V0GNtjRHlqj0n5qxbL8+yRYfIBCvd/+zb8CyJ5hDhQIDqzgtC/kladkCabu15G4KdejSKwkPwrXAOresKm GWJ8AOBtdi84M2NKvmKaW37eVB206VXmm7O+7STkPQz7mbysoEID8jFPRByhnrQ==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2024-02-01 14:58:55 | Firmante

Y0tK+GKOAMzNFehkmQrsutOfu8fHTLGrXpysEtHDXxDIV8zaXCn49cnkqMhbUx6slx2KKziAQMbEJHREpXBEeODGqNNiwme8xebxqbgNtrcjHDgDV6jPyc81r3flpVD1x0Th6IW YNdV4QvQKBRx9MBDZlPT6dg3skZtB8uXM2IKrSuGYlawfWEpOfdyXnWeHluaApyKA9ZkLgXMSiXtuZVgrzInGv3e+9JKi/pAsl3fgCTaRlqLILD0fzzg++IWm4FM3EhQ1MfURW5/ Yo4mXc8pbj/QGt4kXR/3RsWunbJwka4gKPUKJBMu2lV8pg3jNycyJQz1ehPIBGSllJqdg==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2024-02-01 16:31:53 | Firmante

XZV5yA9mhfKk4bS0du0opDC9+EOYI4YUTodkg2T/P++wgJ8ctfCD2c2o+6gHXFHRZynTW6Rophykb0tAXiL2tSDDhLEP/j62hddQ61yHwH+Yu69bZ90SDM8kcpUL7/Mi3Yw6PX czQhLkjjwnj2xgzxCG2nhVBcAM0zVOZk7SgybP3tOMjxrZt08MN336Y0u+PrGPZKX6qF4tMqfn+2fZFLgYvGTwmwfyB7lQ7w+j3ma+4Ap9lCUAngN2Lejhe6/CLk6iyecmsQB5xeu KlujyY0Ad51c5JikZ4LZORO40tupqetZpewDmm2C3DWz06vtjzlad9TulKuO+B45WIOA==

YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY | Fecha:2024-02-05 22:41:02 | Firmante

gMVodajhMlsVapdsEXHMjwHwzu2iB13sekY5JvZ00KQUGggyQtgs/21HHGUqTf/Loh4cbxH9eTF0lgr26M0VwL80HKFgh0Cmxd+5djLh3WdswZRLRbxbg3t8sXSsFCHwPgJ6zL0eN PXPQSTnKVz9K9mrq0fD2hzdp0+Ga9/a3FpKID6+oss2jUVs7pqR9yoZESDZTMXt5ER3tKfm4Zj20EgkMXWmj3e3LQPRCvih3A6AIDDAg90KUEoYHvzILP9+vndjz4eDUQLzYFO4 CLBlahFC8EG7OZi76Z2pSSQuEKkdyDvlqazxJbCLC9R5LXXYyilDwGdG7o+w7yaN3juQPJw==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2024-02-06 11:35:19 | Firmante

PqtxA7ZshsGK7QTrrL2i8uqSfnQ43gXv2v4grHaDOGgmDM3wMesT2viCTP7eDLM05ZENtnKKUAgDTCDro7hoxhCiP5pWbDHddkK+LjzidjIVyN5hn2YjBv8bEJJCbXQ3KoMgda rXWgXNjGqzvZQ6SbnFO//3CjBfG9nWa/PqX9kDS/ZRW6ZbXyyzPWTgSKgg7wz5kSiwFmz5flI21F8i5cSWQWZtBkuWHecCaKQPn1GdZm+F7EQbm305yup/yNisDmVi+K15xyT mWbgAQo4I0d80+JkRH5T3OLJAmx50gXy7wFuogoTZPFf4ukZVojSAt/4ZziYfCfHJydtW+UQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Hgy1pFIDZ

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CxOxjULbNNpsTBb2JC4oKtdjGC10fbGM

