

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Estudio integrativo de los linfocitos T de neonatos prematuros y de término, nacidos por cesárea y parto vaginal.

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARLOS JESUS VENTURA MARTINEZ

DIRECTOR: DR. OTONIEL RODRIGUEZ JORGE

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2026

RESUMEN

La adaptación del sistema inmunológico al nacimiento es un proceso fundamental para la transición del recién nacido a un nuevo ambiente extrauterino lleno de antígenos extraños, mayormente inofensivos. Sin embargo, factores como la edad gestacional y el modo de nacimiento pueden influir en el desarrollo y la función de los linfocitos T neonatales, modificando su capacidad de respuesta ante retos inmunológicos. Por un lado, el parto prematuro se ha asociado con una respuesta inflamatoria exacerbada, mientras que el parto por cesárea se ha asociado con un posterior surgimiento de alergias. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la edad gestacional (prematuro vs término) y el tipo de nacimiento sobre la activación de los linfocitos T neonatales, es decir, la activación de los factores transcripcionales NFAT, NF- κ B y AP-1, la proliferación celular y la producción de citocinas. Estos experimentos fueron realizados en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ obtenidos de sangre de cordón umbilical de neonatos de término nacidos por parto vaginal o cesárea y de neonatos de pretérmino nacidos por cesárea. Adicionalmente, se usó sangre periférica de adulto para realizar comparaciones. Para ello, las células fueron estimuladas *in vitro* mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 o mediante la combinación anti-CD3 y flagelina, con el propósito de evaluar la contribución de la señalización a través del receptor TLR-5. Posteriormente, se analizaron la activación de factores transcripcionales, la expresión de marcadores de activación, la proliferación celular, la producción de citocinas y los programas transcripcionales asociados a cada grupo de estudio. Los resultados demostraron que la edad gestacional y el modo de nacimiento influyen significativamente en la respuesta funcional de los linfocitos T neonatales. Los neonatos nacidos por parto vaginal presentaron una activación más robusta de las vías asociadas con NF- κ B y AP-1, acompañada de una mayor producción de citocinas y moléculas efectoras y de un perfil transcripcional compatible con una respuesta inmunológica más activa. Por el contrario, los neonatos nacidos por cesárea mostraron una mayor capacidad proliferativa y la activación de programas del desarrollo celular, aunque con una menor producción de citocinas inflamatorias. Asimismo, los neonatos prematuros exhibieron una respuesta distintiva caracterizada por una elevada proliferación celular y programas transcripcionales asociados con inflamación, ciclo celular y producción de citocinas proinflamatorias. En conjunto, estos hallazgos indican que la prematuridad y el modo de nacimiento condicionan programas de activación en el momento del nacimiento, modulando la funcionalidad de los linfocitos T neonatales. Estos resultados contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos que regulan la adaptación inmunológica temprana y proporcionan información relevante para explicar las diferencias observadas en la susceptibilidad a infecciones y en el desarrollo inmunitario durante los primeros meses de vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por haberme otorgado la beca de doctorado 960641.

A las autoridades y al personal de Servicios de Salud de Morelos, de las unidades: Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, Hospital General de Cuernavaca, Hospital General de Temixco y la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación por facilidades otorgadas para la realización de muestreo en campo.

A las madres y bebés que permitieron la captura de las muestras.

Al Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas.

Al Centro de Investigación en Dinámica Celular.

Al Laboratorio de Inmunología Celular y de Sistemas.

A mi tutor, el Dr. Otoniel Rodríguez Jorge, por aceptarme como su estudiante de doctorado, por todo su apoyo dentro y fuera del laboratorio, en lo laboral y personal.

A la Dra. Ma. Angélica Santana Calderón, por haberme acercado al mundo de la inmunología, sin duda alguna, la mejor profesora y un gran ejemplo a seguir.

A mi comité tutorial integrado por: Dra. Delia Vanessa López Guerrero, Dra. Marion Emilie Genevieve Brunck, Dra. Gabriela Rosas Salgado y el Dr. Armando Hernández Mendoza, por haberme apoyado durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Linda Aimara Kempis Cálanis por toda su ayuda, especialmente en el desarrollo bioinformático.

Al técnico del laboratorio Biol. Oscar Ramírez, a mis compañeros y amigos del laboratorio, por apoyarme ante cualquier duda que tuviera y por darme siempre buenos consejos.

A mis amigos y familiares por haber estado siempre presentes y nunca dejaron de darme ánimos para seguir adelante.

INDICE

RESUMEN	2
AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN	5
El sistema inmunológico	5
Sistema inmune innato	5
Sistema inmune adaptativo	11
Inicio de la respuesta inmune y activación de los linfocitos T	13
Activación de los linfocitos T a través del receptor de células T (TCR)	16
Factores transcripcionales que regulan la expresión génica del linfocito T	20
NFAT	20
NF- κ B	21
AP-1	22
Activación de NF- κ B y AP-1 por la vía del receptor tipo Toll.	23
Proliferación de los linfocitos T frente al antígeno.....	26
Proliferación homeostática	28
Funciones efectoras de los linfocitos T	28
Papel de la respuesta inmune local materna en la inducción del parto	35
Inmunidad neonatal	37
Inmunidad de neonatos nacidos por cesárea	40
Inmunidad de neonatos de pretérmino	44
ANTECEDENTES	45
JUSTIFICACIÓN	49
HIPÓTESIS	50
OBJETIVOS	50
MATERIALES Y MÉTODOS:	51
RESULTADOS	54
1. Análisis de la actividad transcripcional de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de neonatos de término y prematuros.....	54
2. Activación de factores transcripcionales en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de adultos, neonatos de término nacidos por parto vaginal o cesárea y neonatos prematuros nacidos por cesárea.	61
3. Proliferación inducida por activación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de adultos, neonatos de término nacidos por cesárea o parto vaginal y neonatos prematuros.	68
4. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de células mononucleadas de sangre de cordón umbilical (CBMC).....	76
5. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ purificados de neonatos y adultos	80
5.1 Análisis de índice inmune en base a las citocinas de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	97
DISCUSIÓN	100
CONCLUSIONES	114
ANEXOS:	115
1. Tablas de función de factores transcripcionales activos en muestras de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de neonatos nacidos a término por parto vaginal o cesárea y prematuros.	115
2. Proliferación homeostática de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ neonatales.	120
3. Cinética de expresión de CD69 y CD25 en linfocitos T CD4 ⁺ de adultos y neonatos...121	
4. Gráficas de barras de datos de citocinas de linfocitos T CD4 ⁺ purificados de adultos y neonatos.	122
BIBLIOGRAFÍA	126
PUBLICACIONES REALIZADAS	137

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico

Históricamente, el término inmunidad ha hecho referencia a la protección que desarrollan los organismos en respuesta al proceso que desencadenan las enfermedades infecciosas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunológico, y a su respuesta conjunta y coordinada frente a la introducción de sustancias extrañas se le conoce como respuesta inmune.

La función fisiológica del sistema inmunológico es la defensa en contra de las infecciones. Sin embargo, sustancias extrañas no infecciosas pueden desencadenar respuestas inmunitarias [1]. En algunos casos, donde ocurre una disfunción del sistema inmune, incluso sustancias propias pueden desarrollar respuestas inmunes.

Debido a la gran cantidad de células y moléculas implicadas en la respuesta inmune, el tiempo que tardan en responder y su especificidad frente a un tipo de antígeno, se ha dividido el sistema inmunológico en dos ramas: el sistema inmune innato y adaptativo, de los cuales hablaremos a continuación.

Sistema inmune innato

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo frente a microorganismos patógenos y daño tisular. A diferencia de la inmunidad adaptativa, responde de manera rápida mediante el reconocimiento de estructuras altamente conservadas presentes en microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), así como de moléculas liberadas por células dañadas o estresadas, denominadas patrones moleculares asociados al daño (damage-associated molecular patterns, DAMPs) [2]. El reconocimiento de estas moléculas ocurre a través de receptores de reconocimiento de patrones (pattern recognition receptors, PRRs), cuya activación desencadena mecanismos efectores destinados a contener la infección y mantener la homeostasis tisular [3].

Los principales componentes de la inmunidad innata comprenden las barreras físicas y químicas, los mecanismos humorales y diversas poblaciones celulares especializadas. Las barreras epiteliales, representadas por la piel y las mucosas, constituyen la primera protección frente a la invasión microbiana, ya que limitan el acceso de microorganismos mediante uniones celulares estrechas, la producción de moco, péptidos antimicrobianos y la acción de la microbiota comensal [2], [4]. Cuando estas barreras son sobrepasadas, entran en acción los mecanismos celulares y humorales de la inmunidad innata.

Entre los componentes humorales destacan el sistema del complemento, las colectinas, las pentraxinas y otras moléculas solubles presentes en sangre y líquidos tisulares. El sistema del complemento está constituido por una serie de proteínas plasmáticas cuya activación promueve la opsonización de microorganismos, el reclutamiento de células inflamatorias y la lisis de células susceptibles mediante la formación del complejo de ataque a la membrana [2], [4].

Las principales células efectoras de la inmunidad innata incluyen neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC), células linfoides innatas (ILCs) y células asesinas naturales (Natural Killer, NK). Estas poblaciones expresan diversos PRRs que les permiten detectar microorganismos y responder rápidamente mediante la producción de mediadores inflamatorios, la fagocitosis, la citotoxicidad o la presentación de antígenos [3].

Los monocitos representan aproximadamente entre el 5 y el 10 % de los leucocitos circulantes y constituyen los principales precursores de macrófagos y de una fracción de las células dendríticas cuando existe un proceso inflamatorio que induzca su diferenciación. Tras migrar hacia los tejidos, participan en la fagocitosis, la producción de citocinas y la eliminación de microorganismos, además de contribuir a la resolución de la inflamación y a la reparación tisular [3], [4].

Los macrófagos son células residentes en prácticamente todos los tejidos y desempeñan funciones esenciales en el reconocimiento y eliminación de microorganismos. Además de su elevada capacidad fagocítica, producen citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para destruir

microorganismos y participan en la presentación de antígenos mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Asimismo, desempeñan un papel fundamental en la reparación tisular y en la regulación de la respuesta inflamatoria.

Los neutrófilos constituyen entre el 50 y el 70 % de los leucocitos circulantes y representan una de las primeras poblaciones celulares reclutadas hacia los sitios de infección [3]. Poseen un núcleo segmentado y un citoplasma rico en gránulos que contienen enzimas antimicrobianas. Sus principales mecanismos efectores incluyen la fagocitosis, la degranulación, la producción de especies reactivas de oxígeno durante el estallido respiratorio y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), constituidas por redes de ADN asociadas con proteínas antimicrobianas capaces de inmovilizar y destruir bacterias, hongos y algunos protozoarios [5].

Las células linfoides innatas (ILCs) constituyen una familia de linfocitos que carecen de receptores específicos para antígenos generados por recombinación somática. Se clasifican en ILC1, ILC2 e ILC3, de acuerdo con los factores de transcripción y citocinas que producen, desempeñando funciones análogas a las de los linfocitos Th1, Th2 y Th17, respectivamente [3]. Estas células participan en la defensa temprana frente a microorganismos, el mantenimiento de la homeostasis de las barreras epiteliales y la reparación de tejidos. Dentro de esta familia destacan las células NK, especializadas en la eliminación de células infectadas por virus y células tumorales. Estas células reconocen la disminución en la expresión de moléculas del MHC clase I y responden mediante la liberación de perforina y granzimas, además de producir citocinas como IFN- γ y TNF- α , las cuales favorecen la activación de macrófagos y el establecimiento de respuestas inmunes de tipo 1 [6], [7].

Las células dendríticas (DC) constituyen las células presentadoras de antígenos más eficientes del sistema inmunológico. Expresan una amplia variedad de PRRs capaces de detectar microorganismos y señales de daño, lo que induce su maduración y migración hacia los órganos linfoides secundarios. Durante este proceso incrementan la expresión de moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, permitiendo

la activación de linfocitos T vírgenes. De esta manera, las DC representan el principal vínculo funcional entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa [1], [8].

Tabla 1. Células del sistema inmune innato, localización, función principal y PRR expresados.			
Célula	Localización principal	Función principal	Receptores predominantes
Neutrófilos	Sangre y tejidos inflamados	Fagocitosis, degranulación, estallido respiratorio, formación de NETs	TLR2, TLR4, TLR5, NOD1, NOD2, FPR1
Monocitos	Sangre	Fagocitosis, producción de citocinas y diferenciación a macrófagos o DC	TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, NOD1, NOD2
Macrófagos	Tejidos	Fagocitosis, eliminación de microorganismos, reparación tisular y presentación de antígenos	TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, NOD1, NOD2, NLRP3
Células dendríticas convencionales (cDC)	Tejidos periféricos y órganos linfoides	Captura y presentación de antígenos; activación de linfocitos T	TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR8, TLR9, CLR
Células dendríticas plasmacitoides (pDC)	Sangre y órganos linfoides	Respuesta antiviral y producción masiva de interferones	TLR7, TLR9
Células NK	Sangre, bazo e hígado	Citotoxicidad contra células infectadas o tumorales; producción de IFN- γ	TLR2, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 (además de receptores activadores e inhibidores como NKG2D y KIR)

ILC1	Mucosas y tejidos	Defensa frente a microorganismos intracelulares	Receptores para citocinas: IL-12R, IL-18R
ILC2	Pulmón, piel e intestino	Defensa contra helmintos y reparación tisular	IL-33R (ST2), IL-25R, TSLPR
ILC3	Intestino y mucosas	Homeostasis intestinal y defensa contra bacterias extracelulares	IL-23R, IL-1R
Células cebadas	Piel y mucosas	Inicio rápido de la inflamación, defensa antiparasitaria y respuestas alérgicas	TLR2, TLR4, FcεRI
Eosinófilos	Sangre y tejidos	Defensa contra helmintos y modulación de la inflamación alérgica	TLR7, TLR9
Basófilos	Sangre	Respuesta alérgica y defensa frente a helmintos	TLR2, TLR4, FcεRI

Tabla 1. Principales células del sistema inmunitario innato, su localización, funciones efectoras y receptores predominantes. Se incluyen células mieloides, linfoides innatos y granulocitos, destacando su distribución tisular, las funciones que desempeñan en la respuesta inmunitaria y los principales PRRs involucrados en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y señales de daño (DAMPs). Los receptores listados corresponden a los descritos con mayor frecuencia para cada población celular. Obtenido de [2], [3], [6], [9].

La capacidad del sistema inmunitario innato para discriminar entre estructuras propias y extrañas depende del reconocimiento de PAMPs y DAMPs mediante los PRRs [9]. Estas moléculas son expresadas no sólo por células mieloides, sino también por células epiteliales, endoteliales e incluso por determinadas poblaciones de linfocitos. Entre las principales familias de PRRs se encuentran los receptores tipo Toll (TLR), los receptores

tipo NOD (NLR), los receptores tipo RIG-I (RLR), los receptores de lectina tipo C (CLR) y los sensores citosólicos de ADN, como la vía cGAS-STING [3], [10].

La activación de los PRRs desencadena cascadas de señalización intracelular que culminan en la activación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 e IRF3/IRF7. Como consecuencia, se induce la producción de citocinas, quimiocinas, interferones y moléculas coestimuladoras que coordinan tanto la respuesta inmunitaria innata como el desarrollo de la inmunidad adaptativa [2]. En este contexto, la activación de los PRRs no sólo promueve mecanismos efectores inmediatos, sino que también determina la naturaleza y magnitud de la respuesta de los linfocitos T [10]. Con respecto a las funciones de los PRR, la señalización inducida por estos receptores puede organizarse en dos grandes programas biológicos para simplificar su estudio: la respuesta inflamatoria y la respuesta antiviral. La respuesta inflamatoria constituye el principal mecanismo de defensa frente a bacterias extracelulares, hongos y daño tisular, caracterizándose por la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y diversas quimiocinas que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y monocitos hacia el sitio de infección [11]. Este programa depende principalmente de la activación de NF- κ B y AP-1 tras el reconocimiento de microorganismos por receptores como TLR-2, TLR-4, TLR-5, NOD1 y NOD2, así como por distintos inflamasomas [11], [12].

En contraste, la respuesta antiviral está especializada en limitar la replicación viral mediante la producción de interferones tipo I (IFN- α e IFN- β) y tipo III, inducidos tras la activación de receptores capaces de detectar ácidos nucleicos virales, entre ellos TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9, RIG-I, MDA5 y la vía cGAS-STING [9], [12]. Los interferones promueven la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs), incrementan la actividad citotóxica de las células NK y potencian la presentación de antígenos mediante moléculas del MHC clase I, favoreciendo el establecimiento de una respuesta antiviral eficaz [4].

Aunque ambos programas pueden activarse simultáneamente durante una infección, el predominio de uno u otro depende del tipo de PRR involucrado y de la naturaleza del microorganismo reconocido [10]. Esta especialización funcional permite adaptar la

respuesta inmunitaria a diferentes clases de patógenos y constituye la base para comprender cómo receptores específicos, como TLR-5, modulan tanto la respuesta inflamatoria como la activación de la inmunidad adaptativa, aspecto que representa uno de los ejes centrales del presente trabajo [13], [14].

Sistema inmune adaptativo

Cuando el patógeno escapa o sobrevive al sistema inmune innato, se activa la respuesta inmune adaptativa, que actúa de manera conjunta y coordinada con el sistema inmune innato. Esta respuesta es estimulada por la exposición a un patógeno en particular, promoviendo un aumento de la magnitud y de la capacidad defensiva [4]. El sistema inmune adaptativo reconoce un gran número de sustancias y reacciona a ellas. En contraste con la respuesta inmune innata, la adaptativa tiene memoria inmunológica que mejora la capacidad del sistema inmunológico de combatir infecciones persistentes y recurrentes. Además, posee receptores que son altamente específicos para moléculas extrañas. Esta respuesta está mediada por los linfocitos B y T [1], [15]

Por una parte, los linfocitos B reconocen antígenos a través del receptor de células B (BCR), conformado por moléculas de inmunoglobulina M (IgM) y D (IgD) presentes en la membrana de la célula, asociadas a las moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, que confieren la capacidad de señalización intracelular [1]. Una vez que las células B son activadas, proliferan y se diferencian en células plasmáticas, productoras de anticuerpos. Estos anticuerpos secretados por los linfocitos B activados son capaces de neutralizar los patógenos en los tejidos y fluidos del organismo [16].

Los linfocitos B pueden reconocer los antígenos directamente, mientras que los linfocitos T, a través del receptor de linfocitos T (TCR), solo pueden reconocer péptidos cortos generados por la proteólisis de proteínas antigénicas. Estos péptidos se asocian con el MHC de clase I (en células nucleadas) o clase II (en células presentadoras de antígenos, que también expresan MHC I) [16],[8].

Los linfocitos T tienen un receptor de antígenos que está compuesto por las cadenas α y β de la superfamilia de las inmunoglobulinas, en los linfocitos clásicos, asociadas a las cadenas CD3 y ζ que permiten la señalización intracelular. Se dividen en dos poblaciones

principales con funciones diferentes: los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) y los linfocitos T citotóxicos (Tc) [4]. Los linfocitos Th secretan citocinas, que son responsables de muchas respuestas celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa, y expresan en la superficie de membrana una proteína llamada CD4, que es un receptor que reconoce el MHC II. Por otro lado, los Tc matan a las células que exponen antígenos extraños, para los cuales fueron previamente activadas, como las células infectadas con virus y otros microorganismos intracelulares. Expresan en la superficie de su membrana una proteína llamada CD8, que reconoce al MHC I. Por lo tanto, a los linfocitos Tc también se les conoce como T CD8⁺ y los linfocitos Th como T CD4⁺ [1], [11].

En respuesta a las señales de activación, los linfocitos T CD4⁺ se diferencian en diferentes subtipos de linfocitos T cooperadores, que cumplen funciones diferentes dependiendo del patógeno al que se esté enfrentando el organismo. Entre los fenotipos más importantes, los linfocitos Th se dividen en Th1 (encargado de la eliminación de patógenos intracelulares), Th2 (encargado de la eliminación de parásitos), Th17 (que eliminan bacterias extracelulares y hongos), Tregs (promueven la homeostasis del organismo y la tolerancia periférica), Tfh (interaccionan con los linfocitos B para promover la producción de anticuerpos), entre otros [1], [16], [17]. Asimismo, se han identificado perfiles similares de linfocitos Tc [18]. Más adelante se describirá más acerca de las funciones efectoras de los linfocitos T.

La coordinación de la respuesta inmune se lleva a cabo por los linfocitos T cooperadores. Estas células se diferencian a partir de linfocitos vírgenes, que han sido previamente activados, en linfocitos efectores o de memoria. Los linfocitos T CD4⁺ efectores se encargan de coordinar la actividad de otras células inmunes para resolver el reto inmunológico. Los linfocitos T CD4⁺ de memoria son células de vida larga con una capacidad potenciada de reaccionar contra el antígeno. También existen los linfocitos T reguladores (Treg), que se encargan de proteger tejidos propios de una reacción autoinmune. Pueden diferenciarse directamente en el timo como células reguladoras o en respuesta al antígeno, cuando es presentado en un ambiente de citocinas

inmunosupresoras. Los Treg inducen la tolerancia periférica y controlan las respuestas inmunitarias [16],[11].

La respuesta citotóxica es mediada por los linfocitos T CD8⁺, que tras el reconocimiento de péptidos antigénicos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, en presencia de señales coestimuladoras y citocinas, se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL) efectores. Estas células adquieren la capacidad de eliminar células infectadas o transformadas mediante la liberación de gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas, así como la expresión del ligando Fas. Todas estas moléculas inducen la apoptosis de las células infectadas, que se abordará más adelante con detalle [19].

Inicio de la respuesta inmune y activación de los linfocitos T

El inicio y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa requieren de la captación de los antígenos y su exposición por células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, que responden si reconocen específicamente el péptido presentado (Fig. 1). Los receptores de las células T reconocen solamente péptidos cortos que están en la membrana de las APC o células nucleadas [4], [8].

En su estado inmaduro, las DC tienen una gran capacidad de endocitosis, lo que les permite ingerir antígenos con eficiencia. Las células dendríticas están presentes en muchos tejidos periféricos y se diferencian a partir de precursores de la médula ósea; después de su diferenciación, se mantienen en constante supervisión en los tejidos [8],[20].

Una vez activadas las células dendríticas (debido a señales de peligro), migran a la zona T de los nodos linfáticos, donde presentan antígenos a las células Tc y Th. Las DC tienen niveles basales de moléculas de MHC de clase I y II, así como moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (ligandos de CD28 en células T), los cuales se incrementan drásticamente durante su activación [8], [21].

Se ha observado que las DC, una vez activadas, comienzan a expresar el receptor de quimiocinas CCR7, específico para las quimiocinas CCL19 y CCL21, las cuales se

producen en los vasos linfáticos y en la zona T de los nodos linfáticos. Estas quimiocinas permiten la migración de las DC portadoras de antígenos hacia la zona T de los nodos [8], [11].

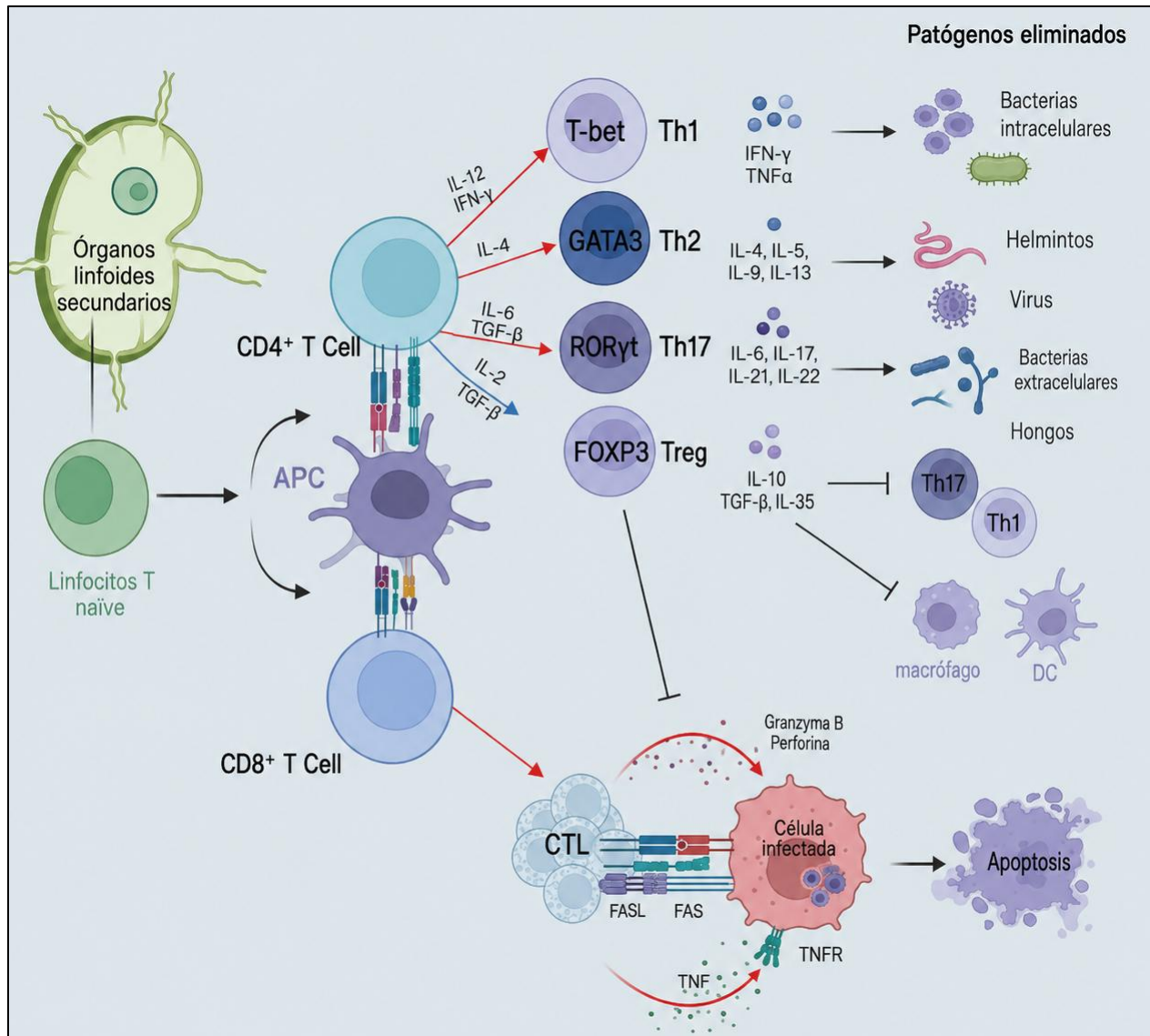


Figura 1. Activación de la respuesta inmune adaptativa mediada por células dendríticas. Las células dendríticas capturan microorganismos o sus antígenos en el sitio de infección y migran hacia los ganglios linfáticos drenantes, donde procesan y presentan los péptidos antigénicos mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a los linfocitos T vírgenes. Tras su activación y expansión clonal, los linfocitos T efectores abandonan los ganglios linfáticos y migran al tejido

infectado, donde ejercen sus funciones efectoras para eliminar el microorganismo. Tomado y modificado de [22].

Las señales necesarias que promueven la proliferación de los linfocitos T y su diferenciación en células efectoras y de memoria son: **1)** El reconocimiento del antígeno mediante el receptor de células T; **2)** La interacción entre los coestimuladores presentes en la membrana de las APC y sus ligandos en los linfocitos T; y **3)** El ambiente de citocinas producidas por las APC y otros tipos celulares [1], [21],[23].

En los últimos años se han descrito diversos factores del microambiente capaces de promover la activación del linfocito T. Se ha identificado que los nutrientes tienen la capacidad de promover una activación más robusta, por ejemplo, la presencia de glutamina, arginina o serina puede ayudar a favorecer la diferenciación al fenotipo Th1 o Th17. Por otro lado, la acumulación de ácidos grasos y su subsecuente β -oxidación promueven una diferenciación al fenotipo Treg, sin embargo, son diferentes puntos de regulación metabólica los que ayudan a definir la diferenciación [24]. El metabolismo celular desempeña un papel fundamental en la regulación de la activación, la diferenciación y la función de los linfocitos T. Tras la activación del TCR, las células T experimentan una reprogramación metabólica que les permite satisfacer las altas demandas energéticas y biosintéticas asociadas con proliferación, producción de citocinas y funciones efectoras. Dependiendo de las rutas metabólicas predominantes y de la disponibilidad de nutrientes, los linfocitos T pueden diferenciarse en distintos fenotipos funcionales [25].

Los linfocitos T efectores, como los perfiles Th1 y Th17, dependen principalmente de una elevada glucólisis aerobia y del metabolismo de la glutamina. Estas rutas metabólicas proporcionan energía rápida y metabolitos necesarios para la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos, lo que favorece una respuesta inflamatoria robusta y una alta producción de citocinas [26]. Además, la activación de vías como mTOR favorece este perfil metabólico altamente proliferativo e inflamatorio. En contraste, las células Treg y las células T de memoria utilizan preferentemente la fosforilación oxidativa y la β -oxidación de ácidos grasos. Este metabolismo es más eficiente en términos energéticos y se asocia con una mayor supervivencia celular, estabilidad funcional y capacidad de

persistencia a largo plazo. Nutrientes como la arginina y ciertos ácidos grasos favorecen este perfil metabólico oxidativo y contribuyen a la formación de memoria inmunológica y funciones reguladoras [26], [27].

Asimismo, diversos metabolitos pueden actuar como señales inmunorreguladoras. Por ejemplo, el ácido retinoico derivado de la vitamina A y los ácidos grasos de cadena corta producidos por la microbiota intestinal favorecen la diferenciación de Treg mediante mecanismos metabólicos y epigenéticos. De esta manera, el metabolismo no solo proporciona energía a los linfocitos T, sino que también actúa como un mecanismo central que integra señales ambientales y determina el destino funcional de estas células [28], [29].

Durante el desarrollo de este proyecto, se estimuló mediante un PRR expresado por las células linfoides: el TLR5. Esta señalización puede funcionar como una cuarta señal capaz de activar a los linfocitos T e inducir respuestas más eficientes [13], [30], [31]. Se ha demostrado que la activación de estos receptores puede inducir la expresión de factores transcripcionales clave para la activación eficiente del linfocito T, así como la producción de citocinas implicadas en la eliminación de patógenos intracelulares [13], [32], [33], [34].

Activación de los linfocitos T a través del receptor de células T (TCR)

El receptor de las células T (TCR) es el responsable de reconocer el péptido acoplado al MHC en las APC o en las células nucleadas. La comunicación entre las APC, las células nucleadas y las células T ocurre mediante microclusters del TCR y de los complejos MHC-péptido, que conducen a un proceso conocido como “sinapsis inmunológica”. Este proceso consiste en la formación de una interfaz altamente organizada entre ambas células, en la que se concentran receptores, moléculas de adhesión y proteínas de señalización [35]. La sinapsis inmunológica favorece la transmisión eficiente de señales de activación, estabiliza el contacto célula-célula y coordina la reorganización del citoesqueleto, permitiendo la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T [21]. En el caso de los linfocitos T citotóxicos, además, dirigen la liberación polarizada de gránulos citotóxicos hacia la célula diana, lo que asegura una respuesta específica y

minimiza el daño a las células vecinas. Este contacto es necesario para la maduración del linfocito y su respuesta inmune, generada por la activación de factores de transcripción. Estos promueven la expresión de moléculas como interleucinas, interferones y quimiocinas, entre otras. Los factores de transcripción más estudiados, que se activan en respuesta a las señales del TCR, son el factor nuclear κ (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) [16].

La comunicación entre células presentadoras de antígenos y linfocitos T ocurre mediante contactos célula-célula, que activan clústeres supramoleculares como CD3, CD4, CD8 y CD28, entre otros. Durante estos contactos, las APC y los linfocitos T reorganizan las moléculas que interactúan, desde toda la superficie celular hasta el área de contacto, para ayudar a mantener la interacción necesaria para la activación de los linfocitos T [4], [21]. En el centro de la interacción, las cadenas α y β del TCR interactúan con el péptido unido al surco del MHC. Las moléculas CD4 o CD8 reconocen un sitio diferente del MHC. También, en el centro de la sinapsis, las moléculas coestimuladoras como CD28 interactúan con su ligando en la APC, CD80 o CD86. Alrededor del agrupamiento central, existe un anillo de moléculas de adhesión CD2 y LFA1, que reconocen a CD58 e ICAM1 en la APC para ayudar a mantener una fuerte adhesión entre las células. Las interacciones entre el complejo péptido-MHC y el TCR, confieren la especificidad necesaria para la activación de los linfocitos T [1], [16].

El TCR es un complejo compuesto de dos cadenas variables ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) responsables del reconocimiento del antígeno, y cadenas invariantes CD3 (γ , δ y ϵ) y cadenas ζ . Estas dos últimas inician las cascadas de señalización, cuando se da la fosforilación de las tirosinas contenidas en sus dominios ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif) por la cinasa LCK, de la familia Src [36]. Los correceptores CD4 y CD8, en las células Th y Tc, respectivamente, facilitan el proceso de activación al tener unidas débilmente sus regiones intracitoplasmáticas a Lck (Fig. 2).

La fosforilación de los ITAM resulta en el agrupamiento de enzimas y moléculas adaptadoras en la proximidad de los receptores de la membrana plasmática. Los ITAM con tirosinas fosforiladas en la cadena ζ son el lugar de acoplamiento para la tirosina cinasa de la familia Syk llamada ZAP-70. Una vez unida ZAP-70, fosforila varias tirosinas

de moléculas adaptadoras, una de ellas es LATv [36]. Las proteínas adaptadoras se convierten en lugares de acoplamiento para enzimas celulares como la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1), la cual inicia dos vías de señalización, mediante la reacción de hidrólisis de un fosfolípido de membrana, fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂). Esta hidrólisis genera dos productos; uno de ellos, el diacilglicerol (DAG), promueve la activación de la proteína cinasa C (PKC), mientras que el otro producto, inositol 2,4,5-trifosfato (IP₃), se une a su receptor en el retículo endoplásmico y abre los canales de calcio intracelulares, permitiendo la salida de Ca²⁺ al citosol [1], [21].

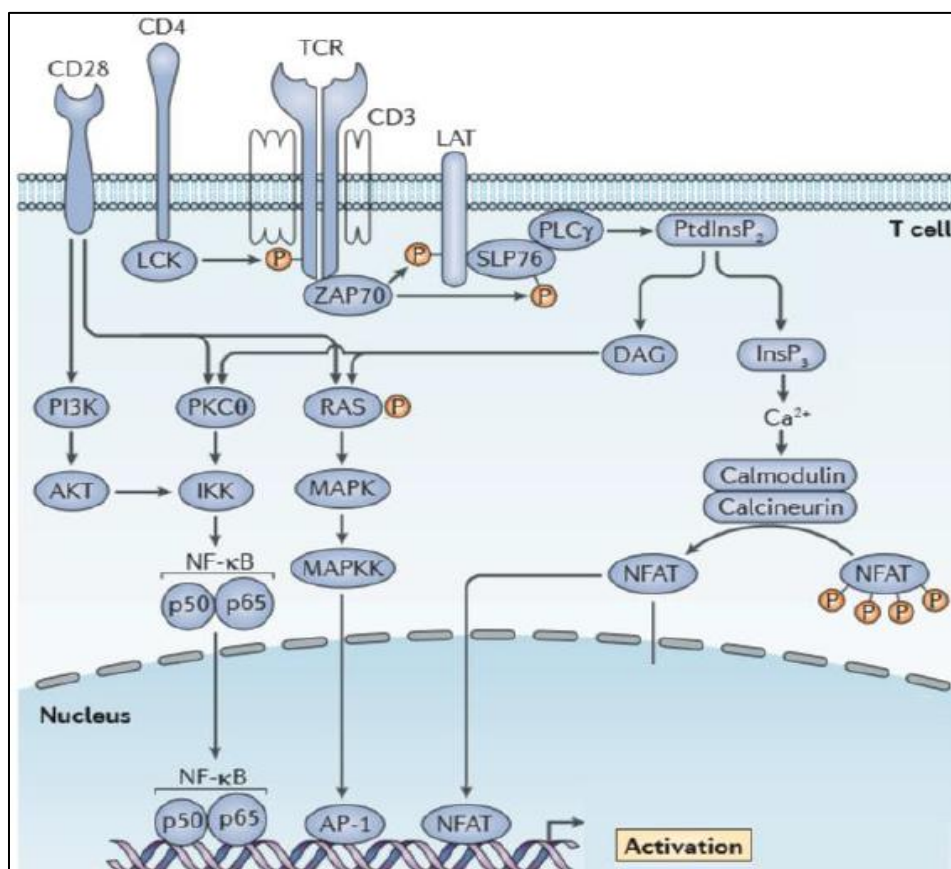


Figura 2. Activación de linfocitos T por medio del TCR (receptor de células T). La transducción de señales comienza con la fosforilación de las colas ITAM de las cadenas intracelulares de CD3 y ζ por la cinasa LCK. Posteriormente, la cinasa ZAP70 se une a los ITAM y fosforila las proteínas acopladoras SLP76 y LAT, las cuales reclutan a la fosfolipasa PLC γ . Esta proteína escinde al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdInsP₂) y provoca la liberación de diacilglicerol (DAG), el cual promueve la activación de la vía de

las MAP cinasas (MAPK) y de PKC, las cuales permiten la activación de AP-1 y NF- κ B, respectivamente. Por otro lado, el inositol trifosfato (InsP₃) se une a su receptor en el retículo endoplasmático y promueve la liberación del calcio intracelular. Este aumento de calcio activa la fosfatasa Calcineurina, la cual desfosforila al NFAT, lo que permite su translocación al núcleo [21].

El incremento de la concentración de Ca²⁺ citosólico activa la cinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina (CaMK) y una fosfatasa, la calcineurina, la cual desfosforila al NFAT en sitios específicos. Esto permite que se exponga su señal de localización nuclear, permitiendo al NFAT translocarse al núcleo, en donde induce la expresión de genes de citocinas (incluyendo IL-2, la cual promueve la proliferación de las células T)[1], [16], [37].

Por otra parte, PKC, que requiere al diacilglicerol y el calcio intracelular (en las PKC clásicas) para ser activada, o sólo por diacilglicerol en las novel (como PKC θ en los linfocitos T), permite la activación de IKK (complejo cinasa de I κ B), la cual fosforila a la proteína inhibitoria κ (I κ B) y la marca para su degradación en el proteasoma, lo que permite que NF- κ B migre al núcleo y active la expresión de citocinas [38].

A la proteína acopladora LAT, se le une otro adaptador conocido como Grb-2, el cual proporciona un lugar de acoplamiento para los intercambiadores de nucleótidos (GEF) de proteínas G pequeñas de la familia Ras (para la activación de la vía de Erk) y Rho (para las vías de JUNK y p38). Vav y SOS se encuentran entre los activadores de GTPasas pequeñas más conocidos, asociados a proteínas adaptadoras en el señalosoma temprano, que activan las GTPasas Ras y Rho, respectivamente [1], [21].

El factor intercambiador de nucleótidos (GTP/GDP) de Ras, denominado SOS, cataliza el intercambio de nucleótidos (Ras-GDP por Ras-GTP). Una vez activado Ras, promueve la señalización de la cascada de cinasas llamadas MAP (de las siglas en inglés mitogen-activated protein kinase, MAPK); esta cascada de señalización activa la cinasa ERK. Una vez que Erk es activada, se transloca al núcleo y fosforila al factor de transcripción Elk, el cual promueve la transcripción de c-Fos, un componente de AP-1 [1], [16].

Junto con la activación de Ras, mediada por el reclutamiento de Grb-2 y SOS, los adaptadores fosforilados reclutan y activan una proteína de intercambio de GTP/GDP llamada Vav, que actúa sobre otra proteína ligada al nucleótido de guanina llamada Rac. El Rac-GTP que se genera, inicia una cascada paralela de las MAPK que activa a una cinasa, JNK, que fosforila la porción amino-terminal de c-Jun, el segundo componente del factor de transcripción AP-1, lo que permite su translocación al núcleo y unión a c-Fos [16],[21]. Las actividades de ERK y JNK son inhibidas por las fosfatasas, lo que favorece un mecanismo de retroalimentación negativa que inhibe la activación del linfocito T.

Factores transcripcionales que regulan la expresión génica del linfocito T

NFAT

El factor nuclear de las células T (NFAT) es expresado en casi todo tipo celular que ha sido examinado, incluyendo otras células del sistema inmune y otras más no pertenecientes a este sistema. La familia de NFAT consta de cinco miembros: NFAT1 (también conocido como NFATp o NFATc2), NFAT2 (conocido como NFATc o NFATc1), NFAT3 (conocido como NFATc4), NFAT4 (conocido como NFATx o NFATc3) y NFAT5 [37]. Del NFAT1 al NFAT4 son regulados mediante calcio-calcineurina, el NFAT5 es regulado por señales de estrés osmótico. NFATc1 es un miembro importante ya que promueve la diferenciación de células efectoras Th2, por otro lado, NFATc2 y NFAT4 promueven la expresión de las citocinas de células Th1 y reprimen la expresión de los genes de las células Th2 [16], [37],[39].

NFAT es necesario para la expresión de genes que codifican IL-2, IL-4, TNF y otras citocinas. En el citoplasma de los linfocitos T en reposo, NFAT se encuentra fosforilado e inactivo. Cuando es desfosforilado por la calcineurina, en respuesta al incremento de Ca^{2+} debido a la activación del TCR, se transloca al núcleo, donde es transcripcionalmente activo [37]. En el núcleo, NFAT forma heterodímeros con el factor de transcripción AP-1 (Fos/Jun) para inducir la expresión de genes de citocinas. Posteriormente, la refosforilación en residuos como la serina 264 (Ser264) favorece su exportación del núcleo y limita su actividad transcripcional, funcionando como un

mecanismo de control sobre la activación y diferenciación funcional de las células T [40]. Sin embargo, en la ausencia de AP-1, NFAT impone un programa genético de anergia en los linfocitos. Este proceso puede ocurrir debido a una activación incompleta en la que ocurre solo el reconocimiento de la primera señal a través del TCR sin la activación de receptores coestimulatorios [1], [37]. Sin embargo, la interacción de NFAT con otros factores transcripcionales puede definir el estado de la célula, por ejemplo, la expresión de NFAT en conjunto con Foxp3 puede inhibir la expresión de genes de IL-2, IL-4 e IFN- γ . Mientras que la interacción con AP-1 favorece la producción de diversas citocinas [41].

NF- κ B

El factor nuclear κ B (NF- κ B) pertenece a una familia de factores de transcripción que juegan papeles importantes en la inflamación, inmunidad, proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Su activación inducible depende de la fosforilación y degradación del inhibidor de proteínas de NF- κ B (I κ B) por el proteasoma, el cual retiene dímeros inactivos de NF- κ B en el citosol de células no estimuladas [42], [43].

El NF- κ B forma parte de la familia Rel, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homodímeros o heterodímeros. Estas proteínas son: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB; de éstas sólo las tres últimas tienen el dominio transactivador, indispensable para reconocer el promotor de los genes diana [38]. La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional en los promotores de los genes diana. El heterodímero p50/p65 es el que responde rápidamente a la activación del linfocito y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína p65. Aunque los homodímeros p50 y p52 no poseen actividad transcripcional, pueden estimular la transcripción cuando se unen a la proteína nuclear parecida al inhibidor de κ B (BCL-3) [16], [43].

Las proteínas p50 y p52 se sintetizan como precursores p105 y p100, respectivamente, y son procesadas por el proteasoma, donde se remueve su extremo carboxilo-terminal (C-ter), dando lugar a las formas activas p50 y p52. La familia de NF- κ B tiene un rol intrínseco en las funciones efectoras de las células Th1, Th17 y Treg. Dos miembros, c-Rel y RelB, son requeridos para la producción de IFN- γ , lo cual dirige la diferenciación

de células Th1 [43], [44]. Además, c-Rel y p65 desempeñan un papel importante en la diferenciación de los fenotipos Th17 y Treg [45].

La activación de la vía de NF- κ B puede potenciarse mediante modificaciones postraduccionales de la subunidad p65, particularmente en la serina 529 (Ser529). Esta modificación favorece la actividad transcripcional de NF- κ B y promueve la expresión de genes relacionados con inflamación, supervivencia y activación celular [46]. La fosforilación en este residuo suele inducirse tras la estimulación del TCR o mediante activadores farmacológicos como PMA e ionomicina, contribuyendo a la producción de citocinas proinflamatorias y a la proliferación de los linfocitos T [43]. Además, otras fosforilaciones han sido muy estudiadas por su importancia biológica, por ejemplo, la Ser536 es utilizada como marcador de activación de NF- κ B. Esta modificación se induce rápidamente tras estimulación por TCR, TNF- α , LPS o PMA, y se asocia con mayor translocación nuclear y actividad transcripcional de p65. Debido a ello, suele emplearse como indicador de activación inflamatoria en linfocitos, monocitos y otras células inmunes [46], [47]. Por otro lado, la fosforilación en Ser276 es importante porque facilita la interacción de p65 con coactivadores transcripcionales como CBP/p300, lo que incrementa la acetilación de histonas y la apertura de la cromatina. Este evento favorece una expresión más eficiente de genes inflamatorios y de supervivencia celular [46], [48]. En contraste, algunas fosforilaciones pueden tener funciones regulatorias negativas. Por ejemplo, Ser468 se ha relacionado en ciertos contextos con la terminación de la respuesta inflamatoria y la degradación de p65, ayudando a evitar una activación excesiva de NF- κ B [49], [50].

AP-1

La proteína activadora 1 (AP-1) se ha encontrado en muchos tipos celulares. Se activa de forma específica en los linfocitos T mediante señales del TCR [4]. AP-1 se le llama a una familia de factores transcripcionales diméricos que se unen entre sí a través de una estructura compartida llamada cremallera de leucina. Esta cremallera de leucinas media la dimerización de los componentes de AP-1 [51].

La formación de AP-1 activa implica habitualmente la síntesis de proteínas Fos y la fosforilación de la proteína Jun preexistente [16]. AP-1 parece asociarse físicamente a otros factores de transcripción en el núcleo, por ejemplo, a los factores de respuesta a interferón (IRF), y forma dímeros con NFAT [37]. Cuando ocurre una coestimulación inadecuada o una expresión transitoria de AP-1, NFAT comienza un programa de regulación negativa que modifica la respuesta inmune. Sin la formación de dímeros con AP-1, NFAT induce factores de transcripción secundarios, incluyendo NR4A y TOX, los cuales imponen o mantienen un fenotipo exhausto [37]. Este fenotipo se caracteriza principalmente por una capacidad reducida de secretar citocinas y una alta expresión de receptores inhibitorios (PD-1, CTLA-4, TIM3) [51], [52], [53].

La fosforilación de c-Jun en la serina 63 (Ser63) constituye un evento clave en la activación del factor transcripcional AP-1, principalmente a través de la vía de JNK [54]. Esta modificación incrementa la actividad transcripcional de c-Jun y promueve la expresión de genes asociados con proliferación, producción de citocinas y diferenciación efectora de los linfocitos T. La fosforilación de Ser63 suele inducirse tras señales provenientes del TCR, estrés celular o estímulos inflamatorios, y su activación coordinada junto con NFAT y NF- κ B es fundamental para una respuesta efectiva de las células T [55].

Activación de NF- κ B y AP-1 por la vía del receptor tipo Toll.

La capacidad del sistema inmune del huésped para reconocer y responder a los componentes microbianos está, en gran parte, mediada por el sistema inmune innato [3]. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés, pattern recognition receptors) desempeñan un papel importante en la defensa inicial del huésped frente a patógenos invasores [9]. Estos receptores también se encuentran en la membrana celular de los linfocitos T y el reconocimiento de sus ligandos, que viajan en la linfa, puede proporcionar señales coestimuladoras a estas células [13], [32], [33], [34].

Los receptores tipo Toll (TLR, del inglés toll-like receptors) son una familia de PRRs conservada a lo largo de la evolución, debido a su capacidad de detectar una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés pathogen-

associated molecular patterns), como lípidos, proteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, etc [12]. Estos productos microbianos activan diversas vías de señalización intracelular que dictan la magnitud, tipo y duración de la respuesta inflamatoria del huésped [16].

Los TLR son glicoproteínas de membrana de tipo I compuestas por tres dominios principales: 1) una región hidrofóbica que contiene repeticiones ricas en leucina que se unen a patrones moleculares asociados o a ligandos endógenos, 2) una región transmembranal y 3) un dominio intracelular Toll/interleucina-1 (TIR) que inicia la señalización a través de proteínas adaptadoras como MyD88, Mal/TIRAP, TRAM y TRIF [10]. Hasta la fecha se han identificado 10 tipos de TLR en humanos, y cada TLR tiene un conjunto específico de ligandos que puede detectar [56],[1].

Los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la membrana plasmática, y los TLR 3, 7, 8 y 9 se expresan intracelularmente en el retículo endoplasmático y en las vesículas endocíticas (Fig. 3). Específicamente, el TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas, proteínas de choque térmico y HMGB1(proteína que da estructura al ADN); el TLR2 puede formar heterodímeros con el TLR1 o el TLR6 y reconoce peptidoglicanos, lipopéptidos y lipoproteínas. TLR3 reconoce RNA de doble cadena (dsRNA). El TLR7 y el TLR8 pueden reconocer ARN unicatenario. El TLR9 reconoce ADN rico en motivos CpG no metilados. Por otro lado, hasta el momento se desconoce el ligando del TLR10. El TLR5 reconoce la flagelina bacteriana y es importante su estudio en este proyecto [1], [16], [56].

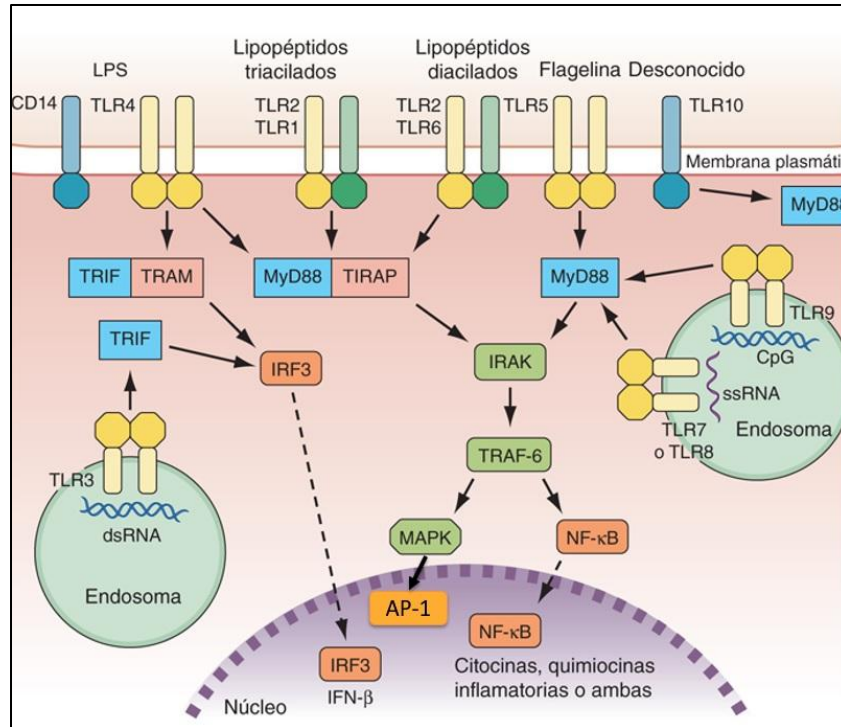


Figura 3. Vías de señalización de los receptores tipo Toll en mamíferos. Existe una gran variedad de receptores tipo Toll, endosómicos (TLR 3, 9 y 7 u 8) y de membrana (TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10). Los TLR 1, 2, 5 y 6 utilizan la proteína adaptadora MyD88 y activan los factores de transcripción NF-κB y AP-1. El TLR 3 usa la proteína adaptadora TRIF y activa los factores transcripcionales IRF3 e IRF7. El TLR4 puede activar las dos vías. Los TLR 7 y 9 del endosoma usan MyD88 y activan el NF-κB e IRF7. Tomada y modificada de [56].

La base fundamental de la señalización del TLR depende del reclutamiento y asociación de moléculas adaptadoras que se unen a la estructura conservada del receptor TIR. Se han descrito dos vías de señalización que permiten la activación del TLR: una dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la otra, independiente de este y dependiente de TRIF [56],[6].

La vía de señalización dependiente de MyD88 participa en casi todos los tipos de TLR y propicia la activación de los factores de transcripción NF-κB y AP-1. Solamente el TLR3 y el TLR4 comparten la vía de señalización que es independiente de MyD88 e induce la

expresión de los factores transcripcionales IRF-3 y posteriormente la producción de interferones α y β [16].

En la vía dependiente de MyD88 en mamíferos, la unión del ligando al TLR activa vías de señalización por el reclutamiento y la asociación de MyD88 a la membrana celular. Posteriormente, MyD88 recluta a la cinasa asociada a IL-1R (IRAK), la cual fosforila a TRAF (Factor de necrosis tumoral asociado al receptor) y después se une a este. Una vez activado TRAF, se activa un complejo que contiene una cinasa de TGF- β activada (TAK) y una proteína de unión a TAK1 (TAB) para fosforilar el complejo cinasa de I κ B (IKK). El complejo TAK1/TAB desencadena las vías de señalización de MAPK (produce Fos y Jun) y NF- κ B. Cuando IKK es activada, fosforila al inhibidor de NF- κ B (I κ B), y promueve su degradación en el proteasoma, permitiendo así la translocación nuclear de NF- κ B para activar la transcripción de citocinas inflamatorias [1], [16], [56].

Por otro lado, el principal resultado de la vía de señalización independiente de MyD88 es la producción de IFN tipo 1 y la activación de factores transcripcionales que se agrupan como elementos de respuesta a interferón (IRF). Los TLR4 y TLR3 requieren de TRAM para la activación de TRIF que se asocia con TRAF3 y TRAF6. La activación de TRAF6 y RIP1 a través de TRIF permite la activación de NF- κ B. TRAF3 media la activación de IRF3 por la activación de TBK1 e IKKi. La fosforilación de IRF3 por TBK1/IKKi permite la translocación nuclear de IRF3 y la inducción de IFN- β [56].

La flagelina, que es el ligando del TLR5, ha sido estudiada por nosotros y otros investigadores como un adyuvante en las formulaciones de las vacunas contra infecciones, particularmente por patógenos intracelulares. Se ha descrito como un potente activador de un amplio rango de tipos celulares involucrados en la inmunidad innata y adaptativa, y promueve la producción de citocinas [34], [57],[58],[33].

Proliferación de los linfocitos T frente al antígeno

Una de las primeras actividades que realizan los linfocitos después de ser activados es la producción de citocinas, que permiten la comunicación entre los diferentes tipos celulares. La IL-2 en combinación con factores de crecimiento, señales coestimuladoras y provenientes del TCR promueven la proliferación del linfocito T [59].

Las células que reconocen el antígeno producen IL-2 y también responden de manera preferente a ella debido a la expresión de la cadena α de su receptor (CD25), que les da mayor afinidad. Esto asegura que únicamente los linfocitos T específicos frente al antígeno sean los que proliferen. El resultado de esta proliferación es un aumento en el número de clones específicos frente al antígeno, en un proceso conocido como ampliación clonal. Este proceso genera un gran número de células que son requeridas para eliminar el antígeno a partir de una pequeña reserva de linfocitos vírgenes específicos [16], [59].

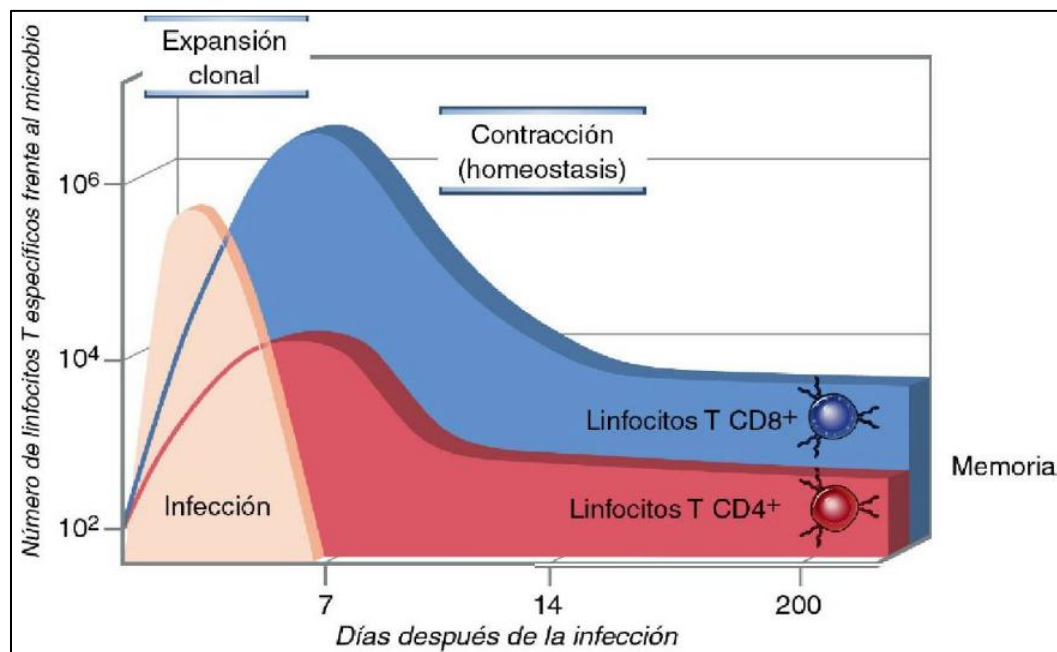


Figura 4. Ampliación clonal de linfocitos T. Se ilustra el número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos frente a antígenos microbianos, la ampliación y declinación de las células efectoras durante la respuesta inmunitaria. Los linfocitos que sobreviven a la contracción son aquellos que fungirán como linfocitos de memoria. Las cifras mostradas son aproximaciones basadas en estudios de modelos microbianos y otros antígenos en ratones endogámicos. Tomada de [16].

Antes de la exposición al antígeno, la presencia de los linfocitos T vírgenes específicos frente a cualquier antígeno es de 1 en 10^6 linfocitos. Después de la exposición al antígeno, la cifra de linfocitos T CD8⁺ específicos puede aumentar hasta 1 de cada 3 linfocitos T CD8⁺, lo que representa una ampliación >50.000 veces. Para los linfocitos T

CD4⁺ específicos, el número de células aumenta hasta 1 de cada 100 linfocitos T CD4⁺ (Fig. 4) [59], [60],[16].

Como se puede observar en la Fig. 4, después del aumento considerable del número de linfocitos T ante una situación de infección, se observa una reducción en el número de linfocitos efectores, la principal razón de que ocurra esto es debido a que a medida que se elimina el antígeno y la respuesta inmune desaparece, las señales que mantienen vivos y en proliferación a los linfocitos activos van disminuyendo y se aumenta la expresión de Fas y FasL, que llevan a la muerte celular programada inducida por activación [4].

Proliferación homeostática

En el organismo, la reserva de linfocitos vírgenes se mantiene en un nivel bastante constante debido al equilibrio entre la muerte celular programada de estas células y la generación de nuevas en los órganos linfáticos generadores. Cualquier pérdida de linfocitos lleva a una proliferación compensadora de los restantes y a una mayor producción en los órganos generadores [16], [61],[62].

Una demostración de la capacidad de la población de linfocitos de llenar el espacio disponible es un proceso llamado proliferación homeostática. Por ejemplo, si se transfieren células vírgenes a un anfitrión que tiene una deficiencia de linfocitos (linfopénico), los linfocitos transferidos empiezan a proliferar y a aumentar en número hasta que alcanzan aproximadamente las cifras normales de linfocitos [63].

La proliferación homeostática parece estar dirigida por las mismas señales, el reconocimiento débil de algunos antígenos propios y de citocinas, sobre todo de IL-7 e IL-15, las cuales son necesarias para el mantenimiento de los linfocitos vírgenes y de memoria [16], [61], [63].

Funciones efectoras de los linfocitos T

La sinapsis inmunológica tiene tres roles principales: identificar antígenos, estimular la respuesta inmune adaptativa y dirigir moléculas líticas o citocinas al área de contacto durante la fase efectora de los linfocitos.

En los seres humanos, la mayoría de los linfocitos T activados y de memoria expresan una molécula de superficie conocida como CD45RO, mientras que los vírgenes tienen la misma molécula, pero con un segmento codificado por un exón llamado A y, por lo tanto, se llama CD45RA. También se ha observado que estos linfocitos son distinguibles por la alta expresión de L-selectina (CD62L) y CCR7, un receptor de quimiocinas que es responsable de localizar a los linfocitos en la zona T de los nodos linfáticos. Otra molécula llamada CD69 aumenta drásticamente tras ser activados los linfocitos T, esta proteína se une al receptor para la esfingosina-1-fosfato llamado S1PR1 (S1PR1 promueve la salida de los linfocitos T de los ganglios linfáticos) y reduce su expresión en la superficie, por lo que los linfocitos son retenidos más tiempo en los ganglios linfáticos para recibir señales que promueven su diferenciación y proliferación [11], [21].

Las principales funciones de los linfocitos T CD4⁺ efectores se representan en la figura 5 y en la tabla 2. Estas células están encargadas de reclutar y activar a los fagocitos y otros leucocitos para que destruyan a los parásitos o microorganismos intra y extracelulares, además, ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos. Se han identificado seis principales subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ efectores que pueden distinguirse por las citocinas que producen y por los factores de transcripción que expresan: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, además de los linfocitos reguladores (Tregs) [1], [16], [21]

La diferenciación en el subgrupo Th1 está dirigida por las citocinas interleucina 12 (IL-12) y el interferón γ (IFN- γ), y al ser diferenciadas, secretan IFN- γ y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lo cual hace que estas sean capaces de coordinar respuestas inmunes mediadas por linfocitos T citotóxicos, macrófagos activados y linfocitos NK, promoviendo la protección contra infecciones intracelulares (bacterias y virus) [34].

La IL-4 estimula la diferenciación del subgrupo Th2 y este produce y secreta IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales regulan la producción de anticuerpos y tienen como principal blanco a los organismos parásitos como los helmintos. El fenotipo Th2 induce una inmunidad de tipo “barrera” a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes, la degranulación de células cebadas, proliferación y activación de eosinófilos, protección por aumento de la

producción de mucosa y la hipercontractibilidad del músculo del intestino para facilitar la expulsión de parásitos [21].

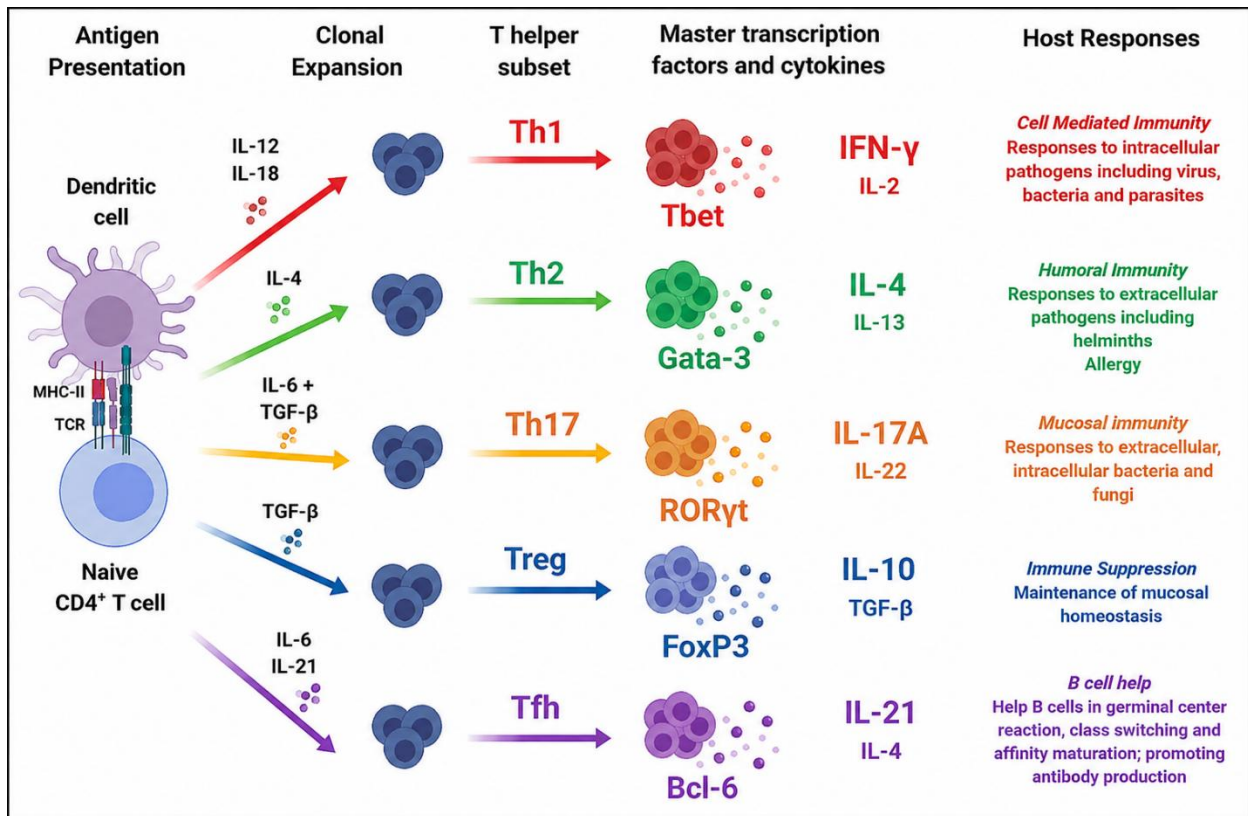


Figura 5. Funciones efectoras de linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T CD4⁺ diferenciados tienen diferentes capacidades efectoras según sea el antígeno al cual se estén enfrentando. Los fenotipos Th1, Th2, Th17, Tfh y Treg son los más estudiados. Tomado y modificado de [64].

Por otro lado, la diferenciación en el subgrupo Th17 es estimulada por la IL-6, la IL-1, la IL-23 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [4]. Estas células secretan citocinas como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22 y TNF- α , las cuales juegan un rol muy importante en procesos inflamatorios y la activación de neutrófilos para combatir bacterias extracelulares [16]. Otro fenotipo que se desarrolla en presencia de TGF- β e IL-4 es el Th9, que tiene la capacidad de regular las respuestas alérgicas y a helmintos. Sin embargo, también contribuye a la inflamación en enfermedades autoinmunes, asma, colitis e inflamación

de la piel. Otros genes asociados al fenotipo Th9, como IL-4RA, STAT6 e IL-33, también se encuentran asociados con la inflamación en enfermedades alérgicas humanas [65].

Las células Th22 constituyen una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ especializada en la producción de IL-22, cuya diferenciación es promovida principalmente por IL-6, TNF- α e IL-23 [66]. Aunque pueden compartir características con las respuestas Th17 y Th1, las células Th22 presentan un perfil funcional distintivo, caracterizado por la secreción de IL-22, IL-13, IL-26, TNF- α y, en determinados contextos, granzima B, sin producir cantidades significativas de IL-17A, IFN- γ o IL-4. Su diferenciación está regulada por el factor de transcripción AHR (aryl hydrocarbon receptor), considerado su regulador maestro [67]. Además, expresan los receptores de quimiocinas CCR4, CCR6 y CCR10, que favorecen su migración hacia la piel y otros tejidos de barrera. Las células Th22 participan en el mantenimiento de la integridad epitelial, la reparación tisular y la inducción de péptidos antimicrobianos, desempeñando funciones protectoras frente a bacterias, hongos y algunos virus. Su principal citocina efectora, IL-22, actúa predominantemente sobre células no hematopoyéticas, como las epiteliales de la piel y de las mucosas respiratorias e intestinales, promoviendo la regeneración tisular y el fortalecimiento de la función de barrera [68]. Sin embargo, una producción desregulada de células Th22 o de IL-22 se ha asociado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, alergias y diversos tipos de cáncer.[69].

Las células T cooperadoras foliculares (Tfh) constituyen una subpoblación especializada de linfocitos T CD4⁺ esencial para la respuesta inmune humoral. Se localizan principalmente en los folículos de los órganos linfoides secundarios y en los centros germinales de ganglios linfáticos, bazo y amígdalas, donde establecen un contacto estrecho con los linfocitos B [70]. Su función principal es promover la formación y el mantenimiento de los centros germinales, favoreciendo la proliferación de los linfocitos B, el cambio de isotipo (class switching), la hipermutación somática, la maduración de la afinidad y la diferenciación hacia células plasmáticas de larga vida y células B de memoria. Estos procesos dependen de la interacción CD40L-CD40 y de la secreción de citocinas, principalmente IL-21, considerada la citocina característica de las células Tfh, además de IL-4 en determinados contextos. Las células Tfh se caracterizan por la

expresión del factor de transcripción Bcl-6, regulador maestro de su diferenciación, así como por la elevada expresión de CXCR5, que dirige su migración hacia los folículos B, y de las moléculas coestimuladoras ICOS y PD-1, indispensables para su función y mantenimiento [71].

Los linfocitos T reguladores (Tregs) tienen como principal función el mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia antígenos propios y extraños. Después de haber ocurrido una respuesta inmune hacia los patógenos, las células Tregs regulan negativamente la respuesta inmune, de este modo, protegen contra inmunopatologías. La diferenciación en este subgrupo ocurre en respuesta al TGF- β y sus principales citocinas efectoras incluyen la IL-10, TGF- β e IL-35, las cuales tienen la capacidad de suprimir las respuestas proinflamatorias [1], [16], [72].

Tabla 2. Producción de citocinas y moléculas efectoras de fenotipos cooperadores (Th) y citotóxicos (CTL).				
Subpoblación	Factor de transcripción maestro	Citocinas y moléculas efectoras características	Células blanco	Función principal
Th1	T-bet (TBX21)	IFN- γ , IL-2, TNF- α	Macrófagos, células NK, linfocitos T CD8 ⁺	Promueve la inmunidad celular frente a microorganismos intracelulares, activa macrófagos y favorece la diferenciación de linfocitos T citotóxicos.
Th2	GATA-3	IL-4, IL-5, IL-13	Linfocitos B, eosinófilos, mastocitos	Favorece la respuesta frente a helmintos, el cambio de isotipo hacia IgE y las respuestas alérgicas.

Th17	ROR γ t (RORC)	IL-17A, IL-17F, IL-22	Células epiteliales, fibroblastos, neutrófilos	Participa en la defensa frente a bacterias extracelulares y hongos, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos y el mantenimiento de las barreras epiteliales.
Treg	FoxP3	IL-10, TGF- β , IL-35	Linfocitos T, células dendríticas, macrófagos	Mantiene la tolerancia inmunológica y limita respuestas inflamatorias excesivas.
CTL (CD8⁺)	Eomes, T-bet	IFN-γ, TNF-α, perforina, granzima B	Células infectadas por virus, células tumORAles y otras células que expresan antígenos en MHC-I	Elimina células infectadas o transformadas mediante la liberación de perforina y granzima B, que inducen apoptosis. La producción de IFN- γ y TNF- α potencia la respuesta antiviral y la activación de otras células inmunes.

Tabla 2. Principales subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se muestran los factores de transcripción maestros que regulan su diferenciación, las principales citocinas y moléculas efectoras que producen, sus células blanco y las funciones inmunológicas más representativas durante la respuesta inmune adaptativa. Citado de [4], [67], [70], [73].

Durante la fase efectora de la respuesta inmune, varias citocinas contribuyen a la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ y a mantener su forma efectora y de memoria

(Tabla 2). Por un lado, la citocina IL-12 activa promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ en CTL (linfocitos T citotóxicos). También se ha observado que la IL-12 y el interferón de tipo I estimulan la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes en CTL efectores, estas citocinas son producidas por distintos tipos de células dendríticas durante la respuesta inmune vírica o bacteriana. La IL-15 permite la supervivencia de los linfocitos T CD8⁺ de memoria. Sin embargo, la principal función efectora del linfocito T citotóxico es la eliminación de patógenos intracelulares mediante la muerte de las células infectadas. Esto lo logra a través de sus mecanismos citotóxicos y la producción y secreción de IFN- γ que ayudan a activar a los macrófagos [19], [59].

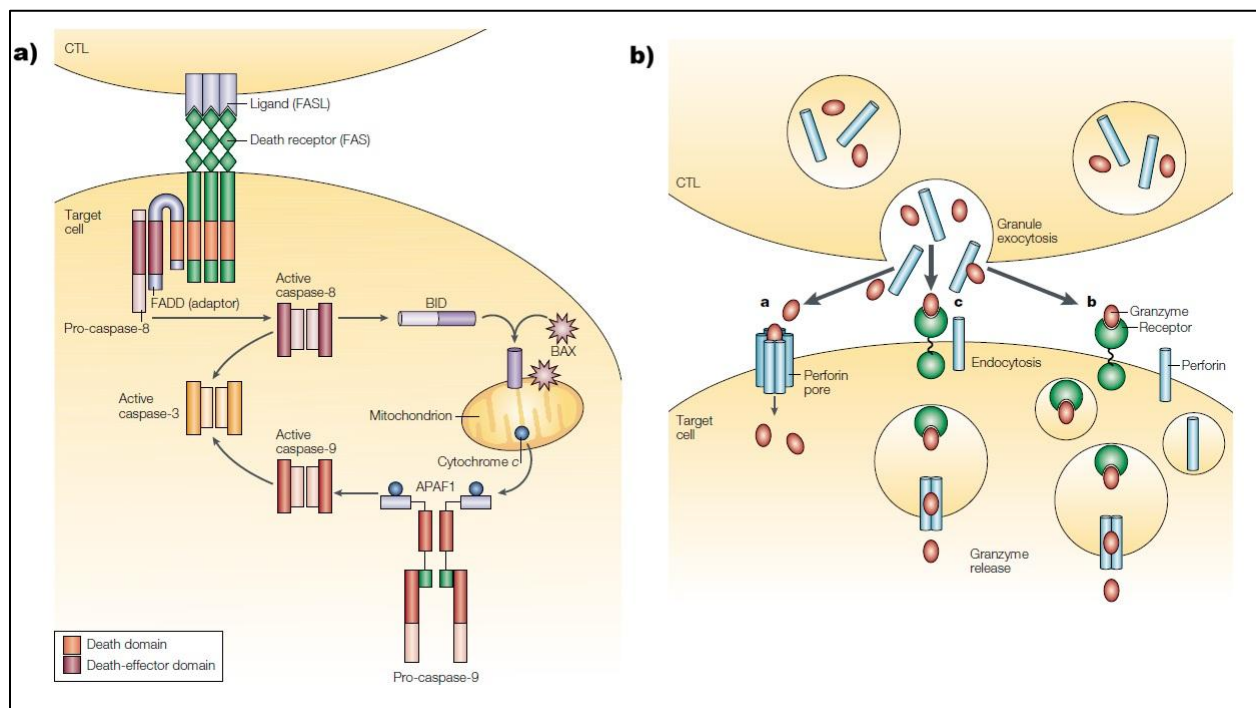


Figura 6. Funciones efectoras de linfocitos T citotóxicos (CTL). Una vez diferenciados, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos pueden matar células blanco a través de dos mecanismos: **a)** unión de FAS con su ligando, **b)** secreción de granzima y perforina. Tomado y modificado de [74].

Los linfocitos T citotóxicos eliminan las células infectadas mediante el contacto directo entre la CTL y la célula infectada que expresa el MHC clase I que tiene unida una pequeña fracción peptídica del antígeno. Los CTL usan un mecanismo de interacción ligando-receptor; este mecanismo está mediado por interacciones de moléculas de

membrana situadas en el CTL y en la célula infectada (Fig. 6a). Tras la activación, los CTL expresan una proteína de membrana llamada ligando de Fas (FasL) que se une al receptor Fas que se expresa en las células nucleadas. Esta interacción da lugar a la activación de las caspasas y a la apoptosis de las células que expresan Fas [59].

Por otra parte, los CTL también son capaces de inducir la muerte celular mediante la secreción de proteínas citotóxicas que se almacenan en gránulos en el citoplasma de los CTL (Fig. 6b). Las principales proteínas encontradas en dichos gránulos son: lisozima, perforina y granzima. Las granzimas son un grupo de serina proteasas que tienen un dominio His-Asp-Ser en sus dominios catalíticos; además, tienen la capacidad de activar caspasas ejecutoras que inducen la muerte celular [74]. La perforina es una molécula cuya función es perturbar la membrana celular. Mediante su polimerización, puede formar poros en la membrana; su función principal es facilitar la entrada de granzima al citosol de la célula infectada. Una vez dentro, escinde varios sustratos, como las caspasas, e inicia la muerte apoptótica de la célula. Por ejemplo, la granzima B activa la caspasa 3 y a Bid, un miembro de la familia Bcl-2 que desencadena la vía mitocondrial de la apoptosis [21], [59].

Papel de la respuesta inmune local materna en la inducción del parto

El proceso de nacimiento de un neonato comienza con la labor de parto materna. La decidua es el punto de contacto más estrecho entre la madre y el feto; en él existe un microambiente controlado capaz de mantener la tolerancia materno-fetal. Para que esto ocurra, existen diferentes mecanismos descritos por diversos autores intentando comprender el balance inmunológico entre la madre y el feto. Por ejemplo, la presencia de células con fenotipo agotado o senescentes en la interfaz materno-fetal es importante para mantener baja la respuesta inmune materna contra el neonato [75]. Por otro lado, las Tregs tienen un papel fundamental en mantener la homeostasis materno-fetal, estas células se encuentran enriquecidas desde el primer trimestre de embarazo y disminuyen a medida que se acerca el momento del parto.

La respuesta inmune local materna en los tejidos uterinos y en la interfaz materno-fetal funciona como una cascada inflamatoria fisiológica que transforma el útero de un estado

de reposo a un trabajo de parto activo. Esta inflamación, que se produce en ausencia de infección al término del embarazo, es necesaria para el inicio del trabajo de parto. Los tejidos reproductores y la interfaz materno-fetal reclutan activamente células inmunitarias activadas mediante la liberación de quimiocinas como CXCL10, CXCL8, CCL2 y CCL5, amplificando el microambiente proinflamatorio que conduce al parto [76]. Los leucocitos que se infiltran en estos sitios secretan metaloproteinasas de matriz que inducen directamente la ruptura de las membranas fetales y la maduración cervical, al tiempo que liberan mediadores del parto que promueven las contracciones del miometrio [77].

El trabajo de parto promueve la movilización tanto local como sistémica de monocitos, con proporciones de monocitos que aumentan drásticamente en la sangre periférica, la sangre intervellosa y la decidua de las mujeres en trabajo de parto. El espacio intervellosa de la placenta sirve como punto de conexión para la comunicación entre la placenta y la periferia, contribuyendo a la movilización de monocitos y a la generación de reacciones inflamatorias durante el parto espontáneo [78]. A pesar de la escalada proinflamatoria local, el espacio intervellosa durante el parto también muestra características inmunorreguladoras, incluyendo una mayor producción de IL-10 por las células T CD4⁺ y CD8⁺, un aumento de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺CD127^{low} y niveles más altos de PD-L1 y LIF [79]. A nivel sistémico, las respuestas inmunitarias periféricas proinflamatorias pueden atenuarse a medida que se acerca el parto, posiblemente para controlar los eventos inflamatorios locales iniciados al comienzo del parto [80].

Por otro lado, el feto despliega respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas durante el parto, contribuyendo con señales inflamatorias que promueven el alumbramiento junto con la activación inmunitaria materna [78]. Esta respuesta inflamatoria fetal puede ser desencadenada por la invasión microbiana, señales de peligro estériles o el reconocimiento alorreactivo de antígenos maternos, y opera como una cascada coordinada que finalmente estimula la contractilidad uterina. Las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α producidas por los tejidos intrauterinos en respuesta a productos microbianos estimulan la producción de prostaglandinas e inducen el parto, y los experimentos de eliminación génica muestran una reducción del parto prematuro cuando se interrumpen estas vías de señalización [81]. El inflamasoma NLRP3, tanto en

el compartimento fetal como en el materno, contribuye a la activación de la cascada del parto prematuro, que incluye la inflamación intraamniótica y decidual, la activación de las membranas fetales y la dilatación cervical. Los mediadores inflamatorios IL-6 e IL-8 aumentan en la sangre de la vena umbilical durante el trabajo de parto, reflejando la activación de una respuesta inflamatoria en la unidad materno-fetal. Este incremento puede deberse principalmente a la producción local por la placenta, las membranas fetales y los tejidos fetales, aunque la contribución de citocinas maternas no puede descartarse por completo [82].

Los fetos prematuros muestran maduración de las células dendríticas y activación de las células T contra antígenos maternos, produciendo una población de células Th1 de memoria central ausentes en los bebés a término. Estas células T fetales generan una respuesta proinflamatoria robusta específicamente a los antígenos maternos, mientras que no responden a antígenos de terceros, lo que indica una activación inmunitaria alorreactiva en lugar de generalizada [75], [78]. Las citocinas inflamatorias IFN- γ y TNF- α producidas por estas células T fetales causan directamente la contractilidad de las células del miometrio humano, lo que proporciona un vínculo mecanicista entre la inmunidad adaptativa fetal y las contracciones uterinas. La transferencia adoptiva de células T activadas a fetos de ratón resultó en la pérdida del embarazo, lo que confirma in vivo que la activación de las células T fetales puede provocar resultados adversos en el embarazo [83].

Inmunidad neonatal

Las enfermedades infecciosas son una causa importante de muerte infantil. La infección neonatal sigue siendo una tragedia común, con cerca de 7 millones de casos y 700,000 muertes por año en todo el mundo, y actualmente las muertes neonatales representan el 40% de la mortalidad en los menores de 5 años [84].

Ante los desafíos al sistema inmune, la respuesta neonatal a menudo es tolerante, sesgada o particular. Esto conlleva una respuesta reducida a las infecciones y baja memoria inmune en respuesta a las vacunas [85], [86]. Aunque actualmente se considera que su respuesta es diferente, adaptada a la transición del nacimiento, con

características únicas que los dejan vulnerables a infecciones [87]. Dada la falta de memoria inmunológica, los neonatos han desarrollado la capacidad de protegerse ante cualquier reto mediante la activación del sistema inmune innato. Sin embargo, muchas de las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺ neonatales son parecidas a una respuesta de tipo innato: alta producción de defensinas y catepsinas, alta proliferación celular y un elevado metabolismo glucolítico [88], [89].

A nivel del sistema inmune innato, los neonatos presentan diferencias en comparación con los adultos. La respuesta inmune innata neonatal prioriza la tolerancia y la protección del tejido antes de las funciones efectoras clásicas que presentan los adultos [86], [90]. Tras una estimulación del TLR, los monocitos, las células dendríticas convencionales y plasmacitoides producen cantidades menores de IL-12p70, IFN- α e IFN- γ que las células adultas, alterando directamente la respuesta adaptativa Th1 [90], [91]. Por el contrario, se ha observado que las células neonatales son capaces de producir la misma cantidad o más de IL-6, IL-23 e IL-10 tras la activación de PRRs, lo que puede desviar la respuesta adaptativa hacia los fenotipos Th17 y Th2. Estudios de single-cell identificaron que los monocitos neonatales y las células dendríticas son menos polifuncionales, lo que significa que son menos capaces de producir múltiples citocinas simultáneamente tras la estimulación en comparación con las células adultas [92]. Los neutrófilos neonatales presentan funciones microbicidas deterioradas, concentraciones reducidas de proteínas antimicrobianas y variaciones en los receptores de la superficie celular en comparación con los neutrófilos adultos, encontrándose las células menos funcionales en los neonatos prematuros extremos [93]. Los macrófagos de neonatos humanos muestran una mayor vacuolización citoplasmática, una expresión reducida de CD11b, CD14 y funciones de presentación de antígenos disminuidas, aunque su capacidad fagocítica basal es similar a la de los adultos [94]. Las células asesinas naturales (NK) neonatales muestran una mayor expresión del receptor inhibitorio CD94/NKG2A y una menor actividad citotóxica que las células NK adultas [95]. Las células presentadoras de antígeno neonatales expresan niveles más bajos de MHC de clase II, CD80 y CD86, lo que disminuye la capacidad de estimulación de las células T. Sin embargo, también se han encontrado poblaciones enriquecidas de ILC en neonatos; estas muestran mayor actividad y

frecuencia durante la infancia que en la edad adulta, lo que potencialmente compensa otros déficits celulares [96].

Además de las diferencias descritas en el sistema inmune innato de neonatos y adultos, uno de los factores clave frente a la sensibilidad de los recién nacidos a enfermedades infecciosas podría deberse, en parte, a la falta de memoria inmunológica preexistente. Asimismo, otro factor importante que podría contribuir es el reducido número de células presentes en los tejidos linfoides periféricos en la edad temprana [63]. Se ha evidenciado que subconjuntos de células están presentes en diferentes proporciones en neonatos y adultos humanos y, entre células del mismo subtipo, se han descrito diferencias fenotípicas. Además, algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han descrito diferencias o desviaciones inmunes entre células T y B y las APC en neonatos [86].

Los neonatos humanos presentan diferencias en la respuesta inmune de las células T CD4⁺, en particular, tienen una reducida respuesta inmune adaptativa mediada por las células Th1, un fenotipo crucial cuando los neonatos se enfrentan a infecciones por virus o bacterias [94]. Cabe destacar que las células neonatales tienen un perfil metabólico que parece favorecer el fenotipo Treg y el Th2, además de diferentes mecanismos epigenéticos que mantienen silenciada la expresión de genes del perfil Th1, como el *IFNG*. Asimismo, la falta de antígenos durante el tiempo de gestación contribuye a la vulnerabilidad de los neonatos e infantes a enfermedades bacterianas como la tuberculosis, un patógeno en el cual las células Th1 son esenciales [97],[34].

En comparaciones entre células sanguíneas del cordón umbilical (CB) y sangre adulta periférica (APB), las células neonatales muestran una expresión reducida de proteínas *in vitro*, en respuesta a la activación, incluyendo moléculas de superficie celular como CD69 y CD40L. También se encuentra disminuido el IFN- γ a nivel de proteína y de mensajero; citocina firma del subtipo celular Th1 [33], [57]. Varios estudios sugieren que los fenotipos Treg y Th2 son los más favorecidos al activarse las células mediante la estimulación por el TCR y CD28. En nuestro laboratorio se ha observado que tanto las células T CD4⁺ como las CD8⁺ neonatales tienen particularidades cuando se comparan con los adultos. Por ejemplo, las células T CD4⁺ muestran un perfil transcriptómico en donde la vía de la glucólisis se ve altamente favorecida y la cadena transportadora de

electrones se encuentra desacoplada. Además, se observa que estas células responden a la estimulación con CD3/CD28, con una alta proliferación celular y la producción de citocinas, especialmente IL-13, IL-6, IL-2 e IL-10; sin embargo, en promedio se mantiene una concentración menor en comparación con los adultos [98]. Por otro lado, los linfocitos T CD8⁺ neonatales tienen características efectoras distintas a las descritas en los adultos. Una de estas es la baja capacidad citotóxica y la expresión de genes de respuesta tipo innata [57]. En la tesis de maestría de la M. en C. Paulina López se observó que las células T CD8⁺ de neonatos prematuros presentan un perfil transcriptómico caracterizado por una mayor expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la proliferación. Este hallazgo sugiere que la prematurez, al interrumpir el desarrollo inmunológico fetal, favorece la adquisición de un estado funcional más reactivo. Como consecuencia, estas células podrían responder de manera más intensa ante estímulos inmunológicos, lo que contribuiría a explicar el perfil inflamatorio y la respuesta exacerbada descritos en neonatos prematuros.

Además de las características propias de las células neonatales, existen otros factores prenatales y postnatales que pueden llegar a impactar en el desarrollo del feto y, además, influir en la respuesta inmunológica. Dichos factores son el ambiente, la nutrición materna y neonatal, la vacunación y, recientemente, se ha descrito que la forma de nacimiento y la edad gestacional pueden llegar a impactar directamente en la función de las células del sistema inmunológico y predisponer a ciertas enfermedades [61], [99], [100], [101]. A continuación, se abordarán estos temas, los cuales serán centrales en el desarrollo de este proyecto.

Inmunidad de neonatos nacidos por cesárea

En México, de los partos de las madres de 15 a 49 años que ocurrieron en los últimos años, más del 50% fueron cesáreas, y de estas, el 50.7% se programaron. El número de nacimientos por cesárea ha ido en aumento en los últimos años. Se ha comprobado que el nacimiento por cesárea puede reducir efectivamente la morbilidad y mortalidad materna y perinatal, sin embargo, el abuso de esta práctica genera una recuperación más lenta de la madre y predispone al niño a diversas enfermedades, como alergias [102], [103], [104], [105], [106],[70].

El proceso de labor de parto conlleva muchas horas antes del nacimiento, y se caracteriza por la exposición del neonato a una serie de factores como: hormonas (cortisol, oxitocina, adrenalina, entre otras), fuerzas mecánicas, periodos de hipoxia transitoria y aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) [103]. Durante el parto por cesárea que ha sido programada no ocurre la labor de parto, por lo que el neonato no es sometido a este proceso de preparación para el nacimiento. La labor de parto es un proceso de preparación esencial que proporciona señales de desarrollo importantes y permisivas que son necesarias para desencadenar la maduración inmunológica y fisiológica del feto que se prepara para la vida postnatal [103], [104].

En un reciente estudio realizado por el Instituto Nacional de Salud Pública se demostró que desde el año 2010 cerca del 45% de los nacimientos fueron por cesárea, y para el 2024 aumentó al 55% de los nacimientos. Siendo que la OMS recomienda que esta práctica no exceda el 15%. Además, se advierte que el nacimiento por cesárea también puede estar ligado a la baja edad gestacional, es decir, que de practicarse de forma desmedida, puede contribuir al parto prematuro en las siguientes generaciones (figura 7) [107].

En los últimos años se ha encontrado evidencia de que el nacimiento por cesárea está asociado con efectos en la salud tanto a corto como a largo plazo [103]. A corto plazo, la madre necesita mayores cuidados tras la operación, lo cual condiciona su salida del nosocomio hasta por 3 días, además de la administración de antibióticos para evitar infecciones. A largo plazo, se ha descrito que las cesáreas afectan principalmente al sistema inmunológico y al metabolismo de los recién nacidos [108]. Los infantes nacidos por cesárea son más propensos a desarrollar desórdenes respiratorios e inmunes como el asma, alergias, artritis juvenil, enfermedad de intestino inflamado, entre otras [104].

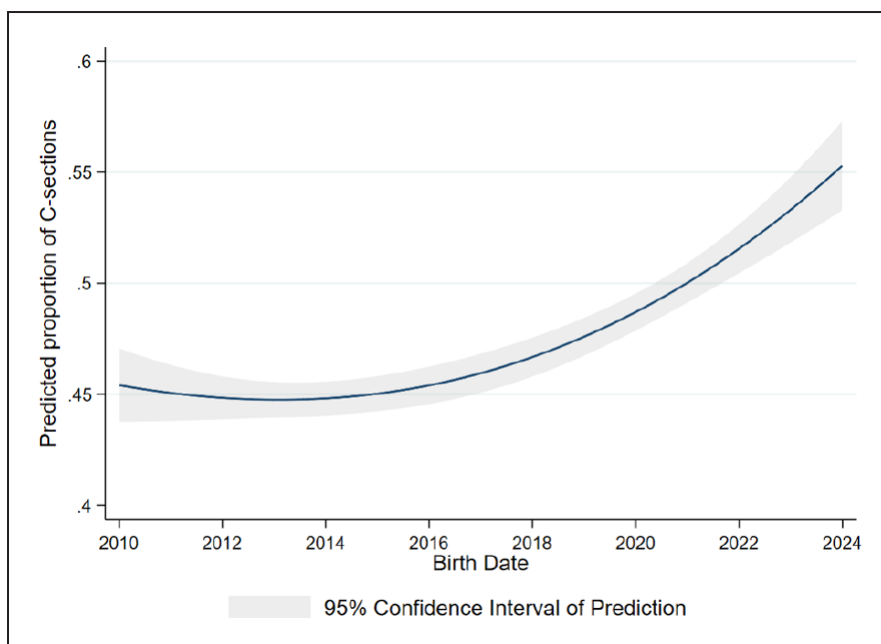


Figura 7. Tasa de cesáreas practicadas en México de 2010 a 2024. En la gráfica se muestra la proporción de cesáreas practicadas en México durante 2010 y 2024. Tomada de [107].

Los riesgos de desarrollar enfermedades inmunes relacionadas con el nacimiento por cesárea podrían ser debidos a la falta de factores de estrés asociados con el trabajo de parto y a la regulación inmunitaria causada por una programación inmunológica alterada de la microbiota intestinal al nacer [104]. El canal vaginal, que permite la salida del recién nacido, lo expone a un microbioma diferente de aquel encontrado durante un nacimiento por cesárea. [103].

La alta concentración de catecolaminas y cortisol, la contracción del útero y la hipoxia fetal durante el parto vaginal normalmente estimulan una respuesta significativa al estrés en el neonato. Por el contrario, los infantes que nacen por cesárea antes del inicio del trabajo de parto carecen de este aumento de hormonas del estrés [106]. Reportes mencionan que el aumento de cortisol en la circulación neonatal durante el nacimiento promueve la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, importante en la maduración y el desarrollo. El parto vaginal y sus efectos en el aumento de glucocorticoides han sido asociados con el incremento de la maduración de los órganos, incluyendo el intestino [104], [109].

Una de las diferencias más notorias al comparar el parto vaginal y el parto por cesárea es la microbiota intestinal. Durante el nacimiento por parto vaginal, el paso por el tracto vaginal tiene un papel importante, ya que este servirá como el molde de la microbiota intestinal del neonato [110]. Sin embargo, en el parto por cesárea no ocurre este intercambio bacteriano, condicionando al recién nacido a presentar una desregulación intestinal. Se ha descrito que la colonización bacteriana intestinal del neonato prepara al sistema inmunológico y cambia el equilibrio entre las células Th1 y Th2 [99]. La colonización intestinal modificada de los bebés nacidos por cesárea puede prolongar la inmadurez inmunológica postnatal, impedir la preparación inmunológica adecuada y, por lo tanto, aumentar el riesgo de enfermedades inmunes. Aquellos infantes nacidos por cesárea tienen un bajo número de bacterias en la microbiota intestinal y se mantiene perturbada hasta los 6 meses de edad, lo que indica su papel fundamental en el desarrollo del sistema inmune [103], [109].

A pesar de todo lo que se conoce acerca del sistema inmunológico de los neonatos nacidos por parto por cesárea, aún se desconoce el papel de las células del sistema inmune adaptativo y si estas podrían aportar al desarrollo de las enfermedades antes descritas. Durante el desarrollo de este proyecto se tomaron muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos a término por vía cesárea. En este punto, la colonización de la microbiota intestinal no tiene efecto en los resultados obtenidos, ya que la toma de muestra al momento del nacimiento se realiza a partir de la sangre de la vena del cordón, que proviene de la placenta, sin entrar en contacto con el canal de parto, por lo que este factor no influye en los experimentos realizados. Por lo tanto, los experimentos de proliferación celular, activación de factores transcripcionales y producción de citocinas son representativos del sistema inmunológico neonatal, al tiempo cero. En este aspecto, la forma de nacimiento, así como la labor de parto o su ausencia, y las condiciones de estimulación son las variables que se comparan con los neonatos nacidos a término por parto vaginal. Además, también se realizaron experimentos analizando la edad gestacional, en los que los neonatos nacidos prematuramente tuvieron un nacimiento por cesárea, por lo que estos fueron comparados con los nacidos a término por esta misma vía. A continuación, se describen las características del sistema inmunológico de los neonatos prematuros.

Inmunidad de neonatos de pretérmino

En los últimos años, se ha estimado que al menos uno de cada 10 recién nacidos nace antes de completar 36 semanas de gestación, a estos neonatos se les conoce como neonatos de pretérmino. El 35% de las muertes de recién nacidos están relacionadas con bebés prematuros debido a que presentan un sistema inmune inmaduro, con una inmunidad alterada [111]. Paradójicamente, los neonatos de pretérmino presentan un alto grado de inflamación pero al mismo tiempo una reducción considerable de la defensa y detección de patógenos [112].

Existen diversas causas que pueden llevar a un nacimiento prematuro, entre las que más destacan están: infección intrauterina, embarazo múltiple, insuficiencia cervical, desprendimiento prematuro de placenta, ruptura uterina, preeclampsia, entre otras [113]. Nosotros nos enfocaremos en estudiar a los neonatos de pretérmino sin procesos patológicos, es decir, que nacen prematuramente por embarazo múltiple, rompimiento de membranas o restricción del crecimiento por falta de espacio [114].

La respuesta inmune de neonatos está poco descrita, pero la evidencia indica que, ante un reto inmunológico, a menudo es tolerante, sesgada o limitada. Esto conlleva una respuesta pobre ante la infección y una baja memoria inmune en respuesta a las vacunas [57]. Sabemos que los neonatos prematuros tienen un sistema inmune comprometido e hiperinflamatorio [61]. Se han reportado alteraciones en las proporciones de distintas poblaciones de linfocitos, en particular linfocitos B [97]. También se ha reportado una alta susceptibilidad a desarrollar sepsis, tanto infecciosa como no infecciosa, e inflamaciones intestinales que pueden llevar a la necrosis de los intestinos y la muerte [97].

Otro factor importante que pudiera contribuir es el pequeño número de células que están presentes en los tejidos linfoides periféricos durante la edad temprana. Se ha encontrado que subconjuntos de células están presentes en diferentes proporciones en neonatos y adultos humanos y, entre células del mismo subtipo, se han descrito diferencias fenotípicas [63].

En los neonatos prematuros existe una producción limitada de factores solubles, como las inmunoglobulinas (Ig), por lo que deben depender del suministro materno. La IgG

específica del antígeno se transfiere a través de la placenta desde la circulación materna en grandes cantidades después de las 32 semanas de gestación, por lo que los neonatos que nacen antes de la semana 32 tienen comprometida la protección pasiva [112].

Dada la magnitud de este problema, incluso intervenciones modestamente efectivas salvarían millones de vidas. Mejorar ampliamente la protección contra infecciones y enfermedades a través de la modulación inmune ofrece un enfoque factible. Sin embargo, el diseño y la implementación de las intervenciones inmunomoduladoras requieren una comprensión más profunda de los cambios en el desarrollo que ocurren en el sistema inmune neonatal a nivel celular y molecular.

La caracterización de la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los neonatos de pretérmino permitirá aportar conocimiento para resolver la alta mortalidad de los neonatos de pretérmino.

ANTECEDENTES

Se ha observado que los linfocitos T de sangre de cordón umbilical de neonatos de término tienen una respuesta inmune diferente a los adultos. Esta respuesta inmune está centrada en una inmunidad de barrera, la cual se caracteriza por presentar una cantidad considerable de células Th2 y una población escasa de células Th1, la cual se ha abordado anteriormente [87], [115].

En estudios anteriores en nuestro laboratorio, en neonatos de término nacidos por parto vaginal, se encontró que las células T CD8⁺ de los neonatos están sesgadas a una respuesta tipo inflamación innata, con una baja respuesta citotóxica, una alta proliferación homeostática pero baja proliferación en respuesta al estímulo [57]. También se identificó que el receptor tipo Toll 5 (TLR5) está sobreexpresado en los linfocitos T CD8⁺ [33]. Demostramos que la activación de este TLR con la flagelina (ligando de TLR5) permitió la activación de moléculas de señalización y la producción de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ neonatales [34]. En otro trabajo del laboratorio se observó que la flagelina promueve la activación de los factores transcripcionales NF- κ B y AP-1 y funciona como un receptor coestimulador [33].

Recientemente, en un análisis de RNA-seq de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre de cordón umbilical de neonatos prematuros y de término, nacidos por cesárea o parto vaginal, realizado por la Dra. Linda Kempis, se observó que las muestras de linfocitos T CD4⁺ se agrupan según el tipo de nacimiento y no por la edad gestacional (Fig. 8A) [116]. En estos linfocitos se identificaron 600 genes diferencialmente expresados, de los cuales 198 son genes sobreexpresados en neonatos nacidos por cesárea y 402 en neonatos nacidos por parto vaginal (Fig. 8B). Asimismo, se identificaron vías importantes que son reguladas positivamente en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, en comparación con aquellos nacidos por cesárea. Estas vías incluyeron la regulación positiva de citocinas, metabolismo, función ribosomal y del factor transcripcional Tbet, importante para la diferenciación Th1 (Fig. 8C, D).

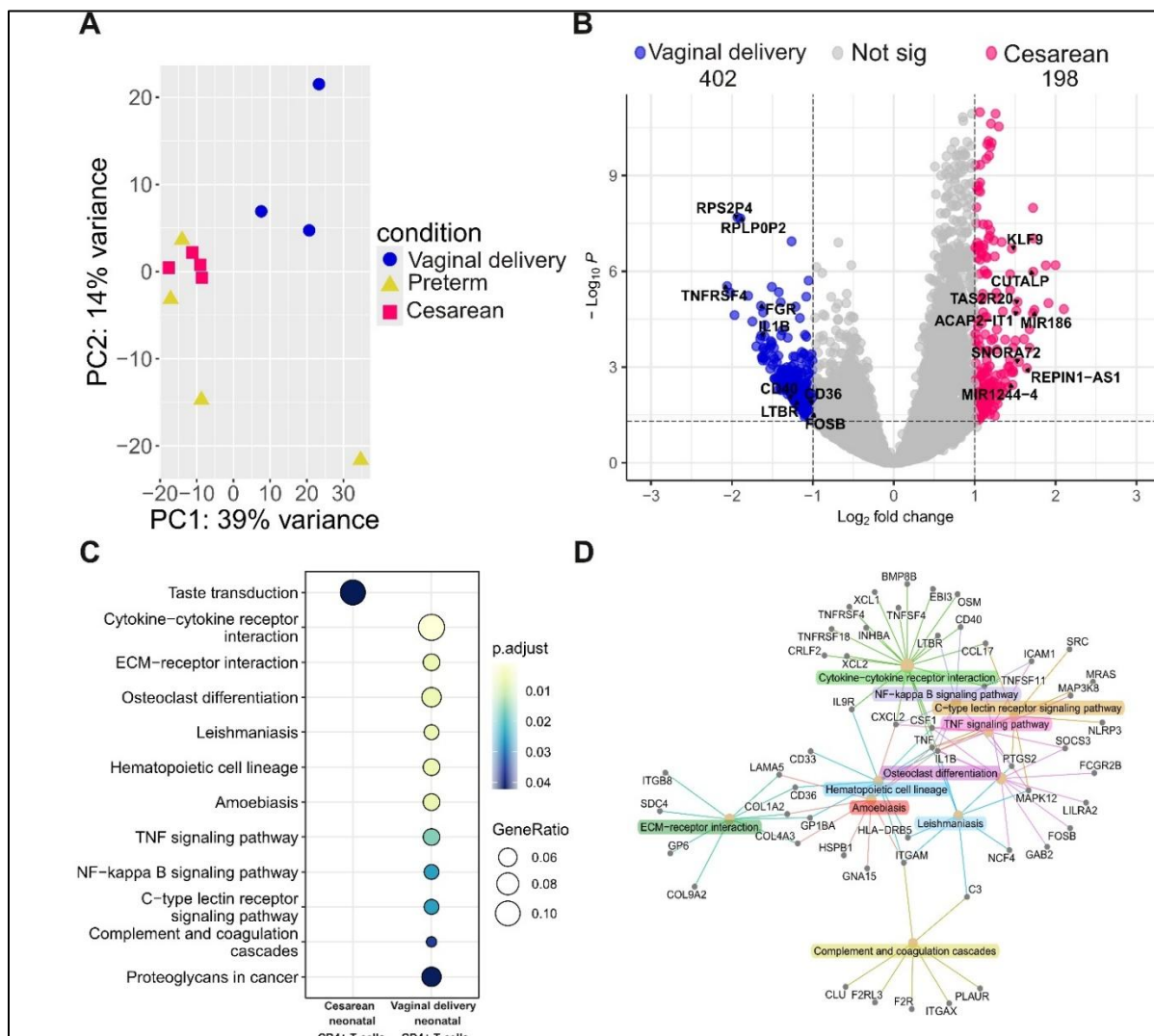


Figura 8. Análisis transcriptómico de células T CD4⁺ neonatales. **A)** Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de neonatos nacidos por parto vaginal, cesárea y prematuros. **B)** Gráfico de volcán de los genes diferencialmente expresados entre neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea. **C)** Análisis de enriquecimiento de vías KEGG de los genes diferencialmente expresados. **D)** Red de interacción entre los genes diferencialmente expresados y las principales vías biológicas enriquecidas.

Distintos estudios han identificado características de los neonatos nacidos por parto por cesárea en comparación con los nacidos por parto vaginal: diferentes niveles de estrés físico y hormonal, la colonización microbiana alterada del tracto intestinal y la modificación epigenética de la expresión génica. Por otro lado, se ha reportado que en los neonatos nacidos por parto vaginal, existe un incremento en el número de leucocitos en la sangre de cordón umbilical, alta expresión de los receptores de membrana CD16 y CD56, y un incremento de células T reguladoras. Las citocinas medidas en los partos vaginales muestran una elevada respuesta innata, con altos niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-8 y bajos niveles del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [99], [104]. Asimismo, en un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio se identificó que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal mantienen una alta proliferación en comparación con los adultos y un programa metabólico característico [98].

En cambio, el nacimiento por cesárea se asocia con un incremento de neutrófilos y monocitos, pero una disminución de linfocitos al nacer; los monocitos presentan una disminución en la expresión de TLR2 y TLR4 [108]. Además, se ha asociado con un incremento de IL-13 en respuesta a alérgenos, PHA y LPS, así como una disminución del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), de la respuesta proinflamatoria inducida por TLR (ej. IL-6 y TNF- α) y de la respuesta relacionada al perfil Th2 [103], [104].

La edad gestacional influye en el bajo número de linfocitos, los cuales se recuperan a lo largo del crecimiento del recién nacido [117]. Los neonatos prematuros presentan una marcada respuesta inmune sesgada al fenotipo Th2. La reducción en el número de linfocitos que presentan los neonatos prematuros, comparada con neonatos de término, refleja la inmadurez y la frágil compartimentalización, también podría deberse a una

producción subóptima de linfocitos T por parte del timo [61], [76], [118]. Asimismo, en un estudio reciente de transcriptoma de linfocitos T CD8⁺ realizado por la L. en C. Paulina López, se encontró que los linfocitos de neonatos prematuros expresan principalmente genes de ciclo celular en comparación con los neonatos de término nacidos por cesárea [119]. Además, también se encontró que los prematuros mantienen una alta expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos, así como de la glucólisis y el ciclo de Krebs. Estos resultados obtenidos por la L. en C. Paulina López nos sugieren que los linfocitos de neonatos prematuros tienen un perfil transcripcional con especial énfasis en la proliferación celular y un metabolismo asociado a una mayor capacidad proliferativa. En otro estudio se logró identificar que tanto el parto pretérmino como el trabajo de parto a término se caracterizan por una respuesta inflamatoria compleja que involucra componentes asociados con respuestas Th17 y Th2, evidenciada por el aumento de CXCL1 y CCL17, respectivamente. Asimismo, los prematuros de ruptura de membranas mostraron un perfil proinflamatorio relacionado con IL-6 y CXCL1, sugiriendo que la inflamación contribuye al deterioro de las membranas fetales. Además, concentraciones elevadas de CXCL8, GM-CSF e IL-6 se asociaron con mayor riesgo de parto pretérmino temprano o inminente, lo que sugiere que estos mediadores podrían funcionar como biomarcadores predictivos de parto pretérmino [120]. Asimismo, estudios de single cell RNA-seq han permitido conocer la dinámica del sistema inmune circulante en recién nacidos extremadamente prematuros durante los primeros dos meses de vida. Los autores observaron que estos neonatos presentan una activación inmunológica temprana caracterizada por expansión de células T en proliferación, incremento transitorio de Tregs y predominio de fenotipos T vírgenes. Además, identificaron una activación elevada de células NK y cambios dinámicos en monocitos y células dendríticas asociados con vías inflamatorias dependientes de STAT3 e IL-10. En las células T, se detectó un aumento en proteínas relacionadas con activación y señalización, como CD28, PRKCQ y fosforilación de proteínas asociadas al TCR, junto con una polarización progresiva de células CD4⁺ de memoria hacia un perfil Th1. En conjunto, el estudio demuestra que el sistema inmune de los neonatos extremadamente prematuros experimenta una rápida reorganización postnatal, marcada por activación inflamatoria y

trayectorias de maduración inmunológica distintas a las observadas en neonatos de término [121].

En mi tesis de maestría, observamos que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de término nacidos por cesárea respondieron más al estimularse por la vía del TCR/CD28, en comparación con los neonatos nacidos por parto vaginal. También observamos que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de parto vaginal y de cesárea aumentaron la activación de los factores transcripcionales NF-κB y AP-1, al estimular por la vía del TCR/TLR-5 comparado con el estímulo TCR/CD28. Además, observamos que al activar por la vía del TCR/CD28, NF-κB y AP-1 mantuvieron niveles similares al control sin estimular, mientras que NFAT se activó. Esto pudiera indicar que el mayor aumento en la activación de NFAT, en comparación con NF-κB, llevaría a los linfocitos T CD4⁺ a diferenciarse al fenotipo Th2.

Los datos proporcionados por la literatura acerca de los neonatos prematuros y los nacidos por cesárea nos dan pocas características acerca de la influencia de la edad gestacional y el tipo de nacimiento sobre la proliferación y activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Si bien es cierto que se ha reportado que existe una reducción en el número de linfocitos en los neonatos prematuros y los nacidos por cesárea en comparación con los nacidos de parto vaginal, no se han realizado estudios acerca de cómo responden estas células ante un estímulo. Principalmente, hablamos de tres de las actividades más importantes durante una respuesta inmune: la proliferación (expansión clonal y proliferación homeostática), la activación de factores transcripcionales que son responsables de la activación funcional de los linfocitos y la producción de citocinas que dirigen la comunicación de la respuesta inmune.

JUSTIFICACIÓN

La alta prevalencia de enfermedades alérgicas y diabetes en la edad adulta de las personas nacidas por cesárea y la respuesta inflamatoria de los neonatos de pretérmino son razones importantes para estudiar las respuestas celulares de los linfocitos T de estos neonatos. Los datos que se tienen en la literatura son limitados y el nacimiento por cesárea sigue aumentando a nivel mundial y aún más en México. El nacimiento

premature también representa un gran problema, puesto que estos neonatos tienen un alto nivel de mortalidad y morbilidad, y además pueden presentar estados hiperinflamatorios que los predisponen a morbilidades que dejan secuelas serias durante su desarrollo y etapa adulta. Adicionalmente, el incremento de enfermedades metabólicas como obesidad, hipertensión y diabetes, que son factores de riesgo para el parto prematuro, vuelve muy importantes los estudios referentes a este tema. Este estudio nos permitirá una comprensión más profunda de los cambios en la respuesta celular de neonatos prematuros y nacidos por cesárea en comparación con los neonatos de parto vaginal y adultos. Asimismo, es importante evaluar si el tratamiento con flagelina puede lograr la activación robusta de las células neonatales, lo que pudiera llevar a una activación más equilibrada del sistema inmune neonatal.

HIPÓTESIS

Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea, así como de neonatos pretérmino, presentan diferencias en la activación de los factores transcripcionales NFAT, NF-κB y AP-1, la producción de citocinas y la proliferación celular en respuesta a la estimulación a través de TCR/CD28 y TCR/TLR5 de acuerdo con el modo de nacimiento y la edad gestacional.

OBJETIVOS

General:

Realizar un estudio integrativo enfocado en la activación, proliferación y producción de citocinas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal, así como de neonatos prematuros.

Particulares:

1. Evaluar la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea, por parto vaginal y prematuros al estimular por la vía del TCR, CD28 y/o TLR5. Evaluaremos la activación de los factores transcripcionales NFAT, NF-κB y AP-1 y de marcadores de activación.

2. Analizar la proliferación homeostática y la proliferación en respuesta a la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos prematuros y compararlos con los nacidos por cesárea o parto vaginal.
3. Evaluar la producción de citocinas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea, por parto vaginal y prematuros al estimular por la vía del TCR, CD28 y/o TLR5.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestras de sangre de cordón umbilical: Las muestras de sangre se colectaron directamente del cordón umbilical, previo a la expulsión de la placenta y sin contacto con la sangre de la madre. Se contó con un convenio para su obtención con el Hospital General de Temixco y el Hospital General de Cuernavaca (muestras de neonatos de término) y con el Instituto Nacional de Perinatología para las muestras de bebés prematuros. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: madres con un cuadro clínico referente a alguna enfermedad infecciosa durante el embarazo, diabetes gestacional o expulsión ocasionada por algún accidente. Bebés que presentaron temperatura por arriba de los 37°C (fiebre o febrícula), APGAR menor a 8 o alteraciones en el desarrollo. A partir de estas muestras se purificaron células mononucleadas de cordón umbilical (CBMCs).

Muestras de sangre periférica: La sangre periférica se obtuvo a partir de paquetes de Buffy coat, de donde se purificaron las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) de adultos entre 18 y 30 años. Estas muestras provinieron de donadores clínicamente sanos que cumplieron los criterios de aceptación establecidos por el banco de sangre. Esto fue posible a través de los Servicios de Salud de Morelos, mediante el Centro de Transfusión Sanguínea del Estado de Morelos.

Purificación de células mononucleadas: Se purificaron células mononucleadas (CBMCs o PBMCs) a partir de sangre de cordón umbilical y sangre periférica de adulto, respectivamente. Se usó una solución de un polisacárido hidrofílico altamente ramificado (Ficoll Hypaque, Sigma-Aldrich) con la que se generó un gradiente de densidad que separó en distintas fases a los eritrocitos y granulocitos, dejando arriba del Ficoll una

capa blanca, la cual se recuperó (contiene las CBMC o PBMC). Estas se dejaron en adherencia a plástico por una noche para eliminar las células adherentes. Para las células de adultos, se les hizo depleción de células de memoria mediante el uso de perlas magnéticas que tuvieron acoplado el anticuerpo anti-CD45RO, una proteína que se encuentra en las células de memoria y células activadas.

Purificación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺: Los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ se separaron de todas las demás células mononucleadas mediante el uso del kit RosetteSep, por selección negativa. El RosetteSep es un cóctel de complejos de anticuerpos que reconocen a CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, TCR γ/δ conjugados por la región Fc a anticuerpos contra glicoforina A, una proteína de membrana de los eritrocitos. Mediante un segundo gradiente de densidad con el Ficoll se eliminaron las células que son reconocidas por estos complejos y se obtuvieron poblaciones de células T con más de 95 % de pureza.

Estimulación de células mononucleadas: La estimulación del TCR y el co-estimulador CD28 se realizó con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) y anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) y el entrecruzador goat anti-mouse IgG (1 $\mu\text{g/ml}$), de forma soluble. El TLR-5 fue estimulado con flagelina (250 ng/ml). El tiempo de estimulación dependió del factor transcripcional, NFAT: 15 min, cJun: 90 min, p65: 60 min. La proliferación celular y la producción de citocinas se explican en sus apartados respectivamente.

Tinción extracelular de marcadores de membrana: Posterior a la estimulación, se realizó la tinción de marcadores extracelulares para seleccionar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se colectaron las células y se les hizo un lavado con PBS 1X; se centrifugaron, se decantaron y se resuspendieron en seco. Se agregaron los anticuerpos acoplados a fluoróforo anti-CD4, anti-CD8 y el reactivo de viabilidad Live-Dead Near IR, se dejó incubando por 25 min en frío y oscuridad. Finalmente, se fijaron las células con paraformaldehído al 1.5%.

Tinción de proteínas intracelulares: Posterior a la tinción de marcadores de membrana, se les agregó a las células metanol absoluto frío, se agitó y se incubó en frío por 10 min, o toda la noche a -80°C. Se agregaron los anticuerpos acoplados a fluoróforo,

se consideraron anti-cJun y anti-fosfo cJun, anti-NFAT y anti-fosfo NFAT, anti-p65 y anti-fosfo p65. Finalmente, se fijaron las células con paraformaldehído 1.5%.

Proliferación celular: El ensayo de proliferación celular se realizó con el reactivo carboxifluoresceína (CFSE). Se hizo la tinción en una densidad celular de 1×10^7 células/ml. El CFSE se agregó a las células en suspensión con PBS 1X a una concentración final de 1 μ M, se incubará por 5 min a 37 °C en oscuridad y se detuvo el marcaje con 200 μ l de suero fetal bovino (SFB) concentrado. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se hizo un segundo lavado con SFB al 2%. Finalmente, se colocaron 2×10^6 células/ml en cada pozo y se estimularon en dos condiciones: anti-CD3 (1 μ g/ml) + anti-CD28 (1 μ g/ml) y anti-CD3 (1 μ g/ml) + flagelina (25 ng/ml), ambos estímulos en presencia de entrecruzador Goat anti-mouse IgG (1 μ g/ml).

Cuantificación de citocinas: Se cuantificaron las citocinas con el kit Legendplex (Cat: 741028), el cual tiene la capacidad de medir 12 citocinas de los fenotipos Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22 (IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17A, 17F, 22, IFN- γ y TNF- α). Para esto, se purificaron linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (ver protocolo) y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 (1 μ g/ml) + anti-CD28 (1 μ g/ml) y entrecruzador goat anti-mouse IgG (1 μ g/ml), por 72 h. También se realizó el estímulo con anti-CD3 (1 μ g/ml) + flagelina (25 ng/ml) y Goat anti-mouse IgG (1 μ g/ml). Este kit utiliza el principio básico de los inmunoensayos tipo sándwich, en donde un analito soluble se captura entre dos anticuerpos. Las poblaciones de perlas vienen en dos tamaños y diferentes niveles de fluorescencia de APC, lo que les permite distinguirse entre sí. Cada conjunto de perlas se conjuga con un anticuerpo específico en la superficie y sirve como perla de captura para ese analito en particular. Después del lavado, se agregaron anticuerpos de detección biotinilados y cada anticuerpo de detección se unió a su analito específico unido a las perlas de captura, formando así sándwiches de perlas de captura-analito-anticuerpo de detección. Posteriormente se añadió estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), que se unió a los anticuerpos de detección biotinilados, proporcionando una señal fluorescente con intensidades proporcionales a la cantidad de analito unido. Para cada población de perlas, la intensidad de fluorescencia de la señal de PE se cuantificó luego usando un citómetro de flujo.

Citometría de flujo: El análisis de las células teñidas y fijadas se realizó en un citómetro de flujo Attune de Thermo Fisher Scientific, que permitió utilizar cantidades bajas de células para un análisis eficiente. Los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo v10.0.7 y Microsoft Excel.

Análisis de actividad transcripcional: La actividad de los factores transcripcionales se infirió a partir de los resultados de expresión diferencial mediante el paquete decoupleR en R. Para ello, se utilizó la red CollecTRI (Recopilación de interacciones reguladoras transcripcionales), la cual integra interacciones validadas entre factores transcripcionales y sus genes diana. A partir de los valores de cambio de expresión génica ($\log_2FC$), se estimaron puntuaciones de actividad regulatoria utilizando el método Univariate Linear Model (ULM), implementado en decoupleR. Los factores transcripcionales con puntuaciones positivas se interpretaron como potencialmente activados, mientras que aquellos con puntuaciones negativas se consideraron reprimidos. Los resultados obtenidos permitieron identificar los principales reguladores transcripcionales asociados a las diferencias observadas entre las condiciones analizadas.

Cálculo de índice inmune: Se calculó el índice inmune integrando las concentraciones de todas las citocinas y moléculas efectoras cuantificadas. Para ello, los datos fueron normalizados mediante una transformación Z-score para cada analito. Posteriormente, los valores fueron desplazados a una escala positiva sumando el valor absoluto del Z-score mínimo correspondiente. Finalmente, el índice inmune de cada muestra se obtuvo calculando el promedio de los valores normalizados de todos los analitos, proporcionando una medida integrada de la respuesta inmunológica global.

RESULTADOS

1. Análisis de la actividad transcripcional de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de término y prematuros

Previamente, en el laboratorio se contaba con datos de secuenciación masiva de RNA (mRNA-seq) de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, que fueron analizados por otros colegas del laboratorio. A partir de estos datos, se hizo un análisis complementario para evaluar la

actividad de factores transcripcionales de las células T en estado basal. Para este análisis se tomaron en cuenta los datos obtenidos de la secuenciación de 4 neonatos prematuros de entre 28 y 33 SDG, 4 neonatos de término nacidos por parto por cesárea de entre 37 y 40 SDG y 3 muestras de neonatos de término nacidos por parto vaginal de entre 38 y 42 SDG. El control de calidad, el alineamiento y el análisis de expresión genética fueron realizados por la Dra. Linda Kempis-Calanis; posteriormente, a partir de las tablas de conteos y de genes diferencialmente expresados, se realizó el análisis de la actividad transcripcional. Este análisis fue realizado con la paquetería en R Decouple R y la base de datos CollecTRI, la cual contiene datos sobre qué genes son regulados por algún factor de transcripción (si son reprimidos o activados). Por un lado, Decouple R toma la lista de genes diferencialmente expresados e identifica qué factores de transcripción parecen estar activos o inactivos según el cambio de expresión de sus genes blancos, usando CollecTRI.

En la figura 9, se muestran los genes más activos o reprimidos bajo las condiciones estudiadas. Encerrados en cada una de las filas de las poblaciones neonatales estudiadas, se encuentran los factores transcripcionales inferidos. La función de cada uno de estos factores se encuentra en la tabla 3 en la sección de los anexos. Con estos resultados podemos proponer que las células T CD4⁺ de neonatos prematuros se encuentran en un estado de reprogramación epigenética en donde se activan factores transcripcionales que tienen un papel importante en cambiar el paisaje epigenético. Además, también es posible que las mitocondrias tengan un aumento en su actividad, lo cual se encuentra relacionado con la alta demanda energética requerida para apoyar la alta proliferación celular y producción de citocinas. La mayor parte de los factores transcripcionales inferidos en el mapa de calor que corresponden a células de neonatos nacidos por parto vaginal son importantes para ejercer una respuesta inmunológica robusta (STAT1, REL, RELA, JUN, NFKB1, IRF1), con un aumento en la proliferación celular y reprogramación metabólica (c-Myc) que promueve principalmente un estado glucolítico en la célula. Este paisaje transcripcional es compatible con una respuesta inmune que favorece la producción de moléculas y citocinas. Por otro lado, el perfil de activación de factores transcripcionales de neonatos nacidos por parto por cesárea está principalmente enfocado en activar genes de desarrollo celular y destino celular. Se

puede observar que las células de estos neonatos no activan factores transcripcionales que inicien una respuesta inmunológica robusta. Lo cual puede ser ocasionado por las diferencias que existen entre esta forma de nacimiento y el parto vaginal.

Posteriormente, con los mismos datos generados, se tomó el valor de Score y p-value para conocer los factores transcripcionales que se encuentran activos o reprimidos al comparar la forma de nacimiento o la edad gestacional. De este modo, fue posible conocer el perfil de factores transcripcionales que se encuentran activos en un grupo, pero reprimidos en el otro. Fue posible identificar que los neonatos nacidos por parto vaginal tienen un perfil transcripcional enfocado en la expresión de genes proinflamatorios (Fig. 9B), ciclo celular, supervivencia y cambios en el metabolismo que favorecen un estado activado en la célula. Por otro lado, enfocándonos en los resultados en donde el p-value fue menor a 0.05, los neonatos nacidos por parto por cesárea muestran un perfil enfocado en la inhibición de las vías de señalización de NF- κ B y AP-1 (mediante los factores NR3C1 e ING4). Además, se observa que hay activación de factores transcripcionales que regulan el destino celular y la diferenciación (ZIC1 y NR0B1), así como aquellos que inhiben la diferenciación al fenotipo Th1 y Th17 (FOXO3)

y también modulan la respuesta inflamatoria mediante interacción con NFAT (MEF2D)

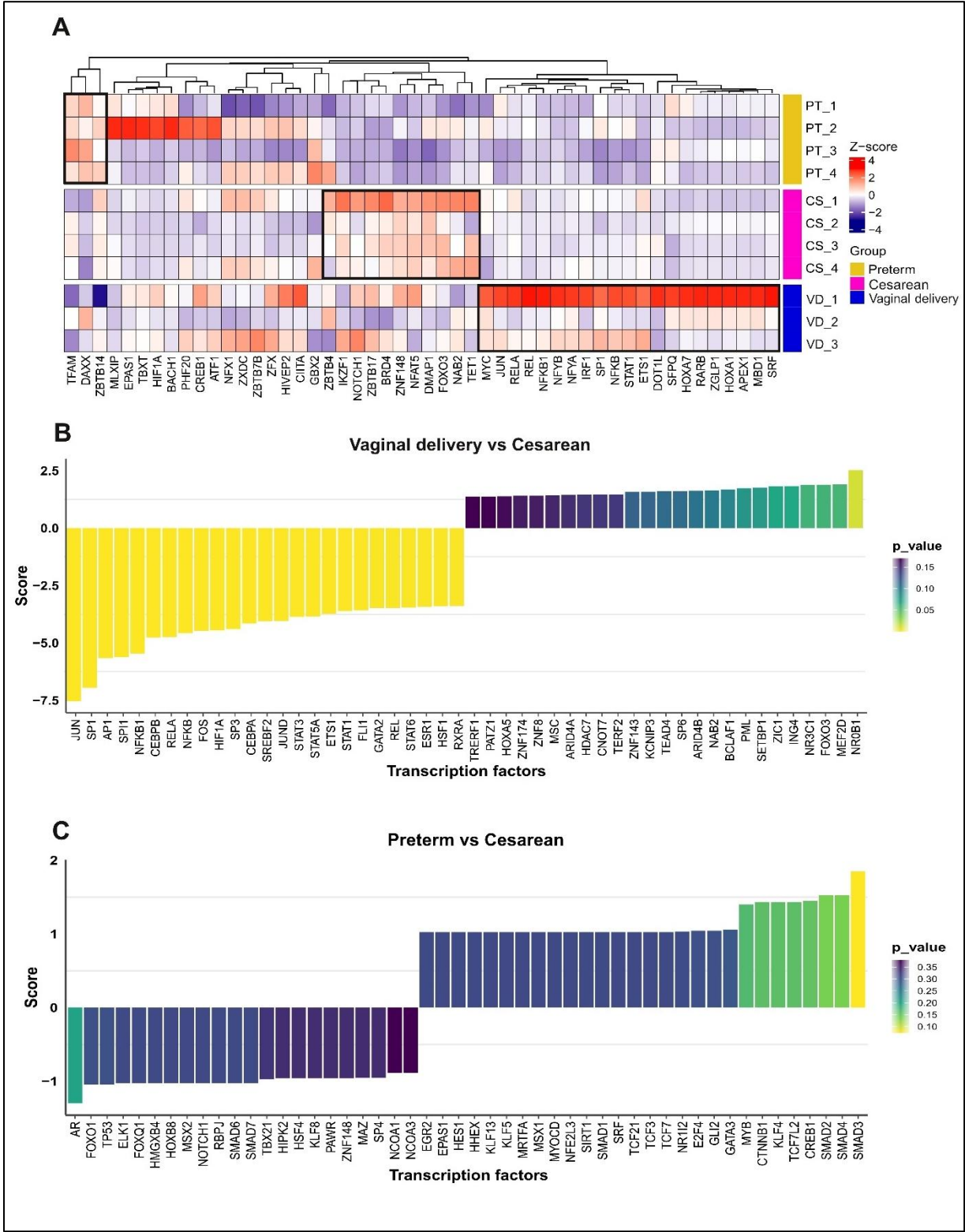


Figura 9. Actividad diferencial de factores de transcripción en linfocitos T CD4⁺ de neonatos según la vía de nacimiento y la edad gestacional. **A)** Mapa de calor que muestra la actividad inferida de los factores de transcripción en células T CD8⁺ purificadas de neonatos prematuros (PT), nacidos por cesárea (CS) y nacidos por parto vaginal (VD). Los valores fueron normalizados mediante Z-score, donde los tonos rojos indican mayor actividad relativa y los tonos azules menor actividad. El agrupamiento jerárquico se realizó con base en la similitud de los perfiles de actividad. **B)** Factores de transcripción diferencialmente activos entre neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea. Las barras representan el puntaje de actividad (score), donde los valores positivos indican mayor actividad en el grupo de cesárea y los valores negativos indican mayor actividad en el grupo de parto vaginal. **C)** Factores de transcripción diferencialmente activos entre neonatos prematuros y nacidos por cesárea. Los valores positivos indican mayor actividad en los neonatos de término nacidos por cesárea, mientras que los valores negativos corresponden a mayor actividad en los neonatos prematuros. El color de las barras representa el valor de *p* asociado a cada factor de transcripción.

Asimismo, se aplicó el mismo método comparativo para el caso de neonatos de término nacidos por cesárea vs neonatos prematuros nacidos por cesárea (Fig. 9C). Sin embargo, los datos obtenidos presentaron un valor *p* mayor a 0.05, por lo que solo se tomó en cuenta la comparación de parto vaginal vs cesárea, ambos de término.

Por otro lado, también se realizó este estudio con los datos de RNA-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos nacidos a término por parto vaginal o por cesárea y neonatos prematuros nacidos por cesárea. Para realizar este análisis, me apoyó el L. en C. Sebastián Mijares-Guevara. En el cual se usaron 3 muestras de neonatos nacidos por parto vaginal, 5 neonatos nacidos por parto por cesárea a término y 4 neonatos prematuros de entre 32 y 34.5 semanas de gestación. En la figura 10A se observa el mapa de calor de la actividad inferida de los factores de transcripción en células T CD8⁺ purificadas de neonatos prematuros, nacidos por cesárea a término y nacidos por parto vaginal a término. En la figura 10B se muestra la comparación entre los factores transcripcionales activos en neonatos de término nacidos por parto vaginal o cesárea, sin embargo, debido a su valor *p* mayor a 0.05, no se tomaron en cuenta. Finalmente, en

la figura 10C se muestran los factores transcripcionales activos en neonatos nacidos por parto por cesárea a término en comparación con prematuros. Las principales funciones de los factores transcripcionales inferidos en el mapa de calor (Fig. 10A), así como de aquellos con valor $p < 0.05$ de la comparación entre edad gestacional (Fig. 10C), se enlistan en la tabla 4 de la sección de los anexos. Los neonatos nacidos a término por parto vaginal presentaron factores de transcripción activos involucrados en la respuesta inmune, la regulación y remodelación de la cromatina, la proliferación celular y los cambios metabólicos. Por otro lado, los neonatos nacidos por cesárea a término tuvieron factores transcripcionales activos que regulan vías de reprogramación epigenética, control de la proliferación y del ciclo celular, así como la supervivencia. Finalmente, los neonatos prematuros mostraron una mayor actividad transcripcional de vías relacionadas con el establecimiento de un programa inflamatorio y con la regulación de la proliferación y la diferenciación.

Estos resultados sugieren que el nacimiento prematuro no solo modifica el estado funcional de las células T CD4⁺, sino que también afecta el programa transcripcional de las células T CD8⁺. La activación de factores transcripcionales relacionados con la respuesta inmune y el metabolismo podría reflejar un estado de preparación funcional que les permita a estas células responder de manera más eficiente a los estímulos de un ambiente inflamatorio. Al mismo tiempo, la presencia de reguladores negativos de la inflamación sugiere la existencia de mecanismos destinados a limitar una activación excesiva, favoreciendo el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Por otro lado, la escasa actividad transcripcional observada en los neonatos nacidos a término, representada únicamente por NFYC, indica que las células T CD8⁺ mantienen un estado más quiescente. En este perfil inmunológico predomina un equilibrio entre la capacidad de responder frente a patógenos y la necesidad de evitar respuestas inflamatorias exacerbadas durante la transición del ambiente intrauterino al extrauterino. En conjunto, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el parto prematuro se asocia con una reprogramación temprana del compartimento de células T, probablemente inducida por las señales inflamatorias que desencadenan el trabajo de parto. Esta activación transcripcional compartida entre las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ podría representar una adaptación inmunológica al entorno inflamatorio fetal, sin embargo, también podría

contribuir a las diferencias funcionales observadas en los neonatos prematuros durante las primeras etapas de la vida.

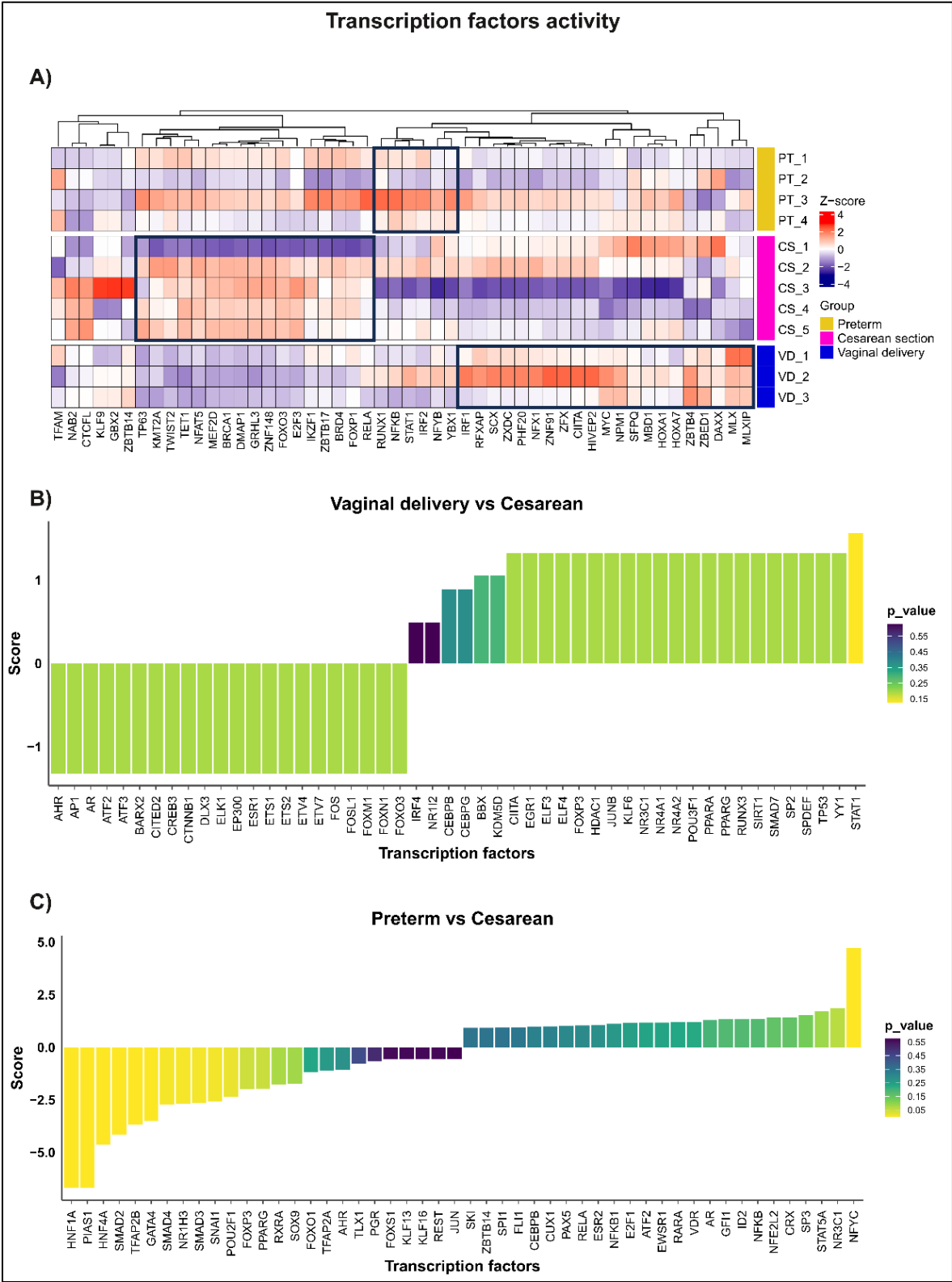


Figura 10. Actividad diferencial de factores de transcripción en linfocitos T CD8⁺ de neonatos según la vía de nacimiento y la edad gestacional. **A)** Mapa de calor que muestra la actividad inferida de los factores de transcripción en células T CD8⁺ purificadas de neonatos prematuros (PT), nacidos por cesárea (CS) y nacidos por parto vaginal (VD). Los valores fueron normalizados mediante Z-score, donde los tonos rojos indican mayor actividad relativa y los tonos azules menor actividad. El agrupamiento jerárquico se realizó con base en la similitud de los perfiles de actividad. **B)** Factores de transcripción diferencialmente activos entre neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea. Las barras representan el puntaje de actividad (score), donde los valores positivos indican mayor actividad en el grupo de parto vaginal y los valores negativos indican mayor actividad en el grupo de cesárea. **C)** Factores de transcripción diferencialmente activos entre neonatos prematuros y nacidos por cesárea. Los valores positivos indican mayor actividad en los neonatos prematuros, mientras que los valores negativos corresponden a mayor actividad en los neonatos nacidos por cesárea. El color de las barras representa el valor de *p* asociado a cada factor de transcripción.

2. Activación de factores transcripcionales en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de adultos, neonatos de término nacidos por parto vaginal o cesárea y neonatos prematuros nacidos por cesárea.

Con base en los hallazgos transcriptómicos, el siguiente paso consistió en determinar si las diferencias observadas en la expresión génica se reflejaban en la activación funcional de las vías de señalización intracelular en los linfocitos T. Para ello, se evaluó la activación de los factores transcripcionales NF- κ B, AP-1 y NFAT, que constituyen los principales reguladores de la respuesta temprana inducida por la activación del receptor de células T (TCR) y de los receptores coestimuladores, y controlan procesos esenciales como la activación, proliferación, diferenciación y producción de citocinas. Su análisis permitió establecer si las diferencias asociadas con la edad gestacional y la vía de nacimiento también se manifiestan a nivel de la activación de estos programas transcripcionales. Para evaluar el programa transcripcional que tienen los adultos y neonatos en función de las señales de TCR, CD28 o TLR-5, se midió la activación (fosfo p65 ser529, fosfo cJun ser63 y fosfo NFATc1 ser264) de los factores transcripcionales

p65 (NF- κ B) y cJun (AP-1) y NFATc1. Cabe destacar que para NFATc1, la desfosforilación es la que promueve su translocación al núcleo y activación de la transcripción, mientras que para NF- κ B y AP-1 es la fosforilación de sus dominios de transactivación la que promueve su actividad transcripcional. Se purificaron células mononucleares de adultos (PBMCs) o de neonatos (CBMCs) de término, nacidos por cesárea o parto vaginal, y de neonatos prematuros. El NFATc1 se evaluó 15 min después de la estimulación, p65 60 min después y cJun 90 min después. Estos tiempos fueron definidos gracias a una cinética de activación realizada por la Dra. Kempis-Calanis [122] y por mi (tesis de licenciatura [123]).

La selección de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ a partir de las CBMCs de neonatos de término, y prematuros, así como de PBMC CD45RO^{low} de adultos fue como se observa en la figura 11. En la figura 12A, se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de intensidad media de fluorescencia (MFI) y también se realizó la normalización de los datos respecto al control basal el cual representa de manera más gráfica los resultados (fig. 12B). Al analizar el MFI, se observa que existen diferencias entre los valores a nivel basal de los tres factores transcripcionales de células de neonatos que nacieron por cesárea comparadas con neonatos nacidos prematuramente. Se indujo la activación de p65 con ambos estímulos en todas las muestras evaluadas. Sin embargo, las células de adultos y las de neonatos, nacidos por cesárea, a término y prematuros, estimuladas con CD3+Flagelina mostraron un mayor incremento con respecto al estímulo CD3+CD28. A pesar de que el aumento de la activación de p65 en neonatos prematuros se mantuvo por debajo del de las células de neonatos nacidos a término, este aumento fue significativo. La activación de cJun parece ocurrir de manera peculiar; se observaron diferencias entre neonatos de cesárea nacidos a término y prematuros a nivel basal y estimulados con CD3+CD28.

Al igual que p65, cJun se activó en las tres poblaciones de neonatos estimulados con CD3+Flagelina y solo en adultos con el estímulo CD3+CD28. Sin embargo, en neonatos nacidos por cesárea a término y prematuros hubo un mayor incremento con el estímulo CD3+Flagelina con respecto al estímulo CD3+CD28.

Por otro lado, al analizar el NFATc1 observamos que no hubo diferencias significativas con respecto al control basal. Sin embargo, logramos identificar que, en promedio, las células de neonatos nacidos por cesárea a término mostraron un MFI más alto que las demás muestras. Por el contrario, las células de neonatos prematuros tuvieron el menor valor de MFI, a pesar de esto, las células de prematuros mostraron una mayor proliferación y producción de citocinas. Esto se abordará en el siguiente apartado.

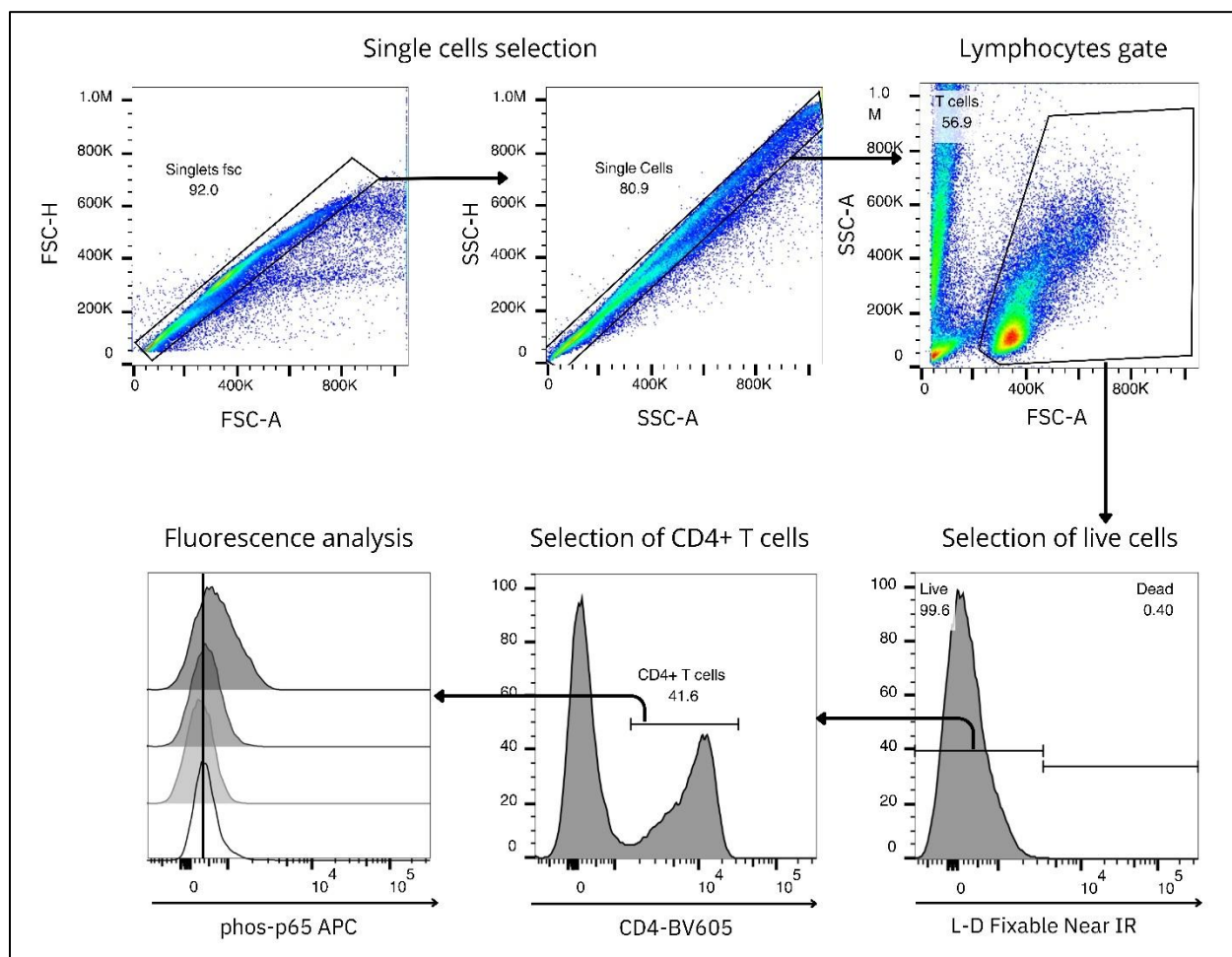


Figura 11. Estrategia de selección de poblaciones para análisis de factores transcripcionales. Se realizó la estrategia de gating que se muestra en la figura. Primero, se seleccionaron las células únicas (single cells) y después los linfocitos. Posteriormente, se seleccionaron las células vivas y, con ayuda de un anticuerpo anti-CD4 BV605 o anti-CD8 APC, se escogió la población de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, respectivamente.

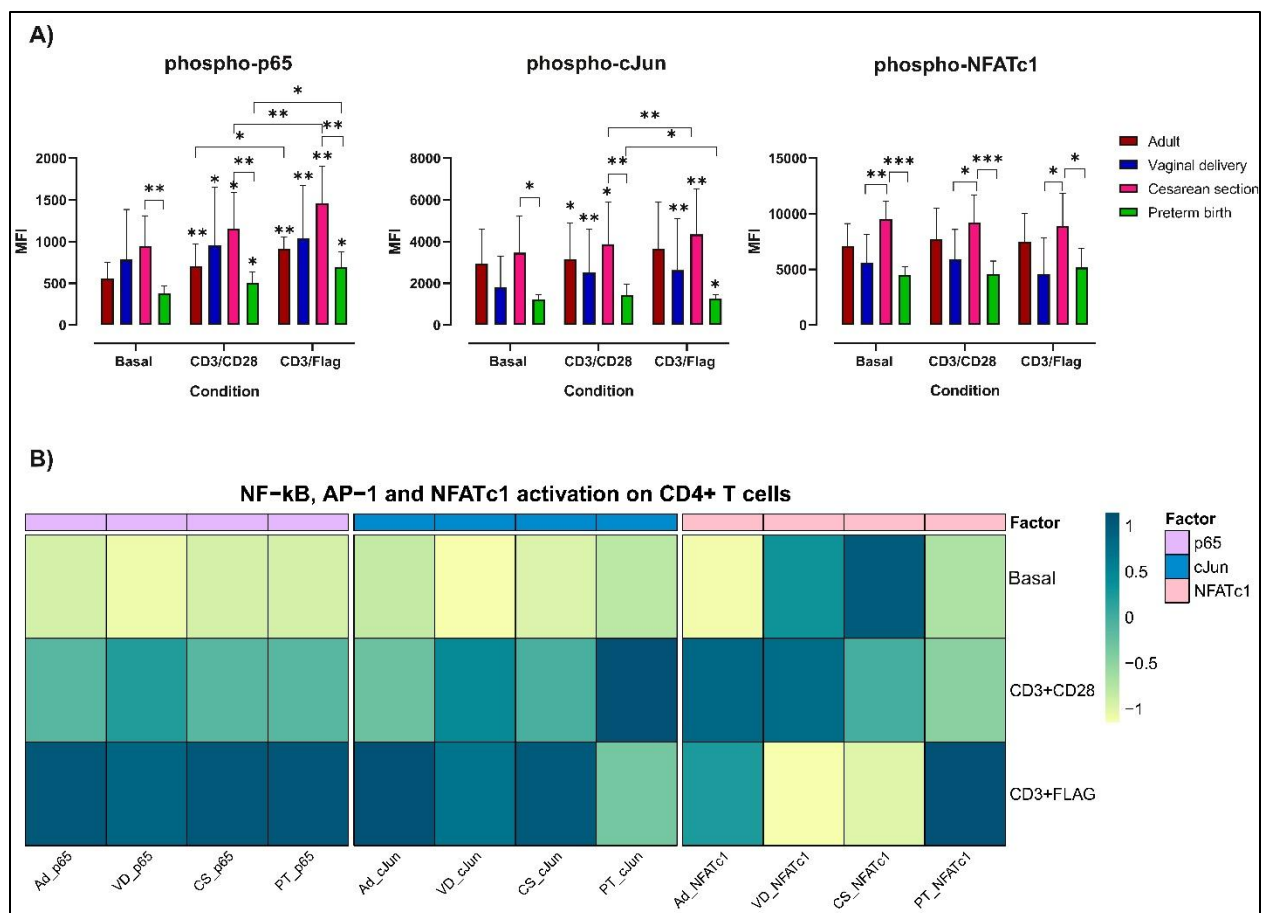


Figura 12. Activación de los factores transcripcionales phospho-p65, phospho-cJun y phospho-NFATc1 en linfocitos T CD4⁺ de adultos, de neonatos de término y de neonatos prematuros. Se evaluó la activación de los factores transcripcionales NF- κ B, AP-1 y NFATc1 mediante citometría de flujo en las condiciones basal, CD3+CD28 y CD3+Flagelina. **A)** Los datos corresponden a valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) de las proteínas evaluadas. **B)** Normalización de los datos con respecto a su control en estado basal. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y no pareados (Mann-Whitney). Adultos = 7, parto vaginal = 7, cesárea término = 8, prematuros = 5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Asimismo, se seleccionaron los linfocitos T CD8⁺ de CBMCs de neonatos o PBMCs CD45RO^{low} de adultos. En la figura 13A se muestran los valores de MFI de los factores transcripcionales que se midieron y también se realizó la normalización de los datos respecto al control basal el cual representa de manera más gráfica los resultados (fig. 13B). Logramos observar que los linfocitos de neonatos nacidos a término y adultos

muestran un aumento en la activación de p65 con ambos estímulos, mientras que las células de prematuros solo activaron p65 con el estímulo CD3+Flagelina. Nuevamente, las células de adultos y de neonatos nacidos por cesárea, a término o prematuros, presentaron un incremento en la activación de p65 con el estímulo CD3+Flagelina en comparación con el CD3+CD28. De igual forma, los neonatos prematuros tuvieron menor fosforilación de p65 a nivel basal en comparación con los neonatos de término nacidos por cesárea. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la activación de cJun en ninguna muestra al comparar el control en estado basal con los estímulos. Fue evidente que en estado basal hubo una mayor cantidad de cJun fosforilado en adultos y neonatos de cesárea al compararlos con los neonatos de parto vaginal. Al igual que cJun, NFATc1 no se activó con respecto al control basal, solamente se observaron diferencias entre las muestras estimuladas, siendo los neonatos de cesárea y adultos los que tuvieron mayores niveles de NFATc1 fosforilado (inactivo).

En general, la activación a través del TCR/CD28 nos permitió observar que esta vía favorece principalmente la activación de p65 y cJun en linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos nacidos a término. Este efecto se sigue observando cuando los linfocitos son estimulados con CD3+Flagelina, en donde los neonatos nacidos por cesárea a término y prematuros mostraron un mayor incremento en comparación con el estímulo CD3+CD28. Cuando nos enfocamos en la activación de p65, podemos ver que este factor transcripcional se encuentra más activado en neonatos nacidos por cesárea a término que en los prematuros. Esto puede ser de suma importancia, ya que NF- κ B está muy involucrado en la respuesta proinflamatoria y pudiera promover la activación en la célula y regular diversas funciones celulares como la supervivencia celular (expresión de Bcl-2 y Bcl-xL), la formación y estabilidad de la sinapsis inmunológica y la producción de IL-2. Asimismo, la activación de cJun es importante para promover la producción de IL-2 y la expresión de CD69, el cual tiene un papel importante en la retención de los linfocitos en los órganos linfoides para su activación. Por otro lado, durante el tiempo que se midieron estos factores transcripcionales no fue posible encontrar una mayor activación de NFATc1 (desfosforilación) con respecto al control basal. Sin embargo, sí fue posible ver que las células de neonatos nacidos a término por cesárea tienen una mayor cantidad de NFATc1 fosforilado que los nacidos por parto vaginal y los prematuros. Este tipo de

programa en el cual ocurre una activación de NF- κ B y AP-1 en ausencia de NFAT es típico de una respuesta tolerogénica o, en algunos casos, deficiente [37], [39], [124].

Por otra parte, en los linfocitos T CD8⁺, la activación a través de CD3+CD28 indujo un aumento de la activación de p65 en los linfocitos de neonatos nacidos a término y adultos, mientras que el estímulo CD3+Flagelina parece favorecer la activación de este factor en todas las muestras. Sin embargo, se observa que hay un incremento mayor en las células de adultos y neonatos nacidos por cesárea a término y prematuros. Al igual que en las células T CD4⁺, las células T CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea a término tuvieron una mayor activación de p65 que los neonatos prematuros. Por otro lado, no fue posible observar una activación de cJun con respecto al control basal, lo que sí observamos fue que los neonatos nacidos por cesárea y adultos presentaron los mayores valores de cJun fosforilado. Logramos observar cómo la actividad transcripcional es distinta entre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, es posible que las características intrínsecas sean principalmente las responsables. En estudios previos en nuestro laboratorio se observó que los linfocitos T CD8⁺ neonatales sobreexpresan el gen del TLR5 [57], lo cual concuerda con el resultado obtenido de p65. Para que ocurra una activación completa y eficiente del linfocito T, es necesario un equilibrio adecuado entre los tres principales factores transcripcionales. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que, en los linfocitos T CD8⁺, la estimulación a través de TCR y CD28 promovió principalmente un incremento en la actividad de p65. Este hallazgo podría reflejar un estado de activación incompleta, lo que podría traducirse en alteraciones en las funciones efectoras de los linfocitos T.

Los experimentos *in vitro* nos permitieron conocer el estado de la célula, sin embargo, es posible complementar la información con los datos obtenidos a partir del transcriptoma de linfocitos T CD4⁺ [98] y CD8⁺[57], [119], [125]. Ambas metodologías nos acercan a conocer el paisaje transcripcional de los linfocitos neonatales, por ejemplo, la expresión de los genes BCL11A, HOXA y CEBPA, que promueven la proliferación celular en linfocitos neonatales. Sin embargo, se discutirá más adelante en la sección de discusión de resultados.

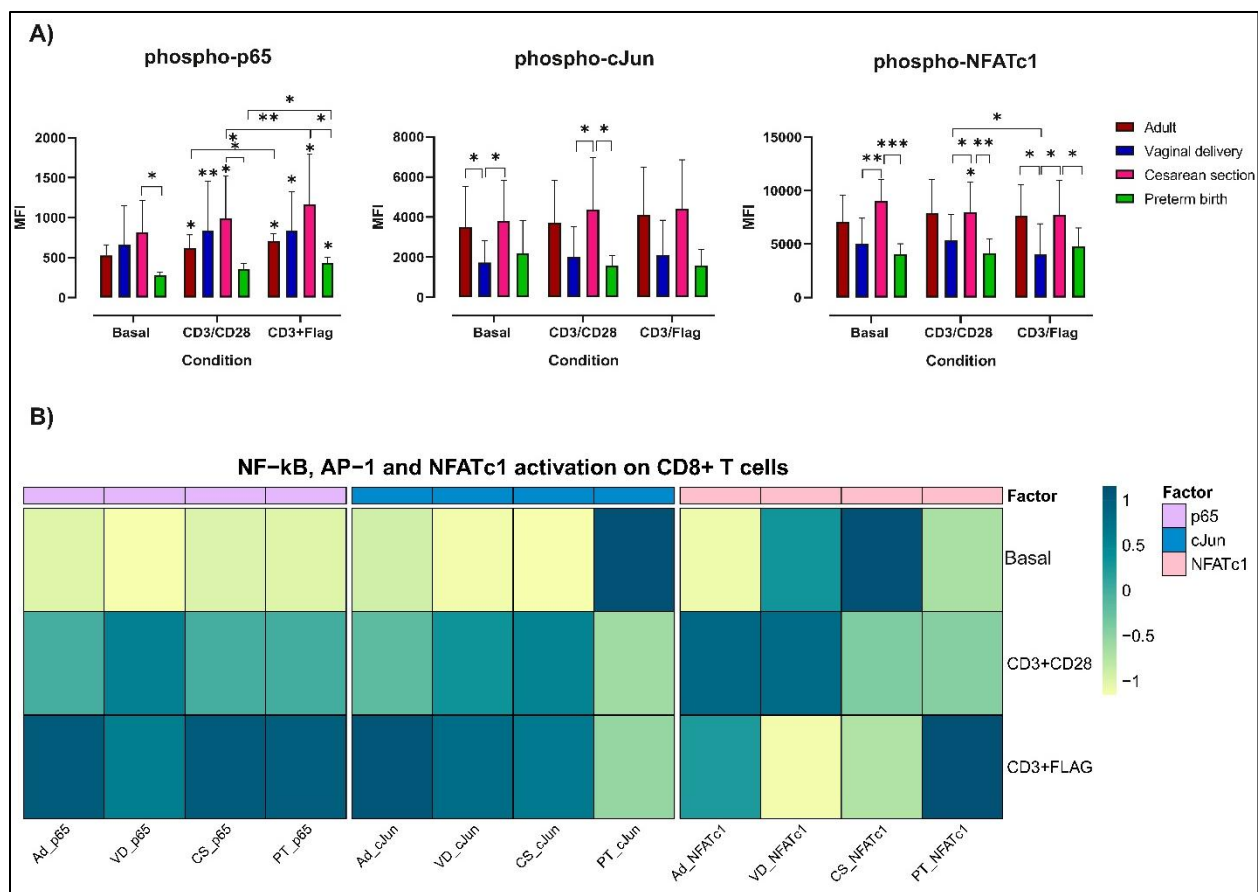


Figura 13. Activación de los factores transcripcionales phospho-NFATc1, phospho-p65 y phospho-cJun en linfocitos T CD8⁺ de adultos, de neonatos de término y de neonatos prematuros. Se evaluó la activación de los factores transcripcionales NF- κ B, AP-1 y NFATc1 mediante citometría de flujo en las condiciones basal, CD3+CD28 y CD3+Flagelina. **A)** Los datos corresponden a valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) de las proteínas evaluadas. **B)** Normalización de los datos con respecto a su control en estado basal. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y no pareados (Mann-Whitney). Adultos = 7, parto vaginal = 7, cesárea término = 8, prematuros = 5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Proliferación inducida por activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de adultos, neonatos de término nacidos por cesárea o parto vaginal y neonatos prematuros.

Una vez obtenidos los resultados de los factores transcripcionales y constatada su dinámica, que podía estar impactando en las fases de activación de los linfocitos T, se procedió a evaluar la proliferación de estas células. Para conocer la capacidad proliferativa que tienen los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos y adultos, se siguió el protocolo de tinción con el colorante CFSE, para analizar el porcentaje de división celular y el número de generaciones en CBMCs o PBMCs. Las condiciones de estimulación fueron las siguientes: basal, CD3+CD28 o CD3+Flagelina. El tiempo que duró la estimulación fue de 96 horas, al término del cual se procedió a realizar el protocolo de tinción de poblaciones celulares. En la figura 14, se muestra la selección de gates para el análisis de la proliferación celular mediante citometría de flujo.

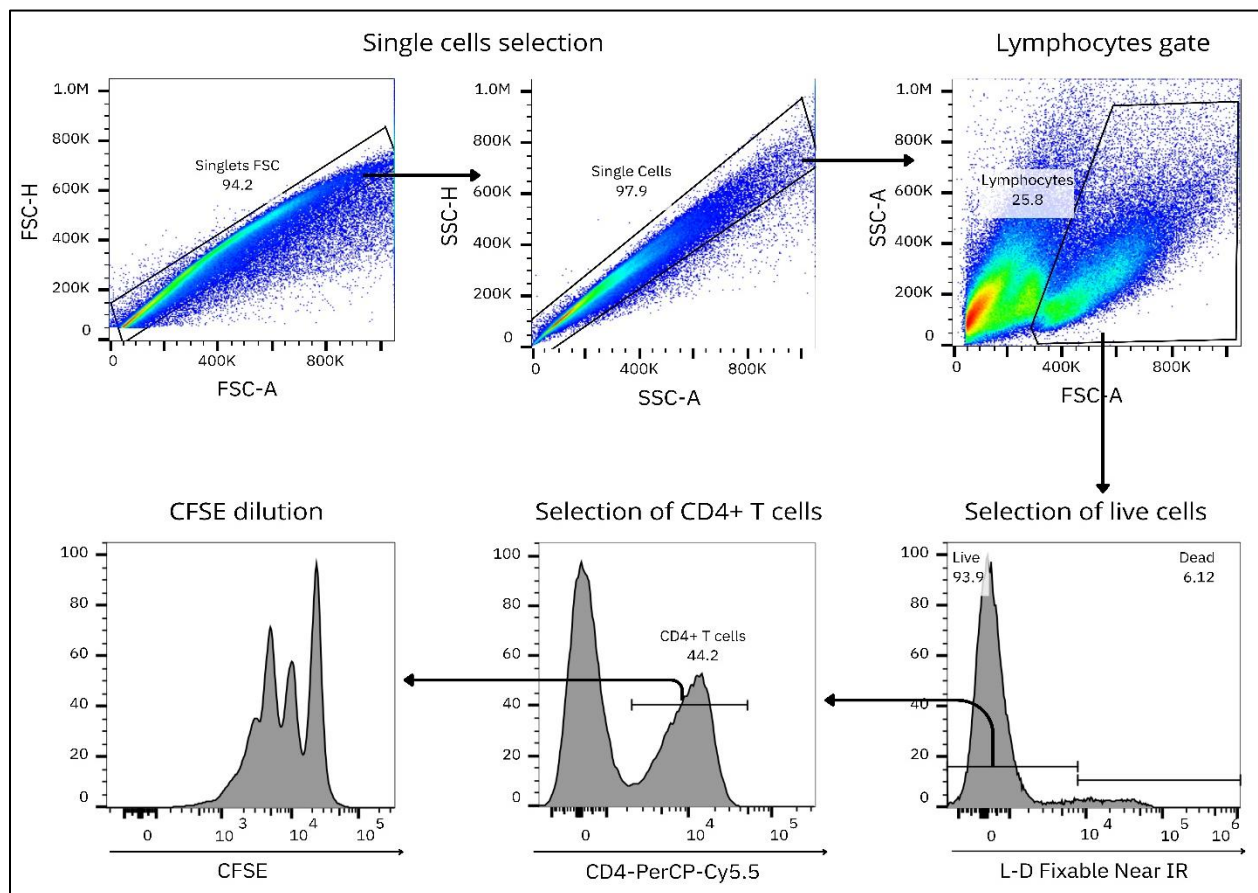


Figura 14. Estrategia de selección de poblaciones para análisis de proliferación celular. Se realizó la estrategia de gating que se muestra en la figura. Primero se seleccionaron las células únicas (single cells) y después los linfocitos. Posteriormente, se seleccionaron las células vivas y, con ayuda de un anticuerpo anti-CD4 PerCP-Cy5.5 o anti-CD8 APC, se escogió la población de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, respectivamente.

El análisis de la proliferación celular se realizó a partir de los picos formados por la dilución del reactivo CFSE que ocurre con cada división celular, como se muestra en las Figuras 15 y 17. Estas figuras, son imágenes representativas de cómo ocurrió esta dilución de CFSE en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente. Cada uno de los picos representa una división celular, siendo el pico sombreado de color gris la generación inicial y también aquella que, al terminar el tiempo, no se dividió.

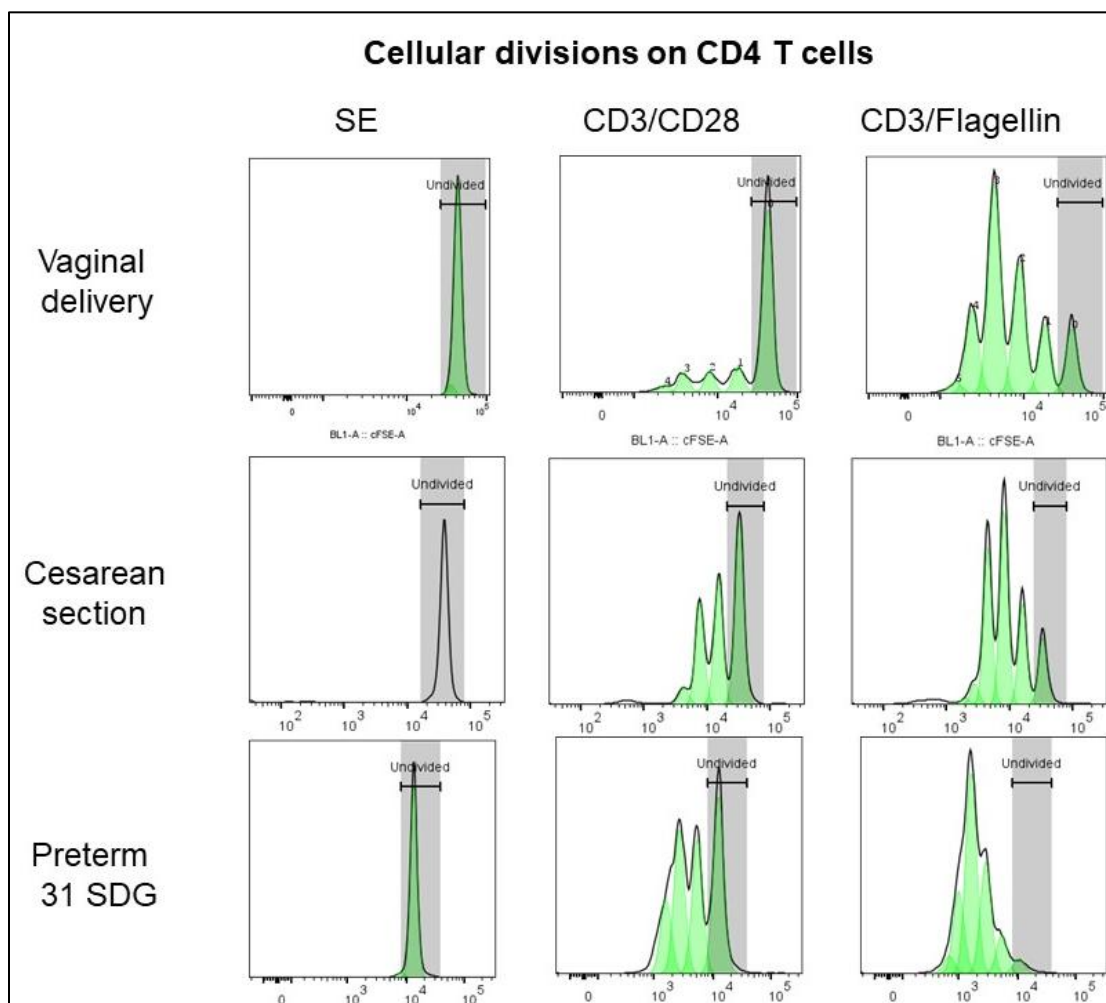


Figura 15. Dilución de CFSE en linfocitos T CD4⁺ neonatales. Las CBMCs fueron teñidas con CFSE, estimuladas en las condiciones CD3+CD28 o CD3+Flagelina, y posteriormente fueron incubadas durante 96 h en medio RPMI. Cada uno de los picos representa una división celular; el pico sombreado de color gris es la G0.

Los resultados obtenidos a partir de CBMCs de neonatos de término nacidos por cesárea o parto vaginal y neonatos prematuros muestran que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ presentan una mayor proliferación inducida por el estímulo CD3+Flagelina. Este estímulo, indujo un mayor porcentaje de células que proliferaron, sin embargo, fue aún más alto en los neonatos prematuros (Figs. 15 y 16). Por otro lado, al estimular con CD3+CD28, los linfocitos T CD4⁺ proliferaron en menor proporción que aquellos estimulados con CD3+Flagelina, lo cual se observa en el número de picos y la frecuencia celular. Sin embargo, aún con esta diferencia tan marcada, pudo observarse que los neonatos nacidos por cesárea presentan un mayor porcentaje de células divididas. Algo notable es que los neonatos mantienen, en un nivel basal, cierta proliferación homeostática que estuvo presente en todas las muestras de neonatos (Anexos: figura 36).

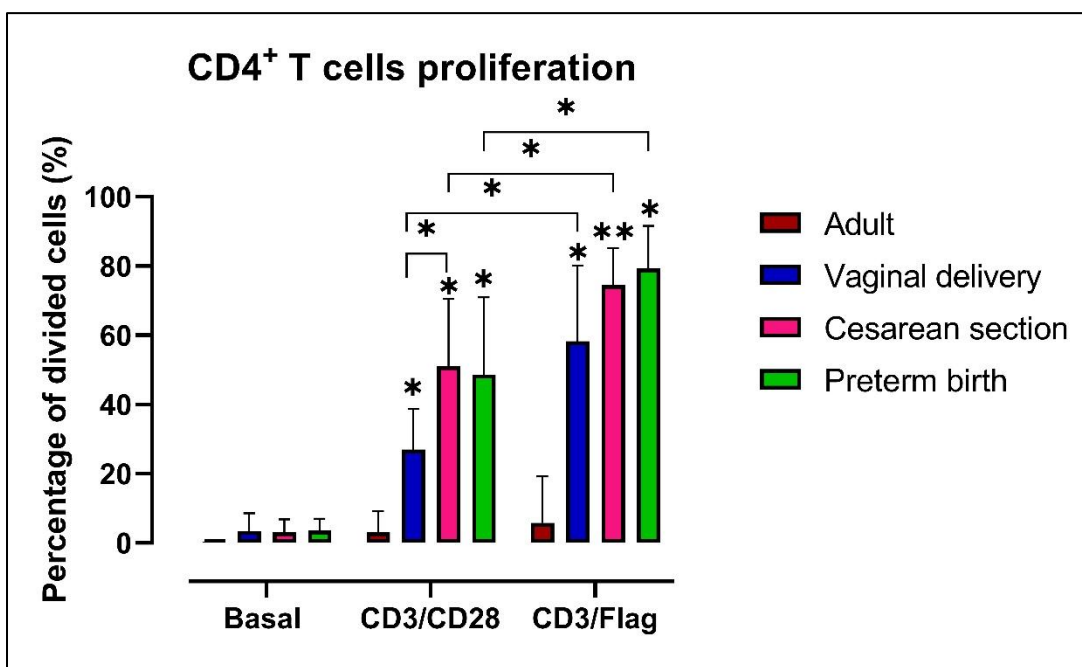


Figura 16. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que proliferaron en respuesta al estímulo o en condición basal. Se calculó el porcentaje de división de cada una de las muestras

evaluadas en respuesta a los estímulos estudiados posterior a 96 horas de estimulación. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas para datos pareados (Wilcoxon) y no pareados (Mann-Whitney). Adultos = 6, parto vaginal = 6, cesárea término = 7, prematuros = 5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Los datos obtenidos del porcentaje de células que se dividieron (Fig. 16) nos muestran que los linfocitos de neonatos nacidos por cesárea proliferan más que los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal estimulados tras la estimulación con CD3+CD28. Sin embargo, este valor parece ser semejante entre los linfocitos T de los distintos grupos de neonatos cuando son estimulados con CD3+Flagelina, aunque estos valores son mayores que los del estímulo CD3+CD28. En los experimentos con las PBMCs de adultos, los linfocitos T no mostraron un aumento en su proliferación celular con ningún estímulo. Al igual que los linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea presentaron mayor proliferación en comparación con los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal, con ambos estímulos (Fig. 18). Además, presentaron una mayor cantidad de células divididas que los neonatos nacidos por parto vaginal con el estímulo CD3+CD28 (Fig. 17).

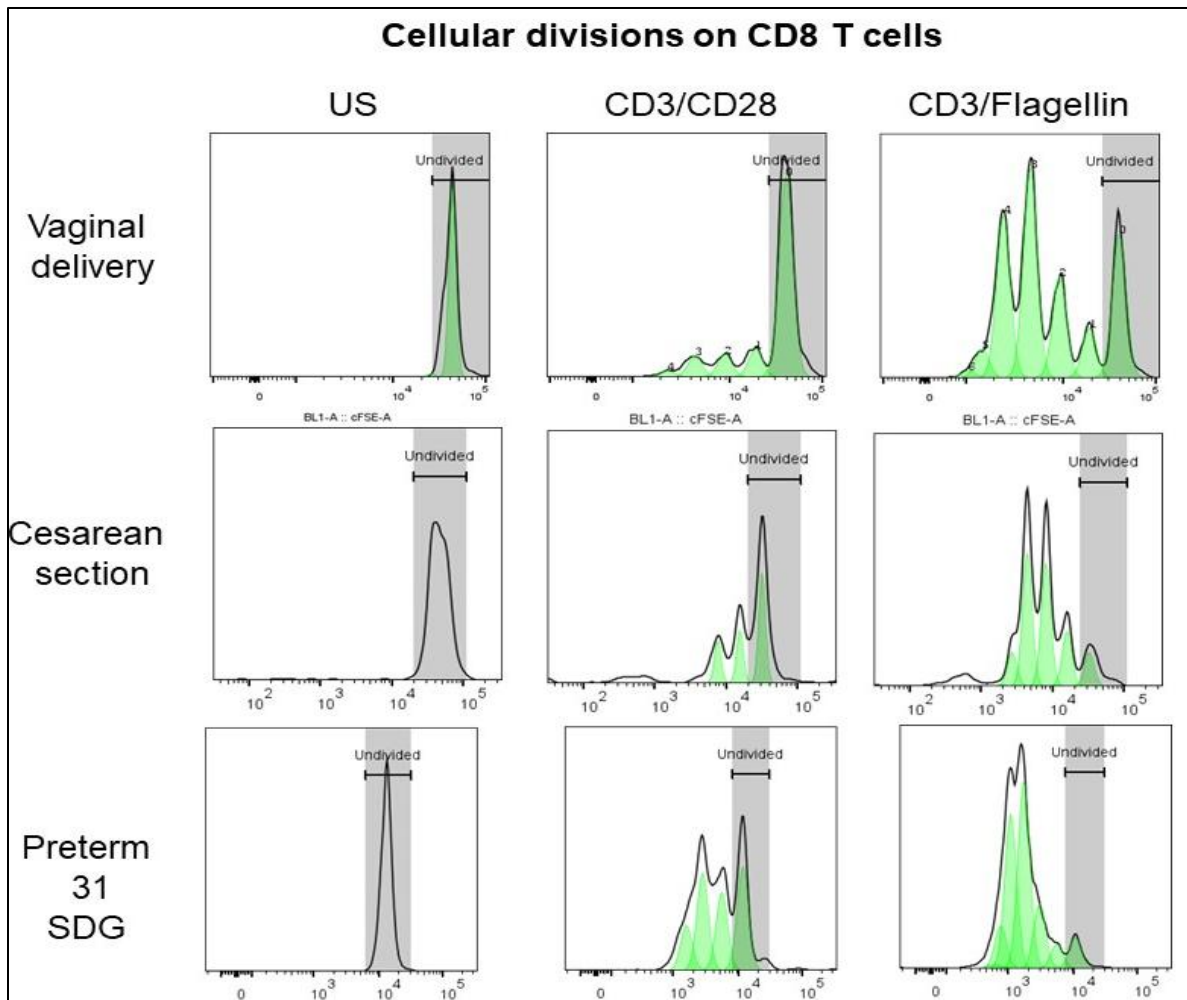


Figura 17. Dilución de CFSE en linfocitos T CD8⁺ de neonatos. Las CBMCs fueron teñidas con CFSE, estimuladas con CD3+CD28 o CD3+Flagelina y, posteriormente, incubadas durante 96 h en medio RPMI. Cada uno de los picos representa una división celular, el pico sombreado de color gris es la G0.

Asimismo, los linfocitos T CD8⁺ neonatales presentaron bajos niveles de proliferación homeostática (sin estimulación) (Anexo: figura 36), además de la formación de diversas generaciones tras la estimulación (Figura 17).

En la figura 18, a partir de los datos de las células T CD8⁺ que se dividieron, se realizó la estadística correspondiente para identificar diferencias significativas. Logramos observar un comportamiento muy similar de estas células con respecto a las T CD4⁺. Se observa que las células aumentan su proliferación con el estímulo CD3+CD28; sin

embargo, este incremento se intensifica cuando las células son estimuladas con CD3+Flagelina en neonatos de término nacidos por parto vaginal y en prematuros. Una vez más, las células de neonatos nacidos por cesárea fueron las que más proliferaron.

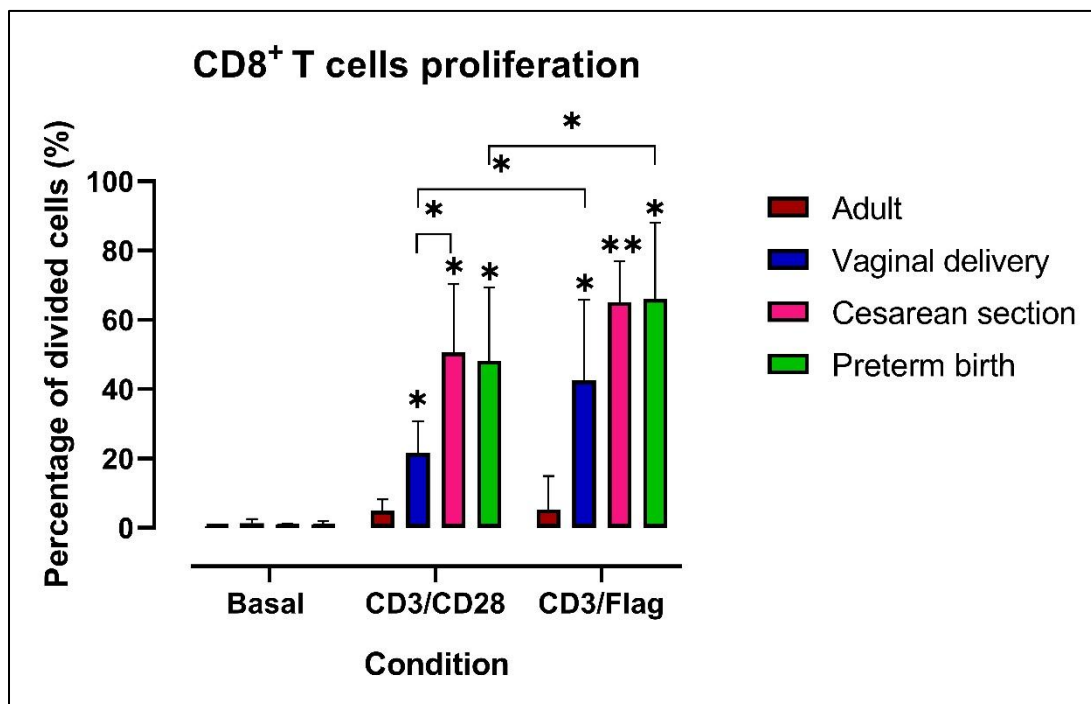


Figura 18. Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que proliferaron en respuesta al estímulo o en condición basal. Se calculó el porcentaje de división de cada una de las muestras evaluadas en respuesta a los estímulos estudiados posterior a 96 horas de estimulación. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y datos no pareados (Mann-Whitney). Adultos = 6, parto vaginal = 5, cesárea de término = 6, prematuros = 5. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Es importante reconocer que los linfocitos de adultos tienen un porcentaje de división distinto a los neonatos. Esto puede deberse a que se ha descrito que a partir de las 48-72 horas posteriores a la estimulación comienza a expresarse el receptor de la IL-2, por lo que posiblemente sea necesaria la estimulación por un tiempo más prolongado [126]. Sin embargo, para estar seguros de que las células fueran responsivas después del tratamiento que hicimos con las perlas magnéticas para depletar la memoria, realizamos la estimulación con PMA+Ionomicina en células vírgenes y totales (sin eliminar memoria) como se muestra en la figura 19.

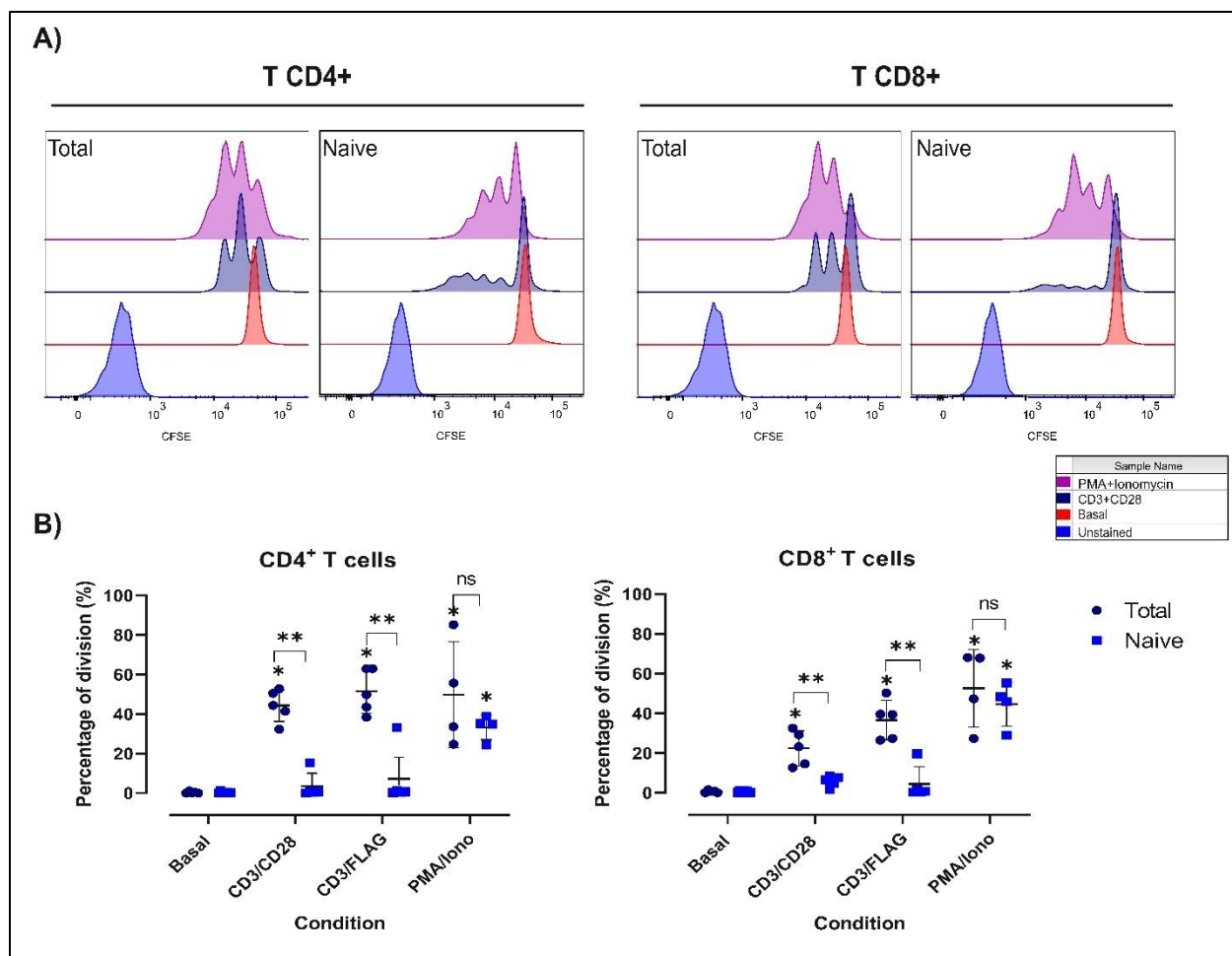


Figura 19. Evaluación de la proliferación de PBMCs totales y vírgenes de adultos.

A partir de sangre periférica de adulto se purificaron PBMCs y se evaluó la proliferación en células vírgenes (se depletaron las células de memoria CD45RO^{high}) así como en células totales (mezcla de células vírgenes y CD45RO^{high}). **A)** Imagen representativa de los histogramas que muestran la dilución del CFSE en células T CD4⁺ y CD8⁺ totales y vírgenes. **B)** Valores del porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ divididas a partir de los estímulos realizados. Se realizaron pruebas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y datos no pareados (Mann-Whitney). Adultos totales = 5, adultos vírgenes = 8. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

En la figura 19 se muestran los resultados de la evaluación de la proliferación celular de PBMCs vírgenes (se depletaron las células CD45RO^{high}), así como de los totales (mezcla de células vírgenes y CD45RO^{high}). Como se puede observar, las células vírgenes tienen un comportamiento distinto al que muestran las células de memoria y este cambio es

significativo entre los estímulos. Sin embargo, al estimular las células con PMA+ionomicina, podemos ver que estas tienen la capacidad de llegar casi al mismo nivel que las células totales, por lo que se descarta la posibilidad de que no sean responsivas. Es posible que la respuesta de las células de memoria CD45RO^{high} impulsen la activación de las células vírgenes, generando que haya una respuesta conjunta más robusta. Además, es posible que al evaluar la respuesta de linfocitos T totales se favorezca la respuesta de las células de memoria, que responden más rápida y fuertemente que las células vírgenes. Por otro lado, la estimulación con PMA/ionomicina se aleja más de una activación fisiológica mediada por el reconocimiento antigénico a través del TCR y señales coestimuladoras. En cambio, estas moléculas inducen una activación farmacológica y no específica de los linfocitos T, al actuar directamente sobre vías de señalización intracelular. El PMA activa la proteína cinasa C (PKC), promoviendo la fosforilación de MAP cinasas y la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, mientras que la ionomicina incrementa de manera abrupta la concentración intracelular de calcio al movilizar reservas del retículo endoplásmico, favoreciendo la activación de NFAT. Como consecuencia, esta combinación genera una respuesta celular potente e independiente de la interacción con células presentadoras de antígeno, permitiendo evaluar la capacidad funcional máxima de los linfocitos T más que una respuesta inmunológica específica dependiente del TCR [16], [21].

En resumen, los linfocitos de neonatos nacidos por cesárea mantienen una alta proliferación inducida por la activación con los estímulos CD3+Flagelina y CD3+CD28. Esto se refleja aún más en los linfocitos de neonatos prematuros, los cuales, con el estímulo CD3+Flagelina, producen más generaciones con mayor frecuencia celular y una disminución del porcentaje de la G0 a menos del 10%. Lo anterior nos permite conocer que la edad gestacional, junto con el modo de nacimiento, generaron diferencias en la proliferación de los linfocitos T con respecto a los neonatos nacidos a término por parto vaginal. Cabe destacar que la respuesta inmune es un conjunto de pasos coordinados, los cuales se conectan para promover una respuesta. Por lo tanto, lo siguiente que hicimos fue evaluar las citocinas producidas en los sobrenadantes de estas células que fueron puestas a proliferar; esto se abordará en el siguiente apartado.

4. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de células mononucleadas de sangre de cordón umbilical (CBMC).

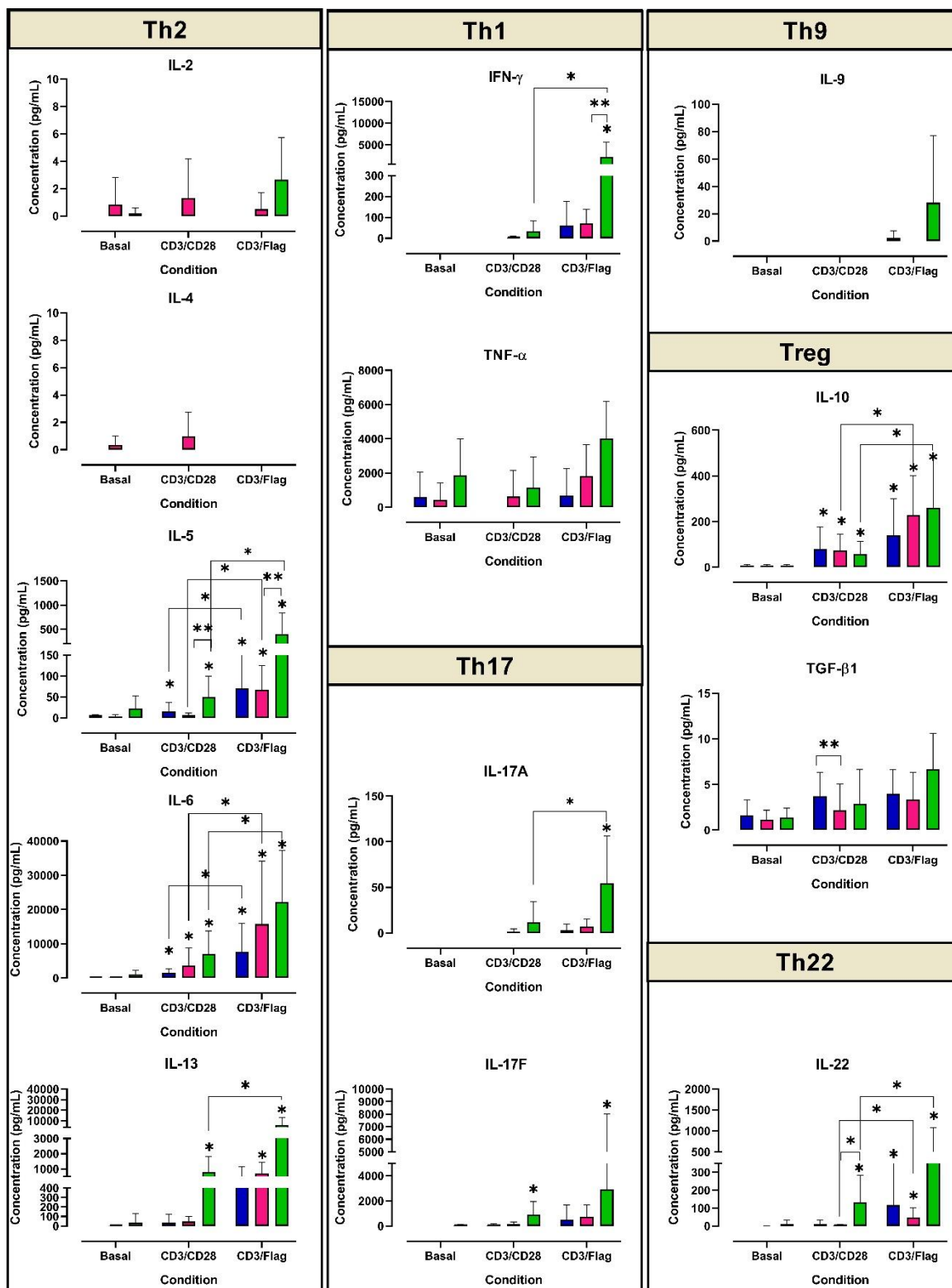
Una vez que se logró determinar la proliferación celular, decidimos evaluar la producción de citocinas de estas células al término del tiempo de estimulación. Después de incubar las células por 96 horas en las condiciones antes mencionadas, se recolectó una muestra de sobrenadante que fue usada para cuantificar la producción de citocinas. Las citocinas evaluadas fueron clasificadas en citocinas cooperadoras o Th (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN- γ , TNF- α , TGF- β), así como un set de citocinas innatas (IL-1 β , IL-7, IL-8) y moléculas citotóxicas (Granzima B y Perforina), las cuales fueron cuantificadas con el kit Legendplex como se describió en los métodos.

En la figura 20 se muestran los resultados de la cuantificación de citocinas. Se puede observar que las citocinas del perfil Th1 no se producen cuando se estimula a través de CD3+CD28, sin embargo, es posible ver que hay una tendencia de aumento con el estímulo CD3+Flagelina en los neonatos nacidos a término. Además, se observa que los linfocitos de neonatos prematuros producen una gran cantidad de IFN- γ cuando se estimulan con CD3+Flagelina, este resultado fue estadísticamente significativo cuando se comparó con CD3+CD28, por lo que estas células tienen una respuesta más robusta hacia esta citocina con el estímulo. Por otra parte, la producción de TNF- α fue irregular, produciéndose a nivel basal en algunas ocasiones, por lo que no hubo diferencias significativas.

En el caso de las citocinas del fenotipo Th2, se pudo observar que no hay producción de IL-2 e IL-4, lo cual nos causó una sorpresa debido a la alta proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por cesárea con el estímulo CD3+CD28. Sin embargo, sí fue posible observar que hay una gran cantidad de IL-5, IL-13 e IL-6 producidas por las CBMC. Cuando estas células son estimuladas con CD3+CD28, se observa un aumento en la producción de IL-5 en células de neonatos nacidos por parto vaginal y prematuros, y se incrementó significativamente en los 3 grupos cuando se estimularon con CD3+Flagelina. La producción de IL-6 fue de las más altas en comparación con las demás citocinas. Se observó que esta citocina se produjo con ambos estímulos; sin

embargo, se incrementó aún más cuando se estimuló con CD3+Flagelina. Por otra parte, la producción de IL-13 parece ser producida principalmente por las células de neonatos prematuros, ya que con ambos estímulos fue posible observar una gran cantidad de esta citocina, siendo el estímulo CD3+Flagelina el que más la promovió. También pudo observarse que con este mismo estímulo se indujo la producción de IL-13 en las células de neonatos de término nacidos por cesárea. No se encontraron diferencias significativas al comparar muestras por la forma de nacimiento, pero sí hubo significancia al comparar la edad gestacional (neonatos de término nacidos por cesárea y neonatos prematuros), principalmente en la producción de IL-5, siendo los neonatos prematuros los que produjeron más.

Al analizar las citocinas del fenotipo Th17, observamos que no había producción de IL-17A por parte de los neonatos nacidos a término, sin embargo, las células de neonatos prematuros sí llegaron a producir IL-17A cuando se estimularon con CD3+Flagelina. Además, se observó que las células de neonatos nacidos a término no generan grandes cantidades de IL-17F a diferencia de los prematuros, los cuales sí lo hicieron con ambos estímulos. De las citocinas del perfil Treg se observó que todos los neonatos producen una cantidad considerable de IL-10 con ambos estímulos, sin embargo, es posible ver que aumenta significativamente la concentración de esta citocina cuando las células de neonatos nacidos por cesárea a término o prematuros fueron estimuladas con CD3+Flagelina. La producción de TGF- β fue observada a una concentración muy baja, por lo que es posible que la IL-10 tenga un papel más importante mediando la respuesta antiinflamatoria. Finalmente, se analizó la producción de IL-22 e IL-9; por un lado, las células de neonatos prematuros con ambos estímulos produjeron IL-22, mientras que las células de neonatos de término aumentaron su producción significativamente cuando fueron estimuladas con CD3+Flagelina. Por otro lado, no fue posible medir ninguna cantidad de IL-9, por lo que se descarta la producción de esta citocina por parte de las CBMC.



■ Vaginal delivery ■ Cesarean section ■ Preterm

Figura 20. Producción de citocinas por células mononucleadas de cordón umbilical (CBMC). Los sobrenadantes fueron colectados después de 96 h de estimulación y se realizó la cuantificación de citocinas. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas para datos pareados (Wilcoxon) y datos no pareados (Mann-Whitney). Parto vaginal = 6, cesárea término = 6, prematuros = 6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

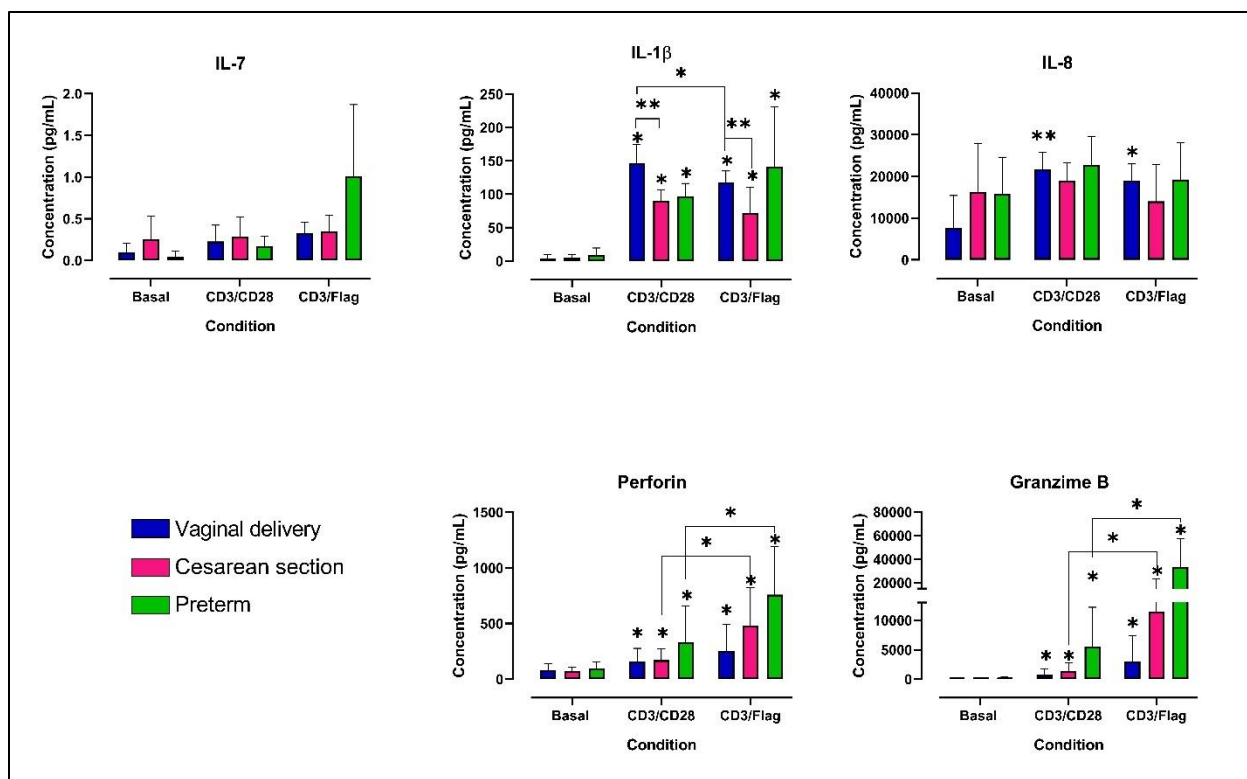


Figura 21. Producción de citocinas innatas y moléculas citotóxicas por células mononucleadas de cordón umbilical (CBMC). Los sobrenadantes fueron colectados después de 96 h de estimulación y se realizó la cuantificación de citocinas. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas para datos pareados (Wilcoxon) y datos no pareados (Mann-Whitney). Parto vaginal = 6, cesárea término = 6, prematuros = 6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Las citocinas innatas cuantificadas fueron IL-1 β , IL-7, e IL-8, las cuales se escogieron debido a su posible contribución a la respuesta inmune neonatal. Su medición fue realizada de la misma manera que las citocinas Th y siguiendo las instrucciones del fabricante. En la figura 21 se puede observar una gran producción de IL-1 β en todas las

células neonatales con el estímulo CD3+CD28, sin embargo, hubo una mayor producción por parte de las células de neonatos que nacieron por parto vaginal. Por otro lado, cuando las células fueron estimuladas con CD3+Flagelina, se vio afectada esta producción, promoviendo una disminución significativa en comparación con el estímulo CD3+CD28. En el caso de la IL-8, pudimos observar que es una de las citocinas que se produce desde el control en estado basal; en las células estimuladas de neonatos nacidos por cesárea no se encontraron diferencias significativas con respecto al control basal. Se pudo observar un aumento significativo de IL-8 en las células de neonatos nacidos por parto vaginal con ambos estímulos. Durante este estudio, no fue posible medir la presencia de IL-7, por lo que se descarta la producción de esta citocina por parte de las CBMC.

Además de las citocinas cooperadoras e innatas, se evaluó la producción de dos moléculas citotóxicas (granzima B y perforina) que tienen un papel muy importante en la eliminación de patógenos y células infectadas o transformadas. Logramos observar que las células neonatales en general llevan a cabo una producción moderada de ambas moléculas con ambos estímulos. Sin embargo, notamos que la granzima B se producía en grandes cantidades en todos los grupos estudiados y, además, aumentaba significativamente junto con la perforina al estimular a través de CD3+Flagelina las células de neonatos nacidos por cesárea a término o prematuros.

5. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ purificados de neonatos y adultos

A partir de la determinación de la actividad de los factores transcripcionales y la proliferación celular de los linfocitos de adultos y neonatales, así como la producción de citocinas de sobrenadantes de CBMCs, se quiso conocer el papel de las células T purificadas y cómo la ausencia de otras células pudiera favorecer o afectar su activación. Para ello, se decidió evaluar la presencia de los marcadores de activación CD69 y CD25 en la superficie de los linfocitos T, además de los paneles de citocinas previamente cuantificados en las CBMC. Se procedió a purificar linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea a término,

de neonatos prematuros nacidos por cesárea y sangre periférica de adultos. Se realizaron las siguientes condiciones de estimulación: basal, CD3+CD28 y CD3+Flagelina. Las células se dejaron en incubación en las condiciones antes mencionadas por 72 horas en una densidad celular de 2×10^6 células/mL; al finalizar el tiempo se colectaron los sobrenadantes y se cuantificaron con el kit Legendplex. Los dot plots de las figuras 22A y 22B corresponden a muestras independientes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ purificados de neonatos y adultos, cuyas purezas estuvieron por arriba del 94%. También se tomó en cuenta que las células no expresaran marcadores de memoria (CD45RO) o activación (CD69) antes de ser estimulados, ya que esto afectaría el análisis de los resultados (Fig. 22C). Así mismo, se midió la expresión de los marcadores CD69 y CD25 en las células purificadas antes y después de la estimulación (Fig. 23). Como un panorama general, se puede apreciar que tanto el estímulo CD3+CD28 como CD3+Flagelina favorecen un aumento en la expresión de ambos marcadores tras 72 horas de estimulación. Se decidió usar este tiempo debido a una cinética de expresión de los marcadores CD69 y CD25 que se realizó para evaluar el tiempo óptimo (anexos figura 37).

En la figura 23, se muestran los resultados de la expresión de CD69 y CD25 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En los linfocitos T CD4⁺ (figura 23A) podemos observar que las células de neonatos nacidos a término presentan una mayor expresión de CD69 que las de adultos cuando se estimulan con CD3+CD28. Este aumento en la expresión de CD69 también se observó con el estímulo CD3+Flagelina. Por otra parte, los linfocitos de neonatos nacidos a término por vía vaginal expresan mayor porcentaje de células CD25+ que los adultos con ambos estímulos. Esto puede contribuir a lo antes discutido respecto a la relación que hay entre la baja proliferación de los linfocitos de adultos y la expresión de CD25. Para este marcador no se cuenta con suficientes réplicas de linfocitos de neonatos nacidos prematuramente. Por otro lado, en la figura 23B logramos observar que los linfocitos T CD8⁺ de adultos tuvieron un mayor porcentaje de CD69 con ambos estímulos, mientras que las células de neonatos nacidos a término por cesárea tuvieron un porcentaje similar con el estímulo CD3+CD28. Las observaciones concuerdan con la literatura en la que se menciona que los linfocitos T CD8⁺ neonatales tienen una activación distinta a los adultos y esta se ve reflejada en la expresión de marcadores de

activación [30], [57]. Con respecto a las muestras de prematuros, no fue posible conseguir muestras con la cantidad suficiente de sangre para purificar estas células. No fue posible medir el marcador CD25 en las células T CD8⁺ debido a que el anticuerpo anti-CD25 fue entregado tiempo después de los experimentos realizados. Tampoco fue posible purificar linfocitos T CD8⁺ de neonatos prematuros debido a la limitada cantidad de muestra obtenida.

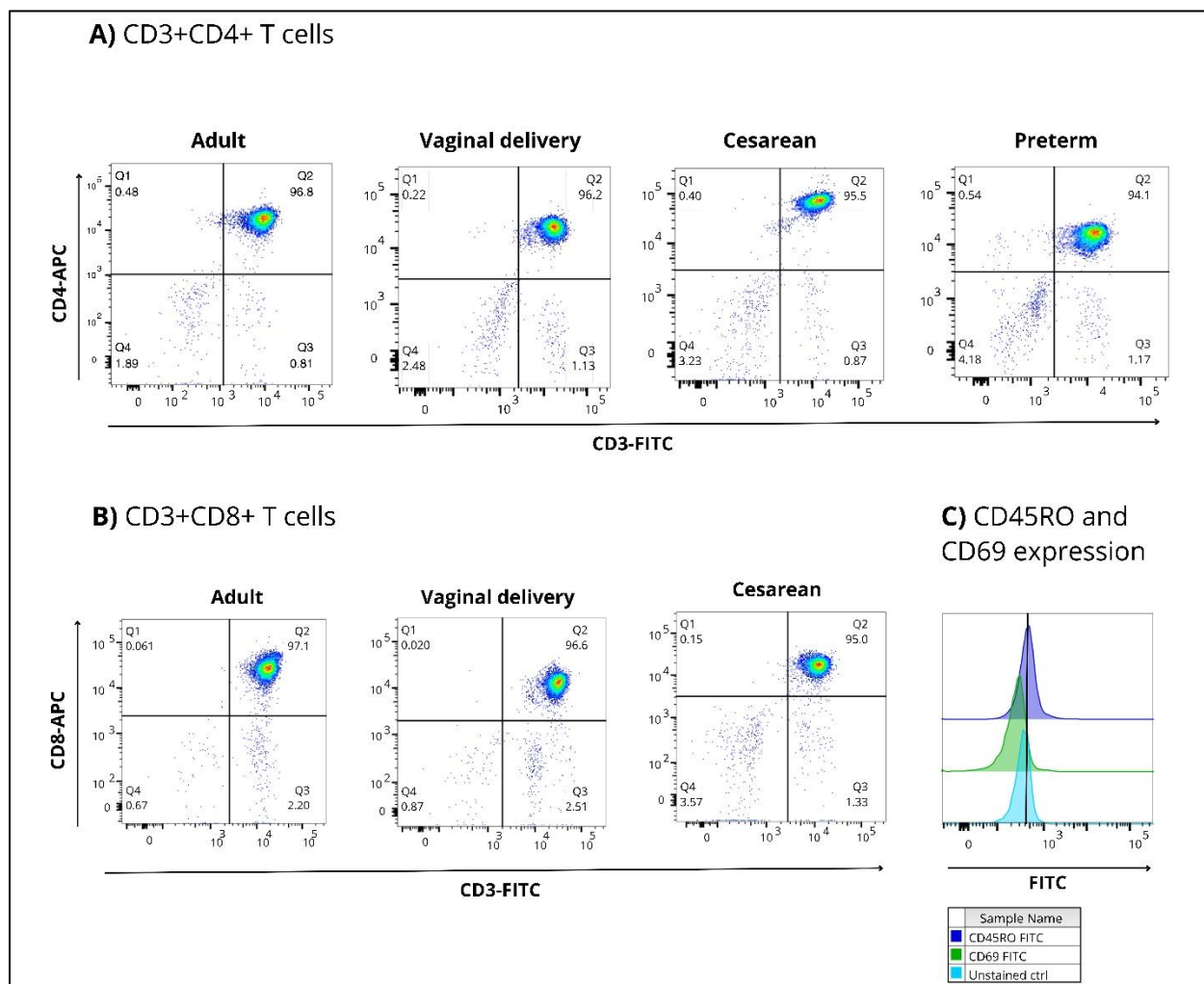


Figura 22. Controles de pureza de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. **A)** Imágenes representativas de las purizas de linfocitos T CD4⁺ después del tratamiento con Rosette Sep. **B)** Imágenes representativas de las purizas de los linfocitos T CD8⁺ después del tratamiento con Rosette Sep. Se muestra la doble tinción con anti-CD3 Fitc y anti-CD4 o anti-CD8 APC, el cuadrante Q2 representa el porcentaje de las células que son positivas

para ambas moléculas. **C)** Imagen representativa de los controles que muestran que las células no expresaron los marcadores CD45RO (memoria) o CD69 (activación) antes de realizar los experimentos.

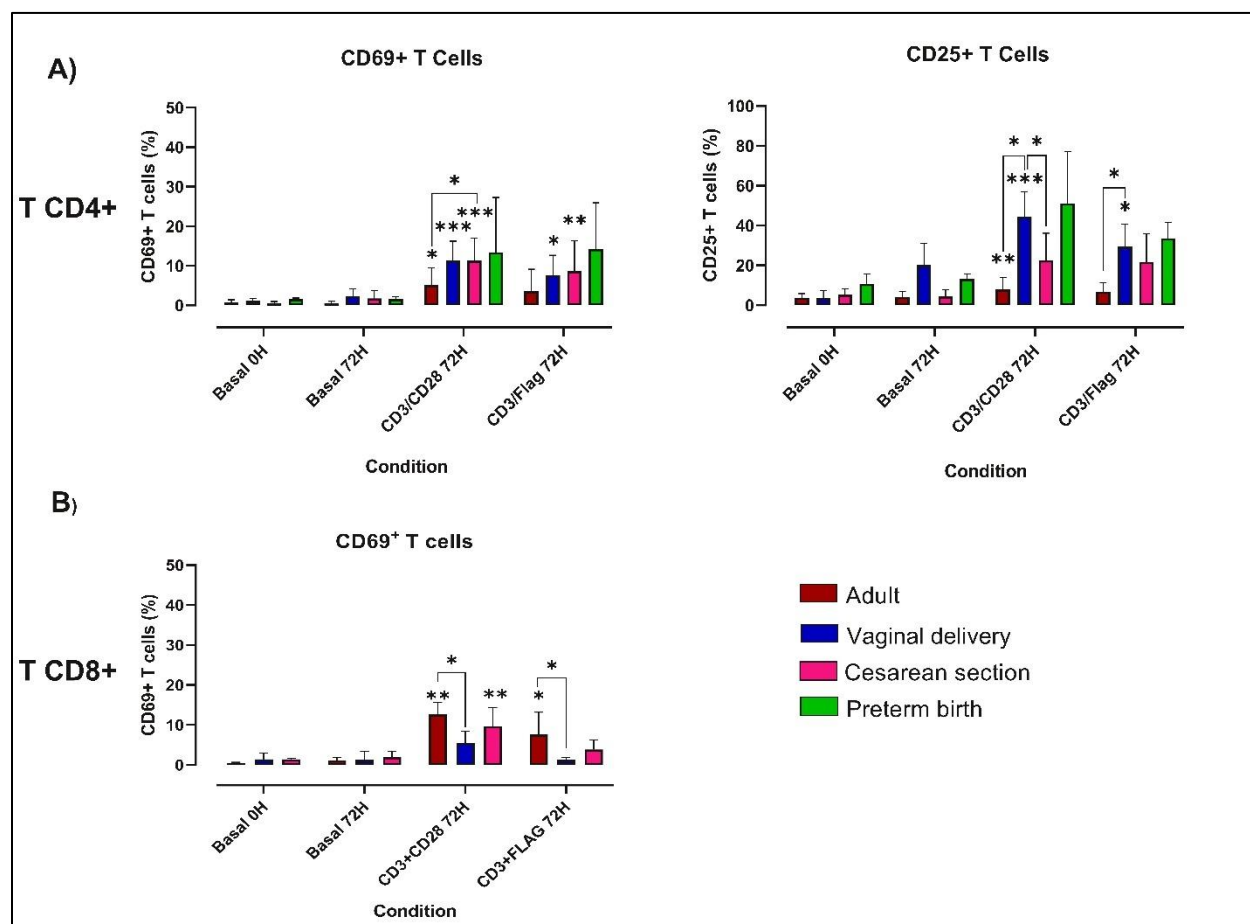


Figura 23. Expresión de los marcadores CD69 y CD25 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de adultos y neonatos. Se evaluó la presencia de los marcadores membranales CD69 y CD25 en linfocitos T **A)** CD4⁺ y **B)** CD8⁺ tras 72 h de estimulación, bajo las condiciones mostradas en la figura. **T CD4⁺:** Adultos = CD69: 7, CD25: 4, parto vaginal = CD69: 7, CD25: 6, cesárea término = CD69: 8, CD25: 3, prematuros = CD69: 3, CD25: 3. **T CD8⁺:** Adultos = 4, parto vaginal = 4, cesárea término = 4, prematuros = 4. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y no pareados (Mann-Whitney). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

En las figuras 24 y 26, se muestra un mapa de calor que nos muestra un panorama general de la producción de citocinas; en él se pueden observar los resultados de cada

una de las muestras cuantificadas a partir de los sobrenadantes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente. Las columnas corresponden a las muestras de los diferentes estímulos realizados, mientras que las filas a las citocinas cuantificadas. Asimismo, se muestra la clasificación de color del tipo de estímulo realizado y de la población; los tonos azules indican una mayor concentración y los tonos amarillos una menor concentración con respecto al promedio de cada analito. La normalización utilizada fue un Z-score. Es posible observar que las células presentan una producción más robusta de citocinas cuando se estimulan con CD3+CD28. Por otra parte, cuando se realizó la estimulación con CD3+Flagelina, se observó que cambió el perfil de citocinas producidas; si bien se sigue observando la producción de la mayoría de las citocinas, el promedio de sus concentraciones parece haber disminuido.

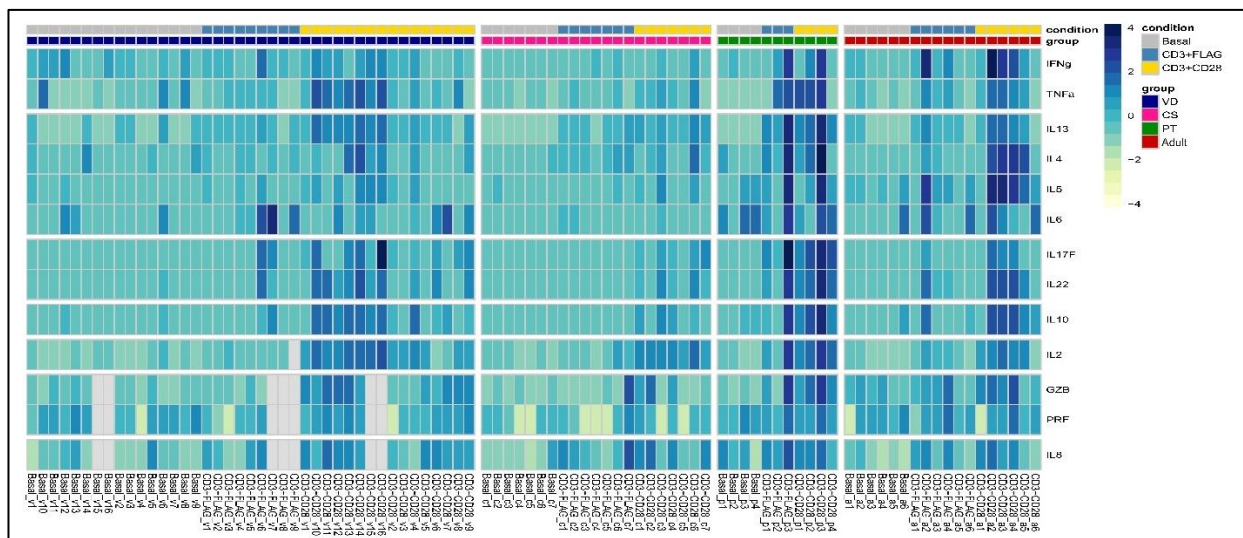


Figura 24. Mapa de calor de las concentraciones de citocinas y moléculas efectoras producidas por células T CD4⁺. Se observa la normalización de los promedios de las concentraciones de las citocinas bajo condiciones basales y de estimulación con anti-CD3+Flagelina (CD3+FLAG) o anti-CD3+CD28 (CD3+CD28). Las columnas representan muestras individuales de neonatos nacidos por parto vaginal (VD), cesárea (CS), prematuros (PT) y adultos, mientras que las filas corresponden a las citocinas y moléculas efectoras evaluadas (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-17F, IL-22, IL-10, IL-2, granzima B, perforina e IL-8). Los valores fueron normalizados mediante z-score, donde los tonos azules indican una mayor concentración y los tonos amarillos una menor concentración con respecto al promedio de cada analito.

A partir de los resultados anteriores se realizó la estadística correspondiente y se generaron mapas de calor con los promedios (Fig. 25B y 27B) para facilitar la visualización de los datos. Se encontraron diferencias significativas entre el control basal y las muestras estimuladas. También se calcularon las diferencias significativas entre poblaciones, sin embargo, estos resultados se muestran en los anexos figuras 38-41. Asimismo, se agregó un análisis complementario en un gráfico de radar que nos permite observar cómo cada estímulo cambia el perfil de producción de citocinas.

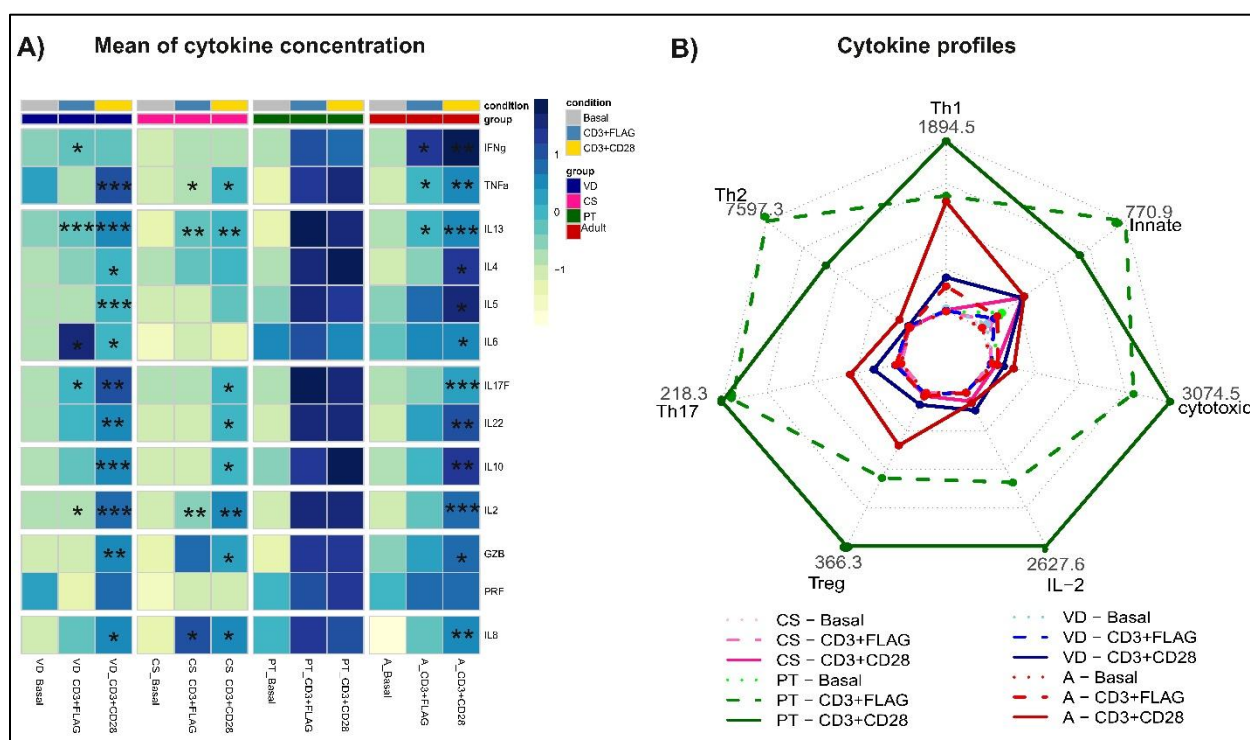


Figura 25. Perfil de producción de citocinas de linfocitos T CD4⁺ purificados de neonatos y adultos. Perfiles de neonatos nacidos por parto vaginal (VD), cesárea (CS), prematuros (PT) y adultos (A), estimuladas con anti-CD3+CD28 o anti-CD3+flagelina (CD3+FLAG). **A)** Mapa de calor que muestra la concentración promedio normalizada (Z-score) de las citocinas y moléculas efectoras evaluadas (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-17F, IL-22, IL-10, IL-2, granzima B [GZB], perforina [PRF] e IL-8) bajo condiciones basales, CD3+FLAG y CD3+CD28. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control basal dentro de cada grupo (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). **B)** Gráfico de radar que resume la producción total de citocinas agrupadas según su perfil funcional (Th1, Th2, Th17, Treg, IL-2, citotoxicidad e inmunidad innata)

para cada grupo experimental y condición de estimulación. Los valores indicados en los ejes corresponden a la concentración máxima registrada en cada categoría funcional.

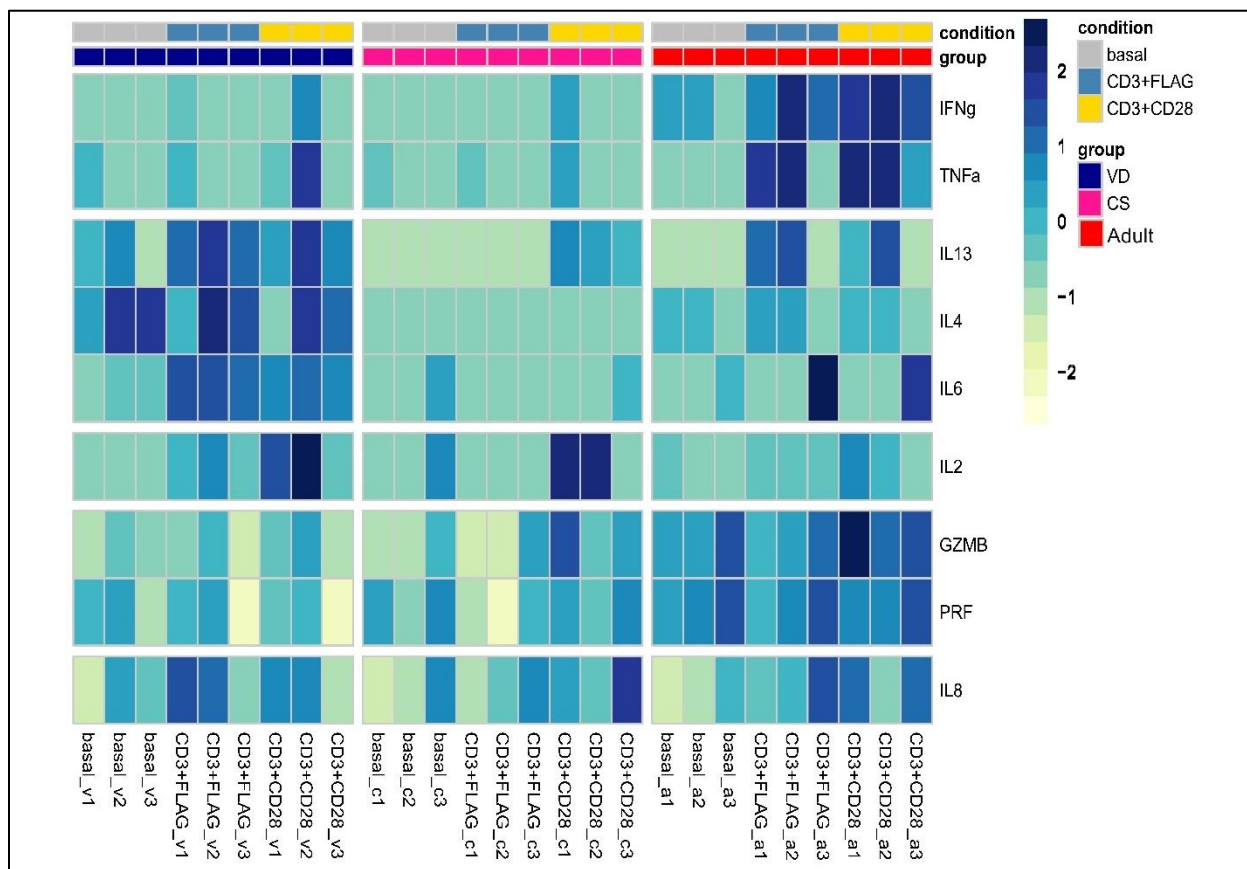


Figura 26. Mapa de calor de las concentraciones de citocinas y moléculas efectoras producidas por células T CD8⁺. Se observa la normalización de los promedios de las concentraciones de citocinas en condiciones basales y de estimulación con anti-CD3+Flagelina (CD3+FLAG) o anti-CD3+CD28 (CD3+CD28). Las columnas representan muestras individuales de neonatos nacidos por parto vaginal (VD), cesárea (CS) y adultos, mientras que las filas corresponden a las citocinas y moléculas efectoras evaluadas (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-4, IL-6, IL-2, granzima B, perforina e IL-8). Los valores fueron normalizados mediante z-score, donde los tonos azules indican una mayor concentración y los tonos amarillos una menor concentración con respecto al promedio de cada analito.

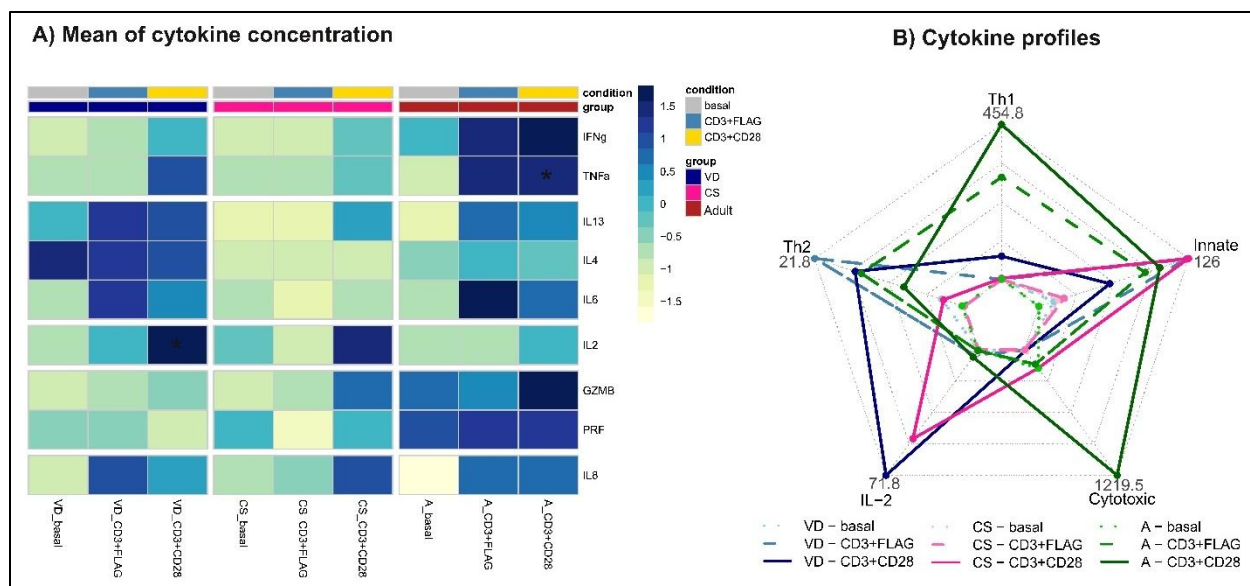


Figura 27. Perfil de producción de citocinas de linfocitos T CD8⁺ purificados de neonatos y adultos. Perfiles de neonatos nacidos por parto vaginal (VD), por cesárea (CS) y adultos (A), estimulados con anti-CD3+CD28 o anti-CD3+flagelina (CD3+FLAG). **A)** Mapa de calor que muestra la concentración promedio normalizada (Z-score) de las citocinas y moléculas efectoras evaluadas (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-4, IL-6, IL-2, granzima B, perforina e IL-8) bajo condiciones basales, CD3+FLAG y CD3+CD28. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control basal dentro de cada grupo (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). **B)** Gráfico de radar que resume la producción total de citocinas agrupadas según su perfil funcional (Th1, Th2, Th17, Treg, IL-2, citotoxicidad e inmunidad innata) para cada grupo experimental y condición de estimulación. Los valores indicados en los ejes corresponden a la concentración máxima registrada en cada categoría funcional.

En las figuras 24 y 26 se muestran los resultados totales de la cuantificación de las principales citocinas T cooperadoras producidas. En las figuras 25B y 27B se muestran los resultados con el cálculo de la estadística correspondiente de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente. Con respecto a las citocinas del fenotipo Th1, se observa un aumento significativo de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de adultos con ambos estímulos. Sin embargo, los neonatos de término tuvieron un aumento significativo en la cantidad de IFN- γ con el estímulo CD3+Flagelina. Además, la producción de TNF- α aumentó significativamente con el estímulo CD3+CD28 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de

adultos, así como en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal. Solo los adultos y neonatos nacidos por cesárea a término tuvieron un aumento significativo de TNF- α cuando los linfocitos T CD4⁺ fueron estimulados con CD3+Flagelina. Dentro de la clasificación de citocinas, la IL-2 puede pertenecer a varios fenotipos; sin embargo, optamos por no agruparla en uno solamente. Esta citocina fue producida, en promedio, principalmente por los linfocitos T CD4⁺ estimulados con CD3+CD28 de neonatos prematuros, seguidos por los nacidos a término por parto vaginal y adultos. Sin embargo, el estímulo CD3+Flagelina también generó un aumento significativo en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos a término. Es importante recalcar que tanto adultos como neonatos de término nacidos por cesárea presentan una similitud en el promedio de la concentración de esta citocina, lo cual se discutirá más adelante.

Por otro lado, sobre las citocinas del fenotipo Th2, los linfocitos T CD4⁺ de adultos mostraron un aumento significativo en las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 cuando las células fueron estimuladas con CD3+CD28. Cabe destacar que al estimular estas células con CD3+Flagelina no ocurre el mismo resultado que con el otro estímulo. Parece ser que las células disminuyen la producción de IL-4, IL-6 e IL-13; sin embargo, esta última se mantiene con ambos estímulos en neonatos de término y adultos. En los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos a término por parto vaginal y cesárea hubo un aumento significativo de IL-2 e IL-13 con el estímulo CD3+CD28, los cuales parecen aumentar en menor grado cuando se estimulan con CD3+Flagelina. Solo en células de neonatos nacidos por parto vaginal se observó un aumento en la cantidad de IL-4, IL-5 e IL-6 cuando fueron estimuladas con CD3+CD28 en comparación con el control basal. A excepción de IL-6, estas citocinas producidas por células de neonatos nacidos por parto vaginal parecen aumentar menos cuando se estimulan a través de CD3+Flagelina. En el caso de la IL-6, se observó lo contrario. Otro aspecto que nos pareció muy interesante fue que las células de neonatos nacidos por parto vaginal y los neonatos prematuros son capaces de superar el promedio de IL-2 producido por los adultos. Es importante aclarar que debido al reducido número de muestras de linfocitos T CD4⁺ de neonatos prematuros, no fue posible encontrar valores significativos; solo se puede observar que existe una tendencia de aumento de las citocinas del fenotipo Th2 con ambos estímulos,

con mucha similitud entre los valores promedios. Además, nos percatamos de que los neonatos prematuros mostraron una alta producción de IL-13, por arriba del promedio que los adultos y neonatos a término produjeron. Por otro lado, los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos no presentaron un aumento significativo en las citocinas del fenotipo Th2 cuando se compararon con el control sin estimular.

Respecto a las citocinas del fenotipo Th17 (IL-17A e IL-17F), se obtuvo un aumento significativo en la producción de IL-17F con el estímulo CD3+CD28 en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos a término y de adultos. Sin embargo, fue posible ver que las células de neonatos nacidos por parto vaginal produjeron una gran cantidad de esta citocina por arriba del promedio de los adultos. Además, las células de neonatos prematuros producen esta citocina significativamente más que las células de neonatos nacidos por cesárea a término (Anexos: figura 37). Por otro lado, notamos que la estimulación con CD3+Flagelina solo aumentó significativamente la producción de IL-17F en los neonatos de término nacidos por parto vaginal. No fue posible observar cambios significativos en la producción de IL-17A por parte de los linfocitos T CD4⁺, y en el caso de los linfocitos T CD8⁺ no se observó un aumento significativo en las citocinas del perfil Th17.

Por otro lado, se observó un aumento significativo en la producción de IL-9 con el estímulo CD3+CD28 en los linfocitos T CD4⁺ de adultos, mientras que al ser estimulados con CD3+Flagelina no hubo cambios con respecto al control basal. En los neonatos no se observaron diferencias significativas con ninguno de los estímulos realizados. En los linfocitos T CD8⁺ no hubo aumento en la producción de IL-9 con ningún estímulo. Cuando analizamos la producción de IL-22, se observó un aumento en los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos nacidos a término cuando se estimularon con CD3+CD28, mientras que la estimulación con CD3+Flagelina no promovió un aumento significativo. Además, fue posible observar que hubo una diferencia significativa al comparar la producción de esta citocina por linfocitos T CD4⁺ de neonatos prematuros con los nacidos por cesárea a término. En las citocinas del fenotipo Treg pudimos observar que los neonatos de término producen una cantidad similar de IL-10, sin embargo, los adultos superaron en promedio a estos. Cabe destacar que, en promedio, los neonatos prematuros produjeron una cantidad por encima de la de los adultos. Por otro lado, los niveles de TGF- β

detectados fueron mínimos, por lo que se considera que esta citocina no fue producida bajo las condiciones establecidas. Los linfocitos T CD8⁺ no mostraron producción de citocinas de los fenotipos Tc22 y Treg.

Dado que se ha descrito que los neonatos responden de manera similar a la respuesta innata, se decidió evaluar citocinas y proteínas con capacidad citotóxica que pudieran producirse durante la estimulación. En este sentido, en las figuras 24 y 27 se muestra el segundo panel de citocinas evaluado, que está conformado por citocinas innatas (IL-7, IL-8 e IL-1 β) y proteínas con capacidad citotóxica (Granzima B y Perforina). El panel completo de las citocinas y moléculas citotóxicas de linfocitos T CD4⁺ se puede encontrar en los anexos en la figura 38. Por un lado, no se encontró producción de IL-7 e IL-1 β en las células purificadas. Sin embargo, los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos a término y de adultos muestran una alta producción de IL-8 y granzima en respuesta al estímulo CD3+CD28, que parece aumentar en menor grado cuando se estimulan con CD3+Flagelina. Resulta interesante observar que los linfocitos T CD4⁺ son capaces de producir perforina desde el control basal, en especial los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal, adultos y prematuros, por lo que no hubo un aumento significativo de esta molécula con respecto al control basal. También nos llamó la atención que las células de neonatos nacidos por cesárea fueron las únicas que produjeron una cantidad muy limitada de granzima y perforina, en comparación con las células de neonatos que nacieron por parto vaginal o pretérmino (Fig. 24). Sin embargo, en promedio, los linfocitos T CD4⁺ de parto vaginal expresan menos granzima B que las células de adulto. Por otro lado, hasta el momento no se han encontrado diferencias significativas con este panel de citocinas en linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, es posible observar una tendencia a que la producción de las moléculas citotóxicas (granzima y perforina) sea menor en células de neonatos en comparación con las células de adultos.

A partir de los datos analizados, se decidió agrupar las citocinas de acuerdo con el fenotipo efector que predominantemente las produce: Th1 (TNF- α e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13), Th17 (IL-17F e IL-22), Treg (IL-10), respuesta inmune innata (IL-8), citotóxico (granzima B y perforina) e IL-2, la cual se analizó de manera independiente debido a su papel central en la activación y proliferación de los linfocitos T.

En la imagen 25B se observó que los neonatos prematuros presentaron la mayor producción promedio de citocinas cuando sus células fueron estimuladas con CD3+CD28. Los principales perfiles efectores representados fueron Th1, Th17, Treg, citotóxico e IL-2. Sin embargo, tras la estimulación con CD3+flagelina, la producción promedio de citocinas correspondientes a los perfiles Treg, citotóxico e IL-2 disminuyó, mientras que las asociadas a los perfiles Th2 e innato aumentaron. Estos resultados proporcionan un panorama del tipo de respuesta inmunitaria que podrían desarrollar los neonatos prematuros frente a antígenos bacterianos.

Por otro lado, las células de los neonatos nacidos a término por cesárea presentaron la menor producción de citocinas entre todos los grupos analizados. Tras la estimulación con CD3+CD28, el perfil predominante correspondió al de la respuesta inmune innata. En contraste, las células de los neonatos nacidos por parto vaginal, estimuladas con CD3+CD28, produjeron principalmente citocinas asociadas con los perfiles innato, Th1, Th17, Treg e IL-2. Cuando estas células fueron estimuladas con CD3+flagelina, la concentración global de citocinas disminuyó; sin embargo, se mantuvo una predominancia del perfil de respuesta inmune innata.

Finalmente, las células de los adultos estimuladas con CD3+CD28 conservaron principalmente un perfil Th1, acompañado de respuestas Th17 y Treg. En términos de concentración de citocinas, las células de adultos constituyeron el segundo grupo con mayor producción. Asimismo, se observó que la estimulación con CD3+flagelina redujo la concentración global de citocinas; no obstante, el perfil Th1 fue uno de los menos afectados e incluso el que mostró la mayor representación relativa tras este estímulo.

Este mismo análisis de perfiles de citocinas fue realizado para agrupar las principales citocinas producidas por linfocitos T CD8⁺ (Figura 27B). En los neonatos nacidos por parto vaginal, la estimulación con CD3+CD28 mostró una respuesta caracterizada principalmente por una mayor contribución de IL-2, acompañada de un incremento en el perfil Th2 y el innato. En contraste, la estimulación con CD3+flagelina mostró una distribución hacia los perfiles Th2 e innato.

En los neonatos nacidos por cesárea, el perfil obtenido después de la estimulación con CD3+CD28 se caracterizó principalmente por una marcada respuesta de tipo innato y

una pequeña contribución de los perfiles Th2 y de la citocina IL-2. La estimulación con CD3+flagelina produjo una distribución de casi todos los perfiles por igual; sin embargo, el promedio de la concentración de las citocinas de los perfiles fue menor que el descrito con el estímulo CD3+CD28.

En las células de adultos, la estimulación con CD3+CD28 produjo citocinas de los perfiles Th1 y citotóxicos, además de una elevada respuesta innata. Por su parte, tras la estimulación con CD3+flagelina mostró un perfil intermedio, con valores muy similares entre los perfiles Th1, Th2 e innato, aunque menor que el observado con CD3+CD28.

En conjunto, estos resultados evidencian que tanto la vía de nacimiento como la edad gestacional y el tipo de estímulo influyen en el perfil funcional de citocinas producido por los linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, el análisis de los perfiles funcionales no permite identificar cuáles son las citocinas individuales que contribuyen en mayor medida a las diferencias observadas entre los grupos. Por ello, a continuación, se presentan los valores relativos de la concentración de citocinas en neonatos nacidos a término por cesárea o parto vaginal y en neonatos prematuros. Para realizar esto, se calculó la razón de producción de cada citocina o molécula entre neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea, así como entre neonatos nacidos a término y prematuros. Este enfoque permitió identificar no solo la dirección y magnitud de los cambios, sino también clasificarlos en función de su abundancia relativa, destacando aquellas citocinas con mayor impacto biológico en la respuesta de los linfocitos T CD4⁺. De esta manera, fue posible establecer qué perfiles funcionales se encuentran preferentemente asociados a la vía de nacimiento, la edad gestacional o el tipo de estímulo. En la estimulación con CD3+CD28 (figura 28), las mayores diferencias fueron encontradas en linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal y correspondieron a IL-6, TNF- α , IL-13 e IL-17F, mientras que moléculas como IFN- γ , IL-10, IL-22, perforina y granzima B mostraron incrementos más moderados. Este perfil sugiere una activación robusta de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos de parto vaginal con producción de citocinas inflamatorias, Th2 y algunas moléculas efectoras citotóxicas. Por otro lado, hubo menos diferencias en la producción de citocinas como IL-8 e IL-4, por lo que es posible que, a pesar del modo de nacimiento, estas citocinas sean claves en la respuesta inmune neonatal.

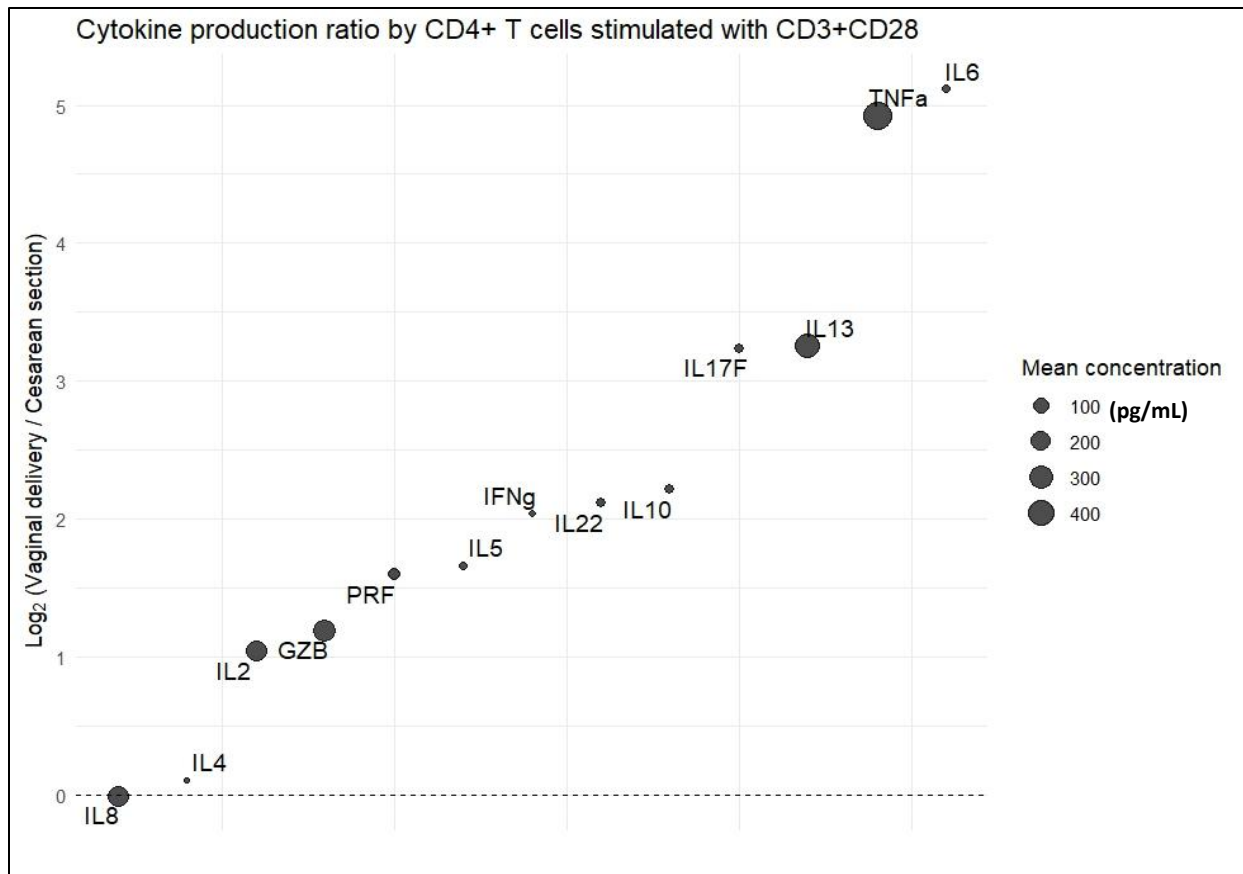


Figura 28. Producción relativa de citocinas de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos a término estimulados con CD3+CD28. Relación de producción de citocinas entre neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea, expresada como Log₂ (parto vaginal/cesárea), tras la estimulación de células T CD4⁺ con anticuerpos CD3+CD28. Cada punto representa una citocina o molécula efectora, y el tamaño de la burbuja indica la concentración media producida. Valores positivos indican una mayor producción en los neonatos nacidos por parto vaginal, mientras que valores cercanos a cero sugieren niveles similares entre ambos grupos.

Por el contrario, con CD3+flagelina (figura 29) las diferencias entre parto vaginal y cesárea aumentan notablemente para varias moléculas. Destacan especialmente IL-6 e IL-10, cuyos valores de razón fueron considerablemente superiores a los observados con CD3+CD28. Asimismo, IFN- γ , IL-17F y granzima B muestran incrementos más pronunciados, indicando que la señalización inducida por la flagelina potencia simultáneamente respuestas inflamatorias, reguladoras y efectoras. Sin embargo, el

promedio de la concentración es menor que la calculada con el estímulo CD3+CD28; esto sugiere que la señalización por la vía del TLR5 limita la cantidad de citocinas producidas. Además, la respuesta asociada a moléculas citotóxicas parece modificarse. La granzima B presenta una diferencia mucho mayor con CD3+flagelina que con CD3+CD28, mientras que la perforina parece no cambiar. Esto sugiere que la señalización desencadenada por la flagelina podría favorecer selectivamente algunos programas efectores relacionados con funciones citotóxicas.

Estos resultados sugieren que la exposición microbiana asociada al parto vaginal podría "preacondicionar" a los linfocitos T neonatales para responder con mayor intensidad a señales procedentes de microorganismos. Dado que la flagelina es un ligando de TLR5, las diferencias observadas podrían reflejar una mayor capacidad de cooperación entre señales del TCR y receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en los neonatos nacidos por vía vaginal.

Asimismo, se calculó la razón de producción relativa de citocinas y moléculas citotóxicas de neonatos de término y prematuros y se comparó entre ellos. En la figura 30 se observa la razón de producción de neonatos estimulados con CD3+CD28. Como se puede observar, los neonatos prematuros son aquellos que producen la mayor cantidad de citocinas y moléculas citotóxicas. Entre las principales están IL-13, IL-6 y TNF- α , esto nos sugiere que los neonatos prematuros mantienen una respuesta enfocada en la producción de citocinas claves para activar otras células como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, entre otros. Sin embargo, una desregulación de estas citocinas podría promover el desarrollo de diferentes condiciones en el sistema respiratorio, así como el desarrollo de alergias y un ambiente altamente proinflamatorio.

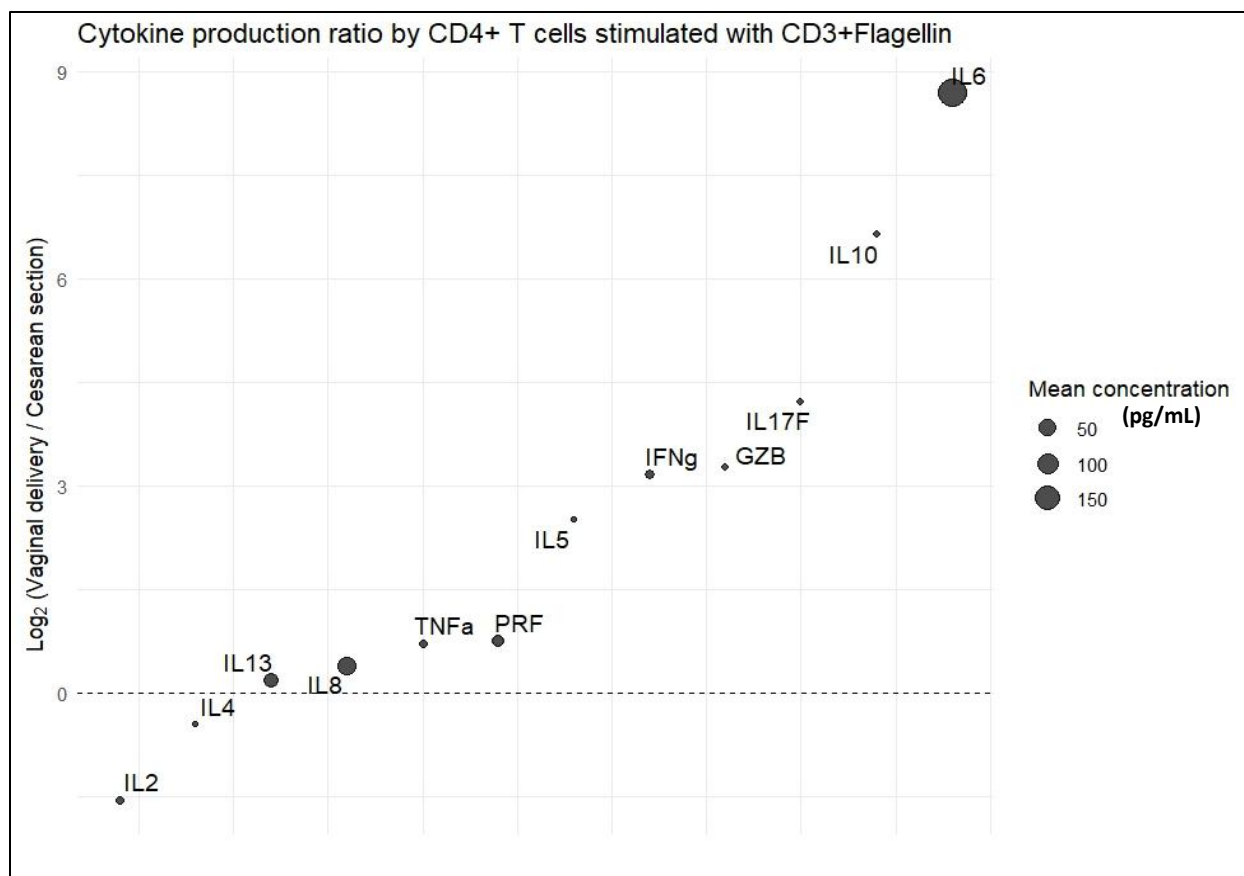


Figura 29. Producción relativa de citocinas de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos a término estimulados con CD3+Flagelina. Relación de producción de citocinas entre neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea, expresada como Log₂ (parto vaginal/cesárea), tras la estimulación de células T CD4⁺ con CD3+Flagelina. Cada punto representa una citocina o molécula, y el tamaño de la burbuja indica la concentración media producida. Valores positivos indican una mayor producción en los neonatos nacidos por parto vaginal, mientras que valores cercanos a cero sugieren niveles similares entre ambos grupos y valores negativos indican una mayor producción en el parto por cesárea.

Por otro lado, este perfil de citocinas cambia en cuanto a magnitud y concentración cuando las células son estimuladas con CD3+Flagelina (figura 31). Los valores de la razón de granzima B, IL-10 e IL-5 aumentaron con este estímulo y en este caso, parece haber un aumento en la concentración de IL-13. Este resultado nos ayuda a comprender que es posible que, antes de llegar a término, las células neonatales ya expresen el TLR-

5 y sean capaces de activar esta vía [30], [57], [92]. A pesar de esto, la alta producción de citocinas en comparación con las células de neonatos de término pudiera aportar al desarrollo de las patologías anteriormente descritas.

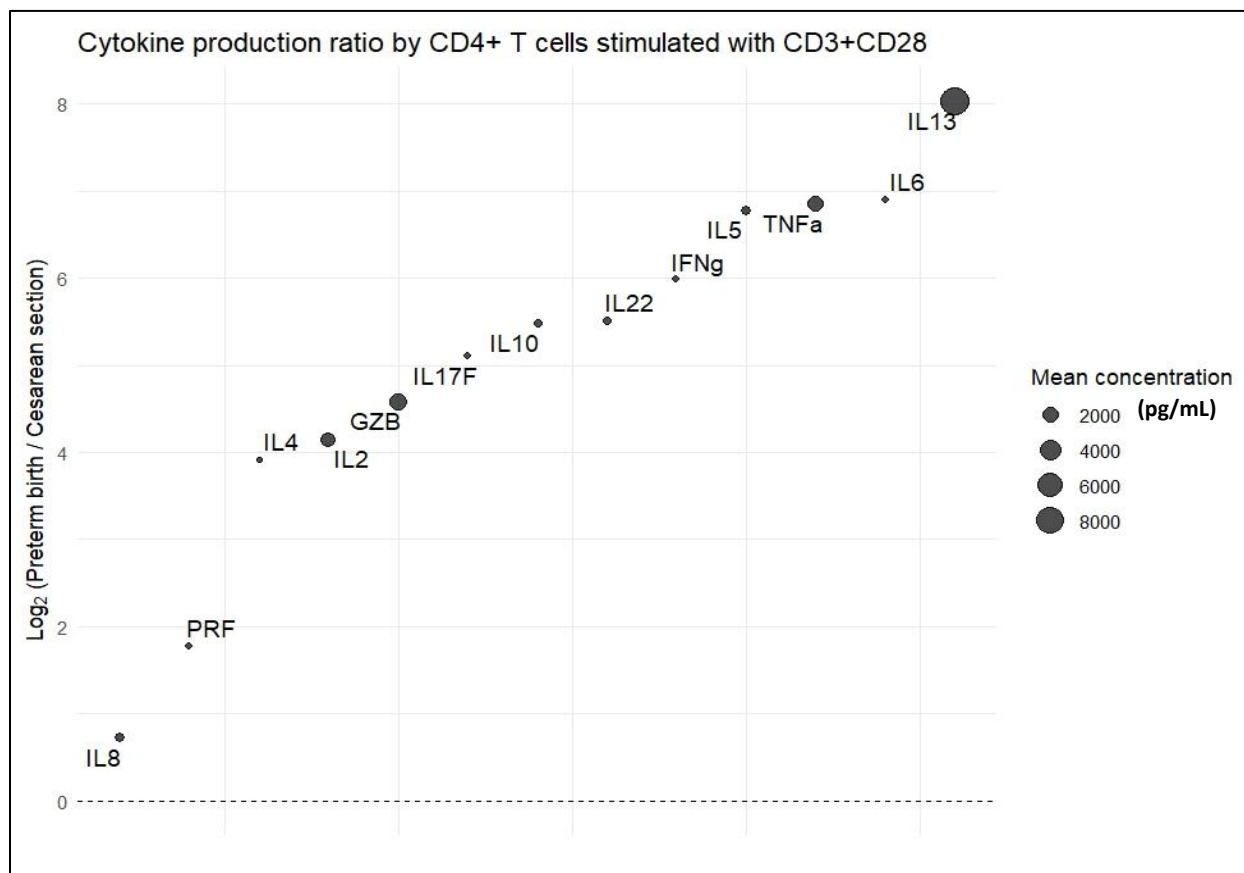


Figura 30. Producción relativa de citocinas por linfocitos T CD4⁺ de neonatos de término y prematuros estimulados con CD3+CD28. Relación de producción de citocinas entre neonatos nacidos a término y prematuros, expresada como Log₂ (prematuros/término), tras la estimulación de células T CD4⁺ con CD3+CD28. Cada punto representa una citocina o molécula, y el tamaño de la burbuja indica la concentración media producida. Valores positivos indican una mayor producción en los neonatos prematuros, mientras que valores cercanos a cero sugieren niveles similares entre ambos grupos y valores negativos indican una mayor producción en los neonatos de término.

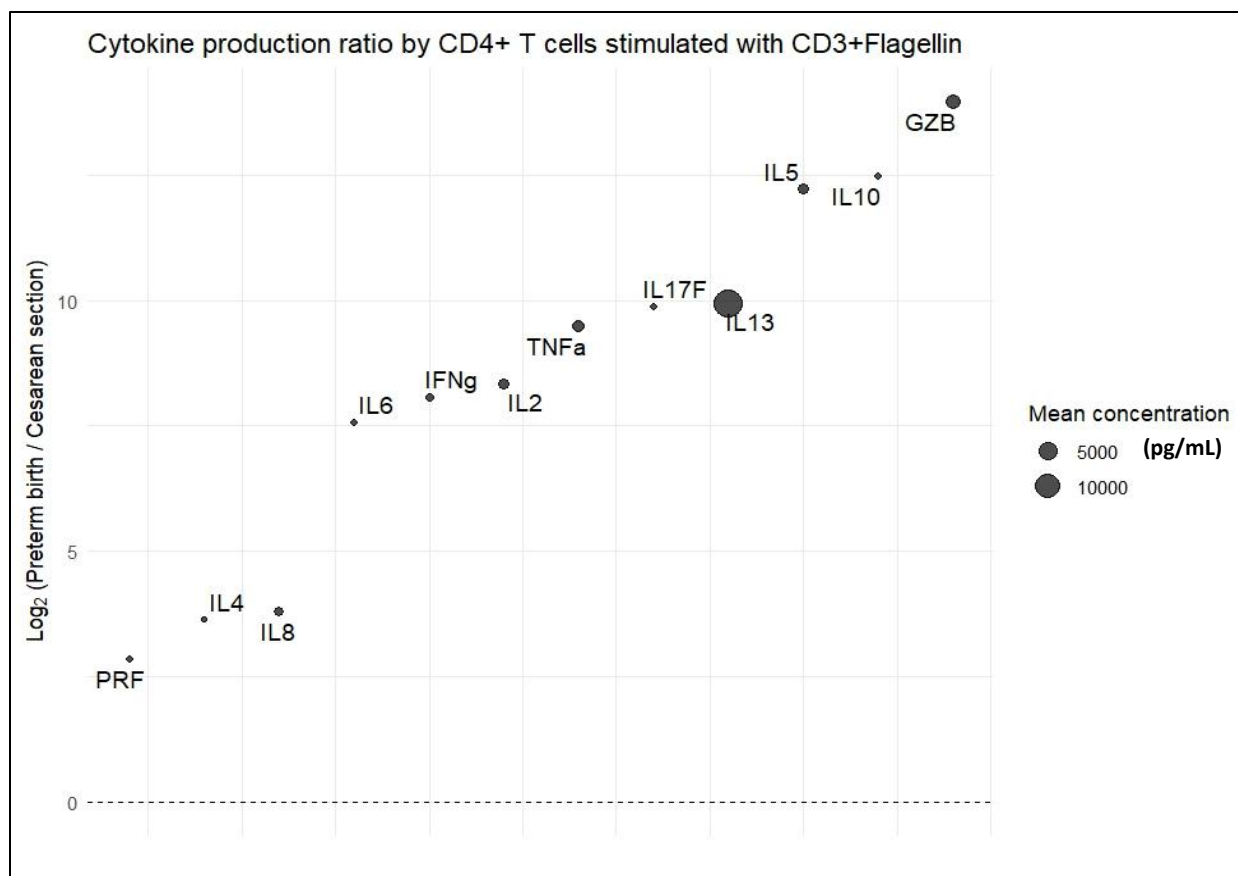


Figura 31. Producción relativa de citocinas por linfocitos T CD4⁺ de neonatos de término y prematuros estimulados con CD3+Flagelina. Relación de producción de citocinas entre neonatos nacidos a término y prematuros, expresada como Log₂ (prematuros/término), tras la estimulación de células T CD4⁺ con CD3+Flagelina. Cada punto representa una citocina o molécula, y el tamaño de la burbuja indica la concentración media producida. Valores positivos indican una mayor producción en los neonatos prematuros, mientras que valores cercanos a cero sugieren niveles similares entre ambos grupos y valores negativos indican una mayor producción en los neonatos de término.

5.1 Análisis de índice inmune en base a las citocinas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Con el objetivo de obtener una visión global de la capacidad funcional de las células inmunes en cada grupo de estudio, se calculó un índice inmune global a partir de las concentraciones de todas las citocinas y moléculas efectoras evaluadas. Este índice resume la magnitud de la respuesta inmunológica en un único valor, permitiendo

comparar de manera global el estado funcional de los neonatos nacidos por parto vaginal, cesárea, prematuros y adultos, tanto en condiciones basales como tras la estimulación mediante CD3+Flagelina o CD3+CD28. Este índice representa una medida integrada de la respuesta funcional de cada muestra, al considerar de manera conjunta la producción de todas las citocinas y moléculas efectoras evaluadas. Valores más altos del índice indican una mayor capacidad global de respuesta inmunológica, mientras que valores más bajos reflejan una menor respuesta relativa. Debido a que el índice se basa en datos normalizados, su interpretación es comparativa entre los grupos experimentales y no corresponde a una medida absoluta de la función inmunológica.

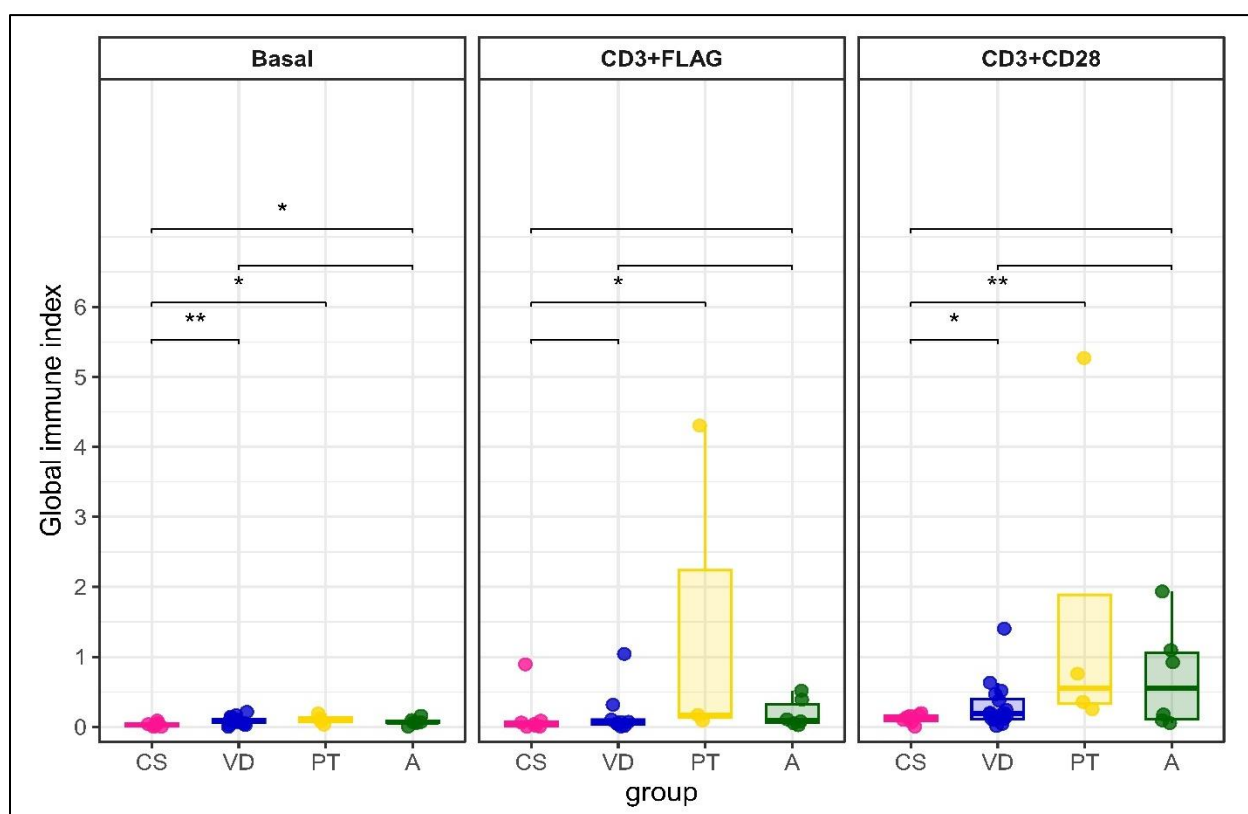


Figura 32. Índice inmune global de citocinas de linfocitos T CD4⁺. Se obtuvo el índice inmune global de los grupos de estudio en condiciones basales y tras la estimulación con CD3+Flagelina (CD3+FLAG) o CD3+CD28. Este fue calculado integrando las concentraciones de todas las citocinas y moléculas efectoras evaluadas mediante normalización por Z-score, desplazamiento a valores positivos y promediado por muestra. Se compararon neonatos nacidos por cesárea (CS), neonatos nacidos por parto vaginal (VD), neonatos prematuros (PT) y adultos (A). Las comparaciones entre grupos

se realizaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis con corrección para comparaciones múltiples, indicando los valores de p correspondientes.

En la imagen 32 se puede observar que, en estado basal, hay diferencias significativas entre neonatos nacidos por cesárea y por parto vaginal, así como entre prematuros. Sin embargo, este cambio fue mínimo. Tras la estimulación con CD3+Flagelina, el índice inmune global aumentó principalmente en los neonatos prematuros, quienes mostraron los valores más altos y una mayor variabilidad en la respuesta. Sin embargo, se detectó una diferencia significativa entre las células de neonatos nacidos a término por cesárea y prematuros, mientras que el resto de las comparaciones no alcanzó significancia estadística.

En respuesta a la estimulación con CD3+CD28, todos los grupos de linfocitos T CD4⁺ incrementaron su índice inmune global respecto a la condición basal. Los adultos y los neonatos prematuros presentaron las respuestas de mayor magnitud, mientras que los neonatos nacidos por cesárea mantuvieron los valores más bajos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre neonatos de término nacidos por cesárea o parto vaginal, así como entre neonatos de término y prematuros, mientras que las comparaciones con el grupo de adultos no alcanzaron significancia estadística.

Este mismo análisis fue realizado con los datos de linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, debido a la poca cantidad de muestras y diferencias significativas encontradas, no fue posible encontrar significancia estadística cuando se evaluó el índice inmune global de estas células (Figura 33).

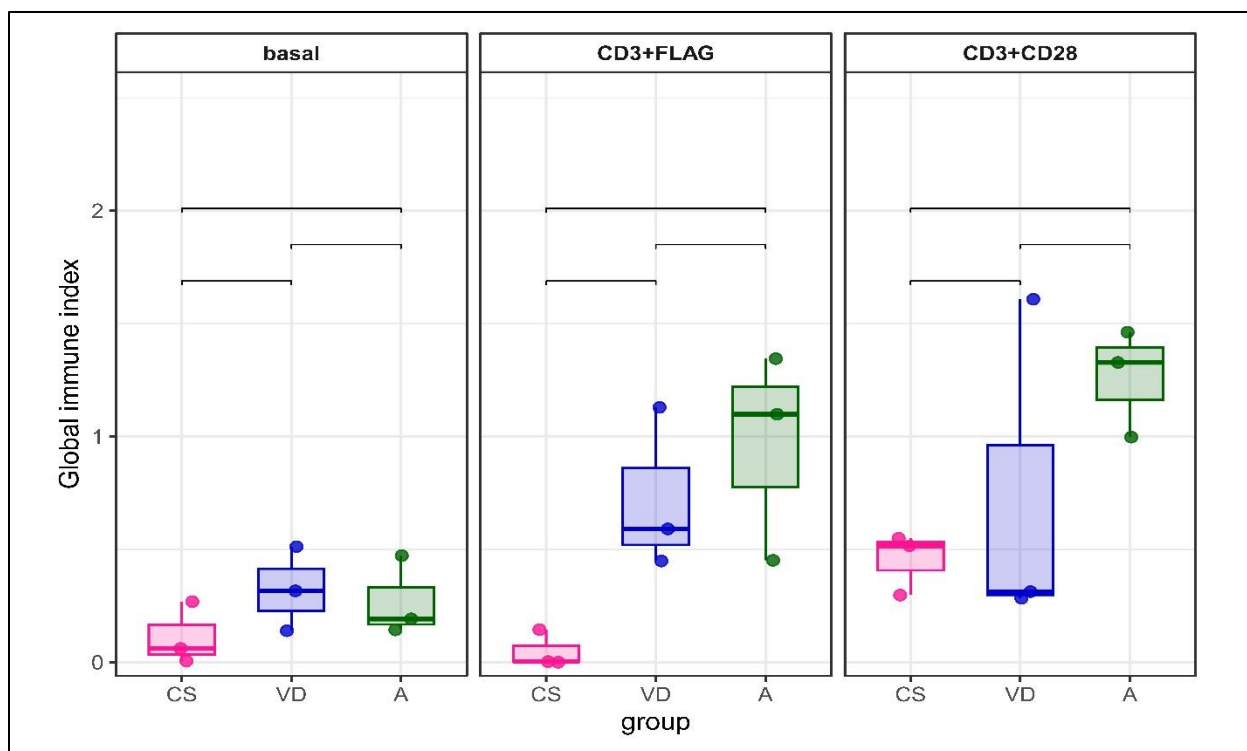


Figura 33. Índice inmune global de citocinas de linfocitos T CD8⁺. Se obtuvo el índice inmune global de los grupos de estudio en condiciones basales y tras la estimulación con CD3+Flagelina (CD3+FLAG) o CD3+CD28. Este fue calculado integrando las concentraciones de todas las citocinas y moléculas efectoras evaluadas mediante normalización por Z-score, desplazamiento a valores positivos y promediado por muestra. Se compararon neonatos nacidos por cesárea (CS), neonatos nacidos por parto vaginal (VD) y adultos (A). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis con corrección para comparaciones múltiples, indicando los valores de *p* correspondientes.

DISCUSIÓN

Los resultados aquí presentados nos muestran que la forma de nacimiento y la edad gestacional contribuyen a diferencias en la activación, proliferación y producción de citocinas de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de término nacidos por parto por cesárea o vaginal y prematuros. También logramos observar que la estimulación a través del TCR y el TLR-5 es capaz de promover la activación de los factores transcripcionales NF-κB y AP-1 y, además, los linfocitos mostraron un perfil de citocinas distinto al

observado con el estímulo CD3+CD28. En las figuras 33 y 34 se muestra el resumen de resultados de los experimentos realizados en células T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente.

En los experimentos de activación de factores transcripcionales se pudo observar que la estimulación a través de CD3+CD28 promueve la activación de p65 y cJun en linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos nacidos por parto vaginal. La ausencia de la activación temprana de NFATc1 en estas muestras puede influir en la expresión de IL-2 y su receptor y, por lo tanto, podría limitar la proliferación celular. Contrario a esto, en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos que nacieron por cesárea, a pesar de no tener valores significativos con respecto al control sin estimular, parece haber activación de este factor transcripcional, lo cual puede contribuir a la proliferación celular observada. Además, no podemos descartar que en las células donde no se detectó la activación de NFAT a los 15 min exista una dinámica de activación diferente. NFAT puede presentar oscilaciones de activación/traslación al núcleo seguidas por su inhibición, las cuales pueden ser muy rápidas en algunos casos [127]. Es necesario resaltar que, además de estos factores transcripcionales que regulan la proliferación, se han descrito otros más que pueden interaccionar y favorecerla, como en el caso de BCL11A y CEBPA, que se encontraron sobreexpresados en células neonatales [98]. Por otra parte, los linfocitos T de neonatos que expresaron p65 parecen tener un perfil más proinflamatorio en cuanto a las citocinas que produjeron. Los factores transcripcionales estudiados mostraron una activación distinta cuando los linfocitos T fueron estimulados con CD3+Flagelina, lo que sugiere una convergencia en la señalización del TCR y el TLR5.

Al comparar la actividad transcripcional de neonatos nacidos por parto vaginal con los nacidos por cesárea, se observó que las células de neonatos de parto vaginal tienen un perfil transcripcional relacionado con la activación (señalización de NF-κB, MAPK) y el metabolismo (glucólisis). Por el contrario, los neonatos nacidos por cesárea muestran un aumento en la actividad inhibitoria de la vía de NF-κB, así como en los genes de destino celular, los cuales podrían contribuir a una alteración de la vía del TCR y, por consiguiente, de las funciones efectoras [128].

De igual forma, fuimos capaces de medir la expresión de CD25 y CD69, los cuales juegan un papel muy importante en la activación de los linfocitos T. CD25 forma parte del

receptor de IL-2 y al medirlo en neonatos notamos que su expresión se mantenía hasta 72 horas después de iniciar la estimulación. Esto nos sugirió que las células neonatales son capaces de mantener expresado el receptor de IL-2 tardíamente, lo cual puede estar correlacionado con la elevada proliferación que observamos. Contrario a esto, los linfocitos T CD4⁺ de adultos expresaron significativamente un menor porcentaje de CD25 en comparación con los neonatos, por lo que esto podría contribuir a la disminuida proliferación mostrada, aunque no podemos descartar que esto se deba a que al tiempo medido para las células de adulto ya va disminuyendo su expresión (Anexos: figura 37). Por otra parte, el marcador CD69 tiene como principal función la retención de las células en los ganglios linfáticos o en el sitio de infección, es un marcador que se expresa tempranamente en el contexto de células adultas activadas. Sin embargo, lo que logramos observar en nuestros experimentos con neonatos es lo contrario a lo descrito en la literatura, las células neonatales expresaron tardíamente este marcador. Aun con esta expresión tardía, el porcentaje de células que lo expresaron es mayor al observado en adultos, por lo que es posible que este marcador tenga una cinética de activación característica en neonatos.

Dada la alta proliferación que presentaron los linfocitos T CD4⁺, nos enfocamos en conocer si esto estaría relacionado con una elevada producción de IL-2, IL-6, TNF- α o IL-8. Para ello, se realizó la cuantificación de citocinas de CBMC del perfil Th, innatas y moléculas citotóxicas. Para nuestra sorpresa, pudimos notar que en los sobrenadantes de las CBMC no había presencia de IL-2 con ambos estímulos. Observamos que al estimular con CD3+CD28 se produjo una gran cantidad de citocinas proinflamatorias como IL-17F, IL-8, IL-1 β , citocinas del fenotipo Th2 como IL-5, IL-6 e IL-13 y las moléculas citotóxicas granzima B y perforina, así como la citocina antiinflamatoria IL-10. Esto nos dio un panorama de las citocinas que producen los neonatos bajo una estimulación no específica por patógeno, y parece ser que se basa principalmente en montar una respuesta de tipo Th2 y en la producción de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas se enfocan en activar células de tipo innato como neutrófilos (IL-8), macrófagos y monocitos (IL-1 β), activar células epiteliales o endoteliales para promover la producción de moléculas como defensina (IL-17F) o inducir la diferenciación al fenotipo Th17 (IL-6). Sin embargo, también las CBMC son capaces de producir grandes cantidades de

granzima B y perforina, las cuales tienen capacidades citotóxicas y muy posiblemente sean parte del arsenal que tienen las CBMC para defender al huésped de patógenos. Es importante reconocer que la IL-6 juega un papel importante en la activación de los linfocitos T y algo que identificamos es que esta citocina aumenta con el estímulo CD3+Flagelina, llegando a tener un impacto en la proliferación y funciones de las células [129]. La vía de señalización de IL-6 activa proteínas clave de la división celular tales como gp130, STAT3 y MAPK, además, se ha visto que el tratamiento de un co-cultivo de células B y T con anti-IL-6 limita la proliferación celular [130]. Asimismo, otros factores que pueden apoyar la proliferación celular pueden ser: el ambiente altamente inflamatorio, las interacciones celulares y las características intrínsecas de la célula, como aquellas encontradas en la expresión diferencial de genes que contribuyen a la alta proliferación [119]. Una vez que logramos comprender el panorama de citocinas producidas por las CBMC, nos interesó saber cuál es el papel de las células T CD4⁺ individualmente en su capacidad de producción de citocinas. Para esto, vimos que diferentes citocinas son producidas dependiendo de la estimulación. Principalmente, con el estímulo CD3+CD28, los linfocitos T CD4⁺ de adultos mostraron la capacidad de producir 10 de las 13 citocinas que formaban parte del perfil T cooperador, a excepción de IL-9, IL-17A y TGF- β 1, además, también producen IL-8. Esto concuerda con lo descrito en la literatura sobre la respuesta típica de los adultos ante la estimulación con CD3+CD28 [131]. En contraste, los linfocitos neonatales parecen producir principalmente citocinas de los fenotipos Th2 (IL-13, IL-2, IL-5), Th17 (IL-17F), Treg (IL-10) y TNF- α . Sin embargo, hubo citocinas que se produjeron dependiendo de la forma del nacimiento, en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal: IL-4, IL-6, TNF- α y perforina. En linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea, notamos que estas mismas citocinas se producían muy poco, al grado de haber diferencias significativas entre neonatos de parto vaginal y cesárea. Debido a esto, las células de cesárea no produjeron IL-4 e IL-6 y llegaron a producir una menor cantidad de TNF- α , en comparación con las células de neonatos nacidos por parto vaginal. Con estos resultados podemos observar que los linfocitos de neonatos nacidos por cesárea parecen favorecer mucho la producción de citocinas de los fenotipos Th2 y Th17, y también parecen producir una cantidad aparentemente menor de IL-10 de la que producen las células de neonatos nacidos por

parto vaginal. Estos resultados nos sugieren que los linfocitos de neonatos que nacieron por cesárea tienen una capacidad limitada de producción de citocinas en comparación con los nacidos por parto vaginal. Sin embargo, sí muestran una alta capacidad proliferativa, por lo que es posible que su umbral de activación sea más bajo, pero con un programa transcripcional que favorece principalmente la producción de citocinas del perfil Th2 [132].

Posteriormente, al medir citocinas innatas y moléculas citotóxicas en las muestras purificadas, logramos identificar algo que nos pareció muy interesante: la producción de granzima B y perforina por parte de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, los cuales se pensaba que eran producidos típicamente por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos [59]. Sin embargo, se ha descrito recientemente la alta plasticidad de las células del sistema inmune adaptativo para producir niveles elevados de marcadores y otras moléculas, por ejemplo, las células Treg pueden desarrollar capacidades citotóxicas que ayudan a mantener la homeostasis del organismo [133], [134]. No se descarta la posibilidad de que las células T CD4⁺ desarrollen funciones citotóxicas que contribuyan a compensar la limitada actividad observada en las células T CD8⁺, por lo que resulta relevante profundizar en este fenómeno en estudios futuros.

Finalmente, el perfil de citocinas cambió cuando las células fueron estimuladas con CD3+Flagelina, pudimos observar que en adultos se favoreció la producción de citocinas del fenotipo Th1, mientras que en las células neonatales se favoreció la producción de citocinas del fenotipo Th2. Sin embargo, a pesar de la estimulación con flagelina, los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea produjeron IL-13, por lo que pudiera ser un poco más complicado inducir la expresión de IFN- γ con tan marcada producción de citocinas del fenotipo Th2. La señalización a través de flagelina favoreció también la proliferación celular de las CBMC, sin embargo, en este conjunto de células también tenemos células del linaje mieloide que también expresan el TLR-5 y que podrían estar contribuyendo a generar el ambiente inflamatorio ideal para que ocurra este proceso [12]. Cabe aclarar que este estímulo generó una aparente disminución de la producción de IL-13, la cual podría contribuir al mantenimiento del sesgo hacia el fenotipo Th2.

Ciertamente, la flagelina cumplió un papel importante en el desarrollo de este proyecto, ya que ha sido posible observar la capacidad que tienen las células neonatales de reconocer esta proteína y establecer una respuesta diferente a la observada con el estímulo CD3+CD28. Es importante destacar que, si bien no está promoviendo la producción de IFN- γ , sí está generando diferencias en la producción de citocinas del perfil Th2 y más aún, se observa una tendencia de aumento de granzima B y perforina.

Por otro lado, y centrándonos ahora en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos de término, encontramos diferencias en la activación de los factores transcripcionales cuando se estimularon con CD3+CD28. En los adultos solo se observó la activación temprana de p65, mientras que en los neonatos de término nacidos por parto por cesárea se observó que aumentó NFATc1. En contraste, cuando las células fueron estimuladas con CD3+Flagelina, los linfocitos de adultos y neonatos de término y prematuros activaron p65. Los resultados sugieren que este factor transcripcional tiene mucha relevancia en la respuesta temprana de los linfocitos T neonatales, ya que puede ser activado por diferentes vías (CD28 o TLR5) e incluso se eleva su activación con TLR5 [31]. Las diferencias observadas en la activación de los factores transcripcionales, en especial AP-1 y NFATc1, sugieren también posibles limitaciones en la señalización río abajo del TCR que se han demostrado antes en linfocitos neonatales [33], [135], [136], [137]. Por otro lado, al evaluar la proliferación celular, logramos observar una respuesta muy similar a la de los linfocitos T CD4⁺. Además, identificamos características similares en la expresión de CD25 y CD69. Por un lado, las células proliferaron con el estímulo CD3+CD28 y aumentaron cuando estuvieron en presencia de Flagelina. Es posible que las células T compartan ciertas características intrínsecas entre ellas, las cuales pueden estar influenciadas por el metabolismo y el perfil transcripcional de la célula.

En otro aspecto, con los datos que se tienen hasta el momento de linfocitos T CD8⁺ neonatales, pudimos observar que tienen una capacidad muy reducida de producir citocinas. Esto podría estar relacionado con características intrínsecas de las células neonatales, las cuales han sido descritas con propiedades citotóxicas de tipo innato y diferencias funcionales con respecto a las células de adultos [30], [57], [88], [119], [125]. Estos últimos sí realizaron una producción considerable de IFN- γ y TNF- α con ambos

estímulos, mientras que en neonatos solo fue posible cuantificar IL-2 con ambos estímulos. Con estos datos obtenidos, aportamos más evidencia sobre la baja capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ neonatales, ya que no fueron capaces de producir granzima y perforina durante el tiempo que fueron estimulados. Sin embargo, como se ha mencionado, estas células tienen una ventana de entrenamiento que debe ocurrir en los días siguientes al nacimiento y, con ayuda de la vacunación, la nutrición y el ambiente, generarán una respuesta más robusta que será la que finalmente ayude a la protección del infante [126], [138]. A pesar de esto, los neonatos no se encuentran totalmente desprotegidos, ya que, como logramos observar, las células T CD4⁺ juegan un papel muy importante en el que la plasticidad para producir un gran número de citocinas y moléculas citotóxicas brinda protección al neonato.

Enfocándonos en las diferencias con respecto a la edad gestacional, encontramos diferencias en la activación de los factores transcripcionales de linfocitos T CD4⁺ de neonatos prematuros. Una de ellas, y la más evidente, fue la baja intensidad media de fluorescencia que tuvo en comparación con las demás muestras. Sin embargo, también logramos identificar que el estímulo CD3+CD28 indujo principalmente la activación de NF-κB y AP-1, mientras que el estímulo CD3+Flagelina elevó la activación de ambos factores transcripcionales. Por otro lado, es posible que las células de neonatos prematuros ya tuvieran un programa de activación previo ocasionado por la interrupción del embarazo y una acumulación de factores proinflamatorios [75], [76], [120]. Cuando analizamos la actividad transcripcional inferida de neonatos de término y prematuros logramos observar que estos últimos tienen activos factores transcripcionales relacionados con el desarrollo, crecimiento y proliferación, lo cual correlaciona con la alta capacidad proliferativa observada. Sin embargo, algo que nos causó interés fueron los niveles elevados de factores transcripcionales que están involucrados en mantener el estado naïve o regulador en las células de neonatos de término. A su vez, los factores transcripcionales obtenidos de las comparaciones nos indican que un grupo de estos factores se encuentra activo mientras que el otro no. Dicho esto, podemos inferir que los neonatos prematuros mantienen un estado menos regulado y más orientado hacia la activación y la proliferación celular, regulando positivamente genes de proliferación y de activación, lo cual se relaciona con la alta capacidad de estas células para activarse,

proliferar y producir la gran variedad de citocinas proinflamatorias evaluadas en este proyecto. Por otro lado, los neonatos nacidos a término por cesárea presentaron una inhibición relativa de vías asociadas con MAPK, lo que podría afectar el “entrenamiento” funcional de los linfocitos T CD4⁺ que posiblemente ocurre en neonatos nacidos por parto vaginal.

Por otra parte, en el estudio de la proliferación de los linfocitos T en las CBMCs pudimos observar que los neonatos prematuros mantienen un estado de alta proliferación con el estímulo CD3/Flagelina en comparación con los neonatos de término. Este efecto puede deberse también a la interrupción del desarrollo del feto y a que estas células son una pieza clave en el establecimiento del sistema inmune adaptativo [75]. Cabe recalcar que, al ser un parto prematuro, se promueve un ambiente altamente inflamatorio en el útero materno, lo cual puede provocar una pre-exposición [78]. Aun así, no se descarta la posibilidad de que hubiera administración de corticosteroides en la madre para disminuir los síntomas inflamatorios. Sin embargo, si fuera así, estos parecen no afectar la activación de los linfocitos neonatales, ya que, en el estudio de transcriptoma realizado por la Dra. Linda Kempis, los datos de prematuros y neonatos de término nacidos por cesárea clusterizan juntos y las células de prematuros mostraron una alta producción de citocinas proinflamatorias y proliferación celular.

Además, cuando se estimula con flagelina, otras células podrían estar reconociendo esta proteína y responder con la producción de citocinas que pueden contribuir a la proliferación celular, como lo es la IL-6 o IL-1 β . Sin embargo, para estar más seguros de esto, decidimos cuantificar los sobrenadantes de las CBMC que fueron estimuladas con CD3+CD28 o CD3+Flagelina. Al igual que las células de neonatos de término, las células de neonatos prematuros parecen producir el mismo perfil de citocinas, pero con concentraciones mucho mayores. La estimulación con CD3+CD28 promovió la producción de un amplio repertorio de citocinas, caracterizado por niveles elevados de citocinas proinflamatorias (IL-17F, IL-8 e IL-1 β), citocinas asociadas con respuestas Th2 (IL-5, IL-6 e IL-13), así como de las moléculas citotóxicas granzima B y perforina y la citocina reguladora IL-10. Este perfil se conservó tras la estimulación con CD3+Flagelina, aunque en los neonatos prematuros se observó un incremento significativo en la

producción de varias de estas moléculas, particularmente IL-5, IL-6, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN- γ , IL-10, granzima B y perforina. Estos hallazgos sugieren que la señalización inducida por flagelina puede contribuir a la capacidad funcional de las células inmunes neonatales, amplificando tanto la producción de mediadores proinflamatorios como reguladores y citotóxicos [30], [139]. Cabe destacar la alta sensibilidad de las células de neonatos prematuros al responder de una forma intensa cuando entran en contacto con moléculas bacterianas, reflejando así que su respuesta ante patógenos suele ser tan exacerbada que les genera más problemas que beneficios. Entre estos problemas están la enterocolitis necrotizante y la sepsis, ambas son enfermedades en donde el sistema inmunológico promueve un estado inflamatorio que, en el caso de los prematuros, se exagera y contribuye a la elevada mortalidad observada [61], [111], [112]. Con la presencia de la Flagelina, pudimos observar que las CBMC de neonatos nacidos a término y prematuros aumentaban significativamente la producción de IL-6 cuando se comparaban con el estímulo CD3+CD28. Sin embargo, no se observó un aumento en la producción de IL-2, por lo que es posible que el conjunto de citocinas proinflamatorias, particularmente IL-6, haya contribuido al mantenimiento de la alta proliferación observada. En un estudio reciente en nuestro laboratorio se describió el papel que tiene la IL-6 sobre la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales. Logramos identificar que esta citocina es capaz de aumentar el volumen y la granularidad de los linfocitos y, además, su producción es promovida cuando las células son estimuladas con CD3+Flagelina. Por lo tanto, esto nos sugiere que las células neonatales son capaces de reconocer el microambiente inflamatorio e inducir respuestas efectoras [115], [129].

Al igual que las células de neonatos de término, se cuantificaron las citocinas de las células T CD4⁺ purificadas, sin embargo, dada la alta dispersión de los datos y el número de muestras, muchos datos solo fueron tendencias. A pesar de esto, sí se logró observar muy marcadamente que las células de prematuros mostraron una alta producción de las citocinas IL-2, IL-13 y TNF- α . Lo anterior puede estar relacionado con el mismo parto prematuro, ya que se ha visto que un aumento en la cantidad de TNF- α puede llegar a provocar daño endotelial en el útero de la madre o en las membranas de la placenta [75], [83]. Durante un embarazo saludable, la IL-2 ayuda a mantener la tolerancia mientras que la IL-13 contribuye a la maduración pulmonar. Sin embargo, en neonatos prematuros

que producen niveles elevados de IL-2, esta contribuye a un aumento excesivo en la proliferación celular y la IL-13 puede inducir displasia broncopulmonar en el recién nacido [75].

Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos prematuros mostraron una baja activación de NF-κB, AP-1 y NFATc1; fue el estímulo con CD3+Flagelina el que indujo un aumento en la activación de p65. Estos resultados nos muestran que, al tiempo que se midieron estos factores, no se promovió su activación, puede ser que tengan una cinética distinta a la descrita en linfocitos T CD4⁺. Aun así, logramos identificar diferencias en la cantidad de IMF medido, los neonatos de término nacidos por parto por cesárea mantuvieron niveles de fosforilación más altos que los prematuros y eso fue evidente en los tres factores transcripcionales. Esto nos sugiere que las células T CD8⁺ neonatales mantienen un programa de activación característico antes de nacer. De esta manera, es posible que la actividad de los linfocitos T CD4⁺ contribuya en gran medida a la respuesta inmune. Asimismo, al evaluar la proliferación celular de los linfocitos T CD8⁺ de prematuros, encontramos que estos tenían una elevada proliferación celular con ambos estímulos. Pensamos que, al igual que las células T CD4⁺, el trabajo de parto prematuro tiene un efecto directo en la respuesta mostrada por estas células. Finalmente, no se contó con muestras para realizar la purificación de linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, analizando los datos obtenidos de transcriptoma, es posible que estas células tampoco muestren una gran capacidad de producción de citocinas, pero esto es algo que debe comprobarse en trabajos futuros.

Con el propósito de integrar la información obtenida de las diferentes citocinas y moléculas efectoras analizadas, se generó un índice inmune global que permitió evaluar de manera conjunta la capacidad funcional de las células T en los distintos grupos de estudio. Este enfoque ofrece la ventaja de resumir la respuesta inmunológica, evitando que la interpretación dependa únicamente de cambios individuales en cada citocina y de esta forma tener un paisaje más representativo del estado funcional de las células.

En condiciones basales, los neonatos nacidos por cesárea presentaron un índice inmune significativamente menor que los neonatos nacidos por parto vaginal, los prematuros y los adultos. Este hallazgo es consistente con la evidencia que indica que la ausencia de

exposición al trabajo de parto durante el nacimiento puede retrasar la activación del sistema inmune neonatal. El proceso de parto es un importante estímulo inflamatorio controlado que favorece la activación de mecanismos de inmunidad innata y adaptativa, promoviendo un estado de mayor preparación inmunológica inmediatamente después del nacimiento [76]. En contraste, los neonatos nacidos por cesárea experimentan una menor exposición a estas señales inmunológicas, lo que podría traducirse en una menor capacidad funcional basal de sus células inmunes.

Después de la estimulación mediante CD3+Flagelina, los neonatos prematuros mostraron los valores más elevados del índice inmune global, aunque únicamente la comparación con los neonatos nacidos por cesárea alcanzó significancia estadística. Este resultado respalda los análisis individuales de citocinas y de factores transcripcionales presentados en este trabajo, donde las células T de los prematuros presentaron una mayor activación de NF- κ B y AP-1, así como una mayor producción de citocinas inflamatorias. Lejos de representar una respuesta inmune deficiente, estos datos sugieren que las células T de los prematuros podrían encontrarse en un estado de activación basal o "preactivación", posiblemente como consecuencia de la exposición intrauterina a procesos inflamatorios asociados con el parto prematuro [120]. Diversos estudios han propuesto que la inflamación fetal, la corioamnionitis y otras complicaciones obstétricas pueden inducir una programación inmunológica temprana que incrementa la capacidad de respuesta de las células inmunes frente a estímulos posteriores [83], [120], [140].

La estimulación con CD3+CD28 produjo el mayor incremento del índice inmune global en todos los grupos. Sin embargo, nuevamente los neonatos nacidos por cesárea presentaron una respuesta inferior respecto a los neonatos de parto vaginal y a los prematuros, lo que sugiere que las diferencias observadas no dependen solo de la activación de receptores de reconocimiento de patrones, sino que reflejan características intrínsecas de las células T asociadas con el tipo de nacimiento. Estos resultados coinciden con estudios que describen una menor capacidad funcional de las células inmunes de neonatos nacidos por cesárea durante los primeros días de vida, atribuida

tanto a diferencias en la colonización microbiana como a modificaciones epigenéticas inducidas por el entorno perinatal [100], [108], [141].

Es importante destacar que, aunque el índice inmune global nos ayuda con la integración de múltiples parámetros inmunológicos en una sola variable, no sustituye el análisis individual de cada citocina o molécula efectora. En cambio, ambos enfoques son complementarios. Mientras el análisis individual permite identificar qué mediadores contribuyen a las diferencias observadas, el índice global evidencia que, en conjunto, la respuesta inmunológica de los neonatos prematuros y de los nacidos por parto vaginal es funcionalmente superior a la de los neonatos nacidos por cesárea. En conjunto, estos resultados fortalecen la hipótesis central de este trabajo de que tanto la edad gestacional como la vía de nacimiento modulan de manera importante la programación funcional temprana de las células T humanas, condicionando su capacidad de responder ante estímulos inmunológicos durante el periodo neonatal.

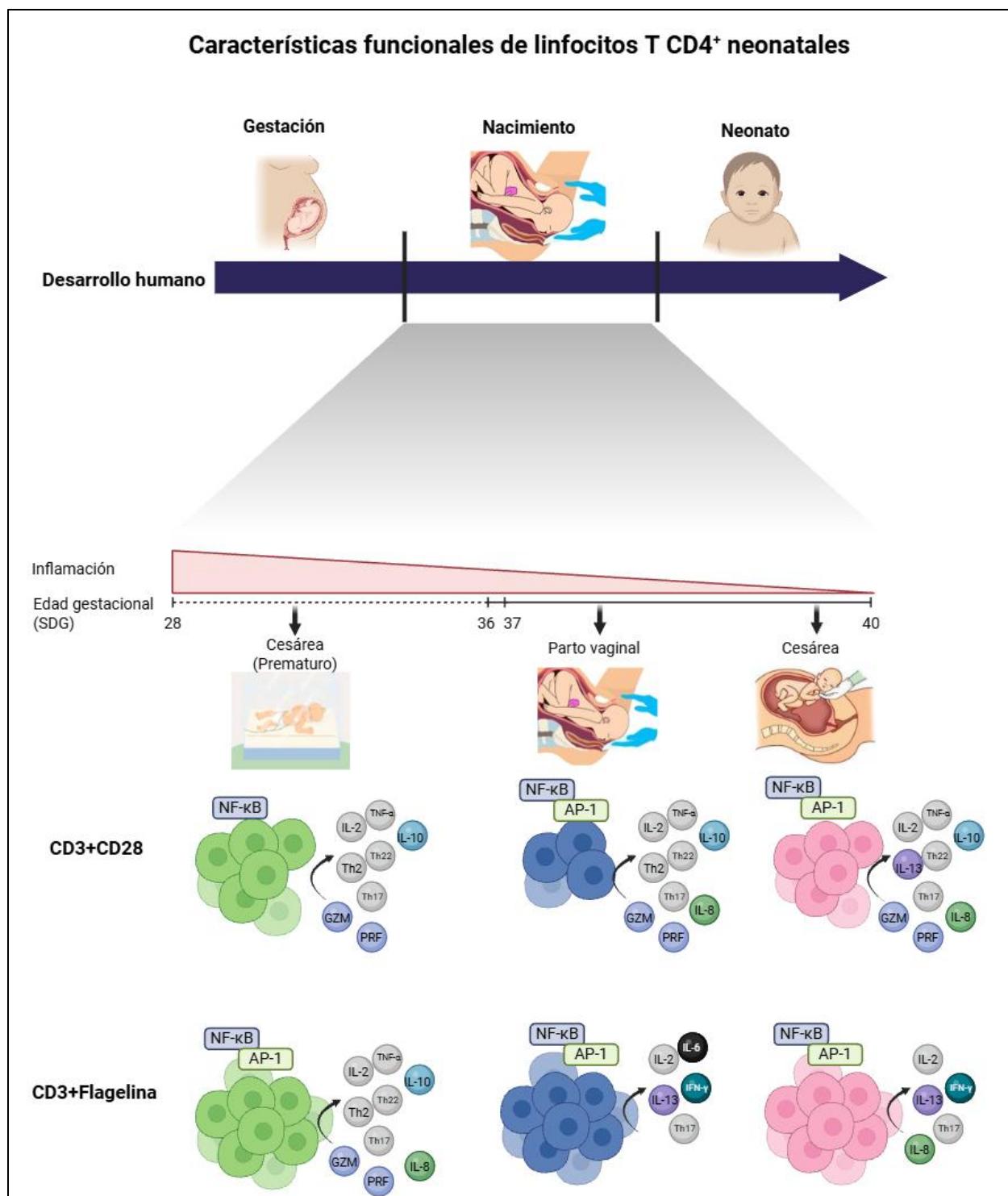


Figura 34. Resumen de las características funcionales de linfocitos T CD4⁺ neonatales. Se muestran los principales resultados de los experimentos in vitro realizados a lo largo de esta tesis en linfocitos T CD4⁺ neonatales.

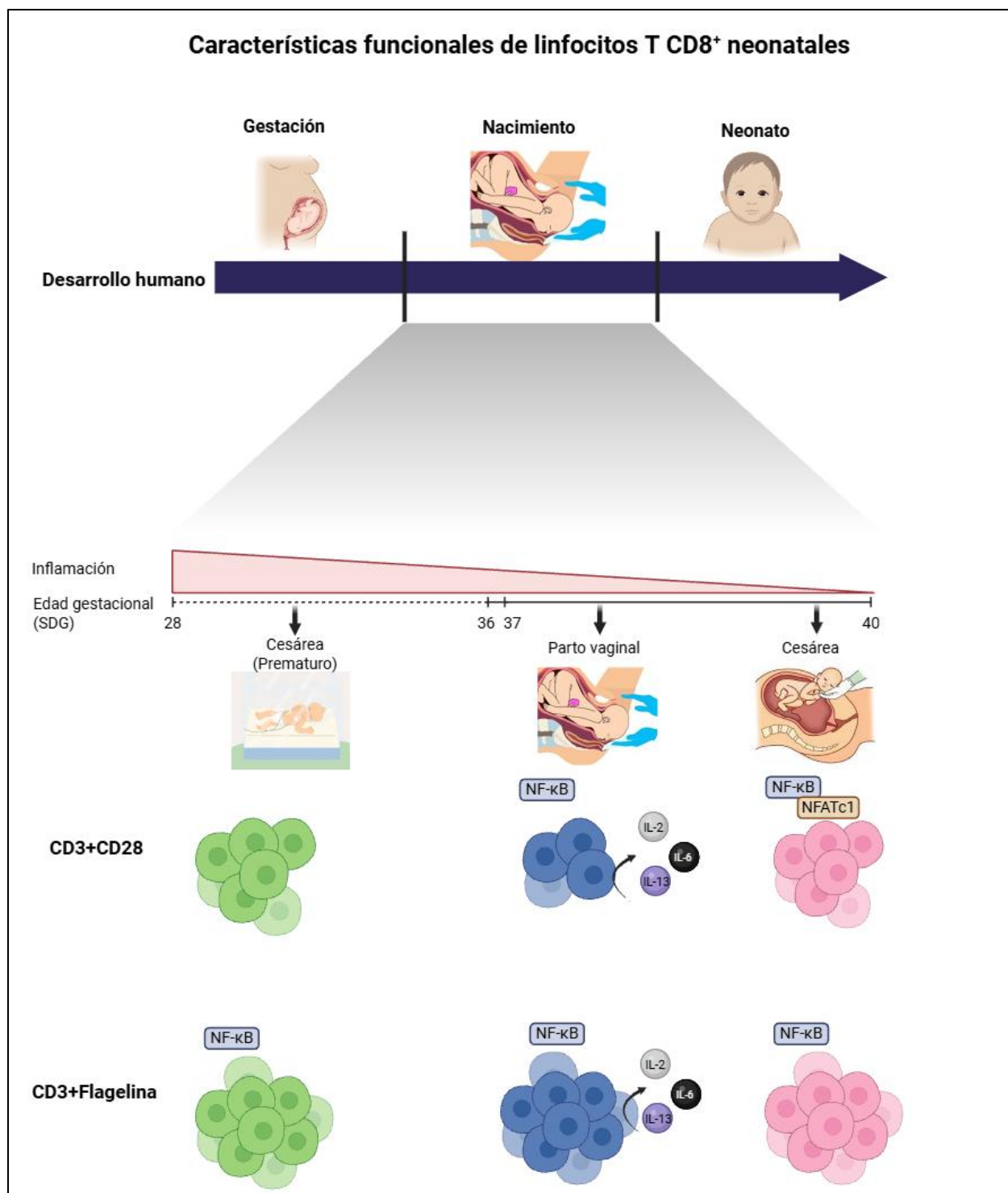


Figura 35. Resumen de las características funcionales de linfocitos T CD8⁺ neonatales. Se muestran los principales resultados de los experimentos in vitro realizados a lo largo de esta tesis en linfocitos T CD8⁺ neonatales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la edad gestacional y el modo de nacimiento influyen en la funcionalidad de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ neonatales. Mediante el análisis de la activación de los factores transcripcionales NFAT, NF- κ B y AP-1, así como de la producción de citocinas y la proliferación celular, se identificaron diferencias entre neonatos de término y pretérmino, así como entre aquellos nacidos por parto vaginal o cesárea. En conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis planteada y evidencian que las condiciones que rodean al nacimiento contribuyen a modular la respuesta inmunológica neonatal desde etapas muy tempranas de la vida.

Los análisis transcriptómicos y funcionales sugieren que el desarrollo fetal está acompañado por una programación progresiva de los linfocitos T que determina su capacidad de respuesta frente a estímulos inmunológicos. Cuando este proceso se interrumpe por un nacimiento prematuro, se observan alteraciones en la activación celular asociadas con una respuesta inflamatoria más intensa y aparentemente desregulada. En contraste, los neonatos nacidos a término, en especial aquellos nacidos por parto vaginal, mostraron perfiles funcionales compatibles con una regulación más equilibrada de la respuesta inmunitaria.

Asimismo, se observó que los neonatos nacidos por parto vaginal presentan una activación más robusta de los linfocitos T en comparación con aquellos nacidos por cesárea. Este fenómeno estuvo asociado con cambios en la activación de factores transcripcionales clave y con una mayor capacidad para producir citocinas. Estos resultados sugieren que los eventos fisiológicos relacionados con el trabajo de parto podrían participar en la preparación inmunológica necesaria para la transición hacia la vida extrauterina, un proceso que denominamos “activación inmune asociada al parto vaginal”, concepto propuesto a partir de los resultados obtenidos.

Por otra parte, demostramos que los linfocitos T neonatales no solo responden a la activación convencional mediada por TCR/CD28, sino que también son capaces de responder a la flagelina mediante la activación conjunta de las vías TCR/TLR5. La activación de estas vías fue capaz de modificar la activación de factores transcripcionales, la producción de citocinas y potenciar la proliferación celular, lo que

indica que los linfocitos T neonatales poseen mecanismos adicionales para modular su respuesta inmunológica. Estos hallazgos resaltan la importancia de las señales derivadas de los receptores de reconocimiento de patrones durante el periodo neonatal y sugieren que la interacción entre las vías TCR y TLR5 podría contribuir a la adaptación temprana frente a los microorganismos presentes después del nacimiento.

En conjunto, este trabajo aporta evidencia de que la edad gestacional, el modo de nacimiento y la naturaleza del estímulo recibido por los linfocitos T influyen en la activación de programas transcripcionales y funcionales que determinan la respuesta inmunológica neonatal. Se identificó el parto vaginal como un factor clave asociado con un perfil transcriptómico de “activación inmune” y con una mayor respuesta de activación de los linfocitos T neonatales, a diferencia del parto por cesárea, que se asoció con una respuesta más limitada. Además, los resultados obtenidos permiten proponer posibles mecanismos involucrados en la elevada inflamación observada en los neonatos pretérmino y sugieren que mediadores como TNF- α , IL-6 e IL-13 podrían representar potenciales blancos para futuras estrategias de intervención dirigidas a favorecer una respuesta inmunitaria más equilibrada durante las primeras etapas de la vida.

ANEXOS:

1. Tablas de función de factores transcripcionales activos en muestras de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos a término por parto vaginal o cesárea y prematuros.

Tabla 3. Función de factores transcripcionales descritos en el análisis comparativo de linfocitos T CD4 ⁺	
Neonatos nacidos a término por cesárea.	
Factor transcripcional	Función
TET1	Participa en la desmetilación del ADN y en la regulación epigenética, lo cual es importante para la diferenciación celular.

NAB2	Correpresor que se une a EGR1; regula proliferación, remodelación tisular y diferenciación.
BRD4	Controla la elongación de la transcripción, expresión de genes de proliferación e inflamación.
ZBTB17 (MIZ1)	Regula el ciclo celular, la supervivencia y la diferenciación linfocítica; interactúa con MYC.
IKZF1 (IKAROS)	Regulador maestro del desarrollo de células T y B; controla maduración, selección y función linfocitaria.
NOTCH1	Receptor clave en decisiones de destino celular
FOXO3	Regula apoptosis, estrés oxidativo y longevidad celular; modula tolerancia e inmunorregulación.
NFAT5 (TonEBP)	Regula genes en condiciones de estrés osmótico y también participa en la activación de linfocitos.
ZNF148 (ZBP-89)	Modula proliferación, apoptosis y diferenciación en varios tejidos.
Neonatos nacidos prematuramente	
ZBTB14	Represor transcripcional que controla la proliferación y diferenciación
TFAM	Activa y mantiene la transcripción del ADN mitocondrial
DAXX	Represor y remodelador de la cromatina, regula apoptosis y organización nuclear
Neonatos nacidos a término por parto vaginal.	
STAT1	Activa genes inducidos por interferones, apoya la respuesta antiviral e inflamatoria
SP1	Regula genes basales y de crecimiento
ETS1	Controla desarrollo y función de linfocitos T, B y NK; regula genes de activación y citotoxicidad
JUN	Forma parte de AP-1, regula proliferación, activación celular y respuesta al estrés
RELA (p65)	Subunidad activadora de NF-κB

REL (c-Rel)	Miembro de NF-κB, esencial para la proliferación y activación de linfocitos T y B
NFKB1	Subunidad de NF-κB, modula la inflamación y puede activar o reprimir según sea el dímero
NFYA	Subunidad del complejo NF-Y; regula genes con caja CCAAT, principalmente de ciclo celular y metabolismo.
NFYB	Subunidad del complejo NF-Y; necesaria para la unión del complejo al ADN y la regulación de genes basales.
IRF1	Induce genes antivirales e inmunitarios; regulado por interferones y TLRs
MYC (c-Myc)	Promueve crecimiento, proliferación celular y reprogramación metabólica.

Tabla 3. Factores transcripcionales activos en linfocitos T CD4⁺ de neonatos prematuros y de término. Descripción de la función de los factores transcripcionales activos en muestras de neonatos prematuros y de término.

Tabla 4. Función de factores transcripcionales descritos en el análisis comparativo de linfocitos T CD8⁺		
Factor transcripcional	Función principal	Relevancia inmunológica / en células T
Neonatos nacidos a término por cesárea		
KMT2A (MLL1)	Cataliza la metilación de H3K4, promoviendo un estado de cromatina activa y la expresión génica.	Regula los programas de diferenciación y la memoria de los linfocitos T mediante mecanismos epigenéticos.
TWIST2	Regula la diferenciación celular y reprime genes proinflamatorios.	Actúa como regulador negativo de la inflamación, limitando la producción de citocinas inducidas por NF-κB.
TET1	Participa en la desmetilación del ADN y en la regulación epigenética de la expresión génica.	Contribuye al establecimiento de programas de diferenciación y plasticidad de linfocitos T.
NFAT5 (TonEBP)	Responde al estrés osmótico y regula genes relacionados con la supervivencia celular.	Favorece la proliferación, supervivencia y producción de citocinas durante la activación de células T.

MEF2D	Regula genes asociados con diferenciación, supervivencia y metabolismo celular.	Coopera con NFAT para controlar la expresión de IL-2 y otros genes inducidos por el TCR.
BRCA1	Participa en la reparación del ADN y mantenimiento de la estabilidad genómica.	Favorece la supervivencia y proliferación de linfocitos durante respuestas inmunes intensas.
DMAP1	Interactúa con DNMT1 y complejos represores para controlar la metilación del ADN y la remodelación de cromatina.	Modula programas de expresión génica durante la diferenciación celular.
GRHL3 (Grainyhead-like 3)	Regula diferenciación epitelial y reparación tisular.	Aunque su función principal no es inmunológica, participa indirectamente en procesos inflamatorios y de regeneración.
ZNF148 (ZBP-89)	Activa o reprime la transcripción dependiendo del contexto celular.	Regula proliferación celular y puede modular genes relacionados con respuestas inflamatorias.
FOXO3	Controla apoptosis, metabolismo, estrés oxidativo y homeostasis celular.	Mantiene la quiescencia de linfocitos T y limita respuestas inflamatorias excesivas, favoreciendo la tolerancia inmunológica.
E2F3	Regula la transición G1/S del ciclo celular y la proliferación.	Promueve la expansión clonal de linfocitos tras la activación antigénica.
ZBTB17 (MIZ-1)	Regula proliferación, diferenciación y arresto del ciclo celular.	Participa en el desarrollo de linfocitos y en la regulación de genes relacionados con la supervivencia celular.
RELA (p65)	Subunidad principal del complejo NF- κ B que induce genes inflamatorios.	Esencial para la activación de células T, supervivencia y producción de IL-2, TNF- α , IL-6 y otras citocinas.
Neonatos prematuros nacidos por cesárea		
RUNX1	Controla la hematopoyesis y el desarrollo de linfocitos.	Fundamental para la diferenciación de células T y la regulación de genes como CD4 y TCR.
STAT1	Media la señalización de interferones tipo I y II.	Promueve respuestas antivirales y la diferenciación hacia perfiles Th1 mediante la inducción de genes estimulados por interferón.

IRF2	Regula la expresión de genes inducidos por interferones.	Mantiene el equilibrio entre activación y regulación de la respuesta antiviral e inmune.
NFYB	Subunidad del complejo NF-Y que reconoce cajas CCAAT en promotores.	Regula genes involucrados en proliferación celular, metabolismo y ciclo celular.
YBX1	Regula transcripción, estabilidad del ARN y traducción.	Participa en la respuesta al estrés y favorece la supervivencia de células inmunes activadas.
Neonatos de término nacidos por parto vaginal		
RFXAP	Componente esencial del complejo RFX que activa genes del MHC-II.	Indispensable para la expresión de MHC clase II y la presentación antigénica a linfocitos T CD4+.
SCX (Scleraxis)	Regula la diferenciación de tendones y tejido conectivo.	No posee una función inmunológica ampliamente descrita; probablemente refleja procesos de desarrollo o regulación transcripcional secundaria.
ZXDC	Cofactor que promueve la transcripción de genes del MHC-II junto con CIITA.	Favorece la presentación antigénica y la activación de la respuesta inmune adaptativa.
PHF20	Regulador epigenético que modula la actividad de p53 y remodeladores de cromatina.	Participa en supervivencia celular y regulación de programas transcripcionales durante la activación inmune.
NFX1	Regula positiva o negativamente la transcripción dependiendo del contexto.	Se ha asociado con la regulación de genes relacionados con proliferación e inmunidad innata.
ZFX	Mantiene la autorrenovación y supervivencia de células madre y progenitores.	Favorece la supervivencia y expansión de linfocitos durante la respuesta inmune.
CIITA	Principal regulador maestro de la expresión de MHC clase II.	Esencial para la presentación de antígenos y la activación de linfocitos T CD4+.
HIVEP2	Se une a secuencias κB del ADN regulando genes dependientes de NF-κB.	Modula la expresión de genes inflamatorios y la activación de células inmunes.
MYC (c-Myc)	Regula metabolismo, crecimiento celular y proliferación.	Factor clave para la reprogramación metabólica y expansión clonal de linfocitos T activados.
NPM1	Regula biogénesis ribosomal, estabilidad genómica y proliferación.	Favorece la supervivencia y rápida proliferación de células inmunes activadas.

SFPQ	Regula transcripción, procesamiento de ARN y reparación del ADN.	Modula programas de expresión génica durante la activación y diferenciación celular.
MBD1	Reconoce ADN metilado y participa en silenciamiento génico.	Contribuye al control epigenético de genes relacionados con diferenciación celular.
HOXA1	Regula el desarrollo embrionario y la diferenciación celular.	Su función inmunológica es limitada, aunque puede participar en programas tempranos de diferenciación hematopoyética.
HOXA7	Controla programas de desarrollo y diferenciación.	Se ha relacionado con regulación del desarrollo de células hematopoyéticas.
ZBTB4	Represor transcripcional que regula proliferación y respuesta al daño celular.	Puede limitar la activación excesiva y favorecer la estabilidad genómica.
ZBED1 (DREF)	Regula genes implicados en replicación del ADN y ciclo celular.	Favorece la proliferación celular durante respuestas inmunes.
DAXX	Participa en remodelación de cromatina, apoptosis y respuesta al estrés.	Modula la supervivencia celular y respuestas frente a daño genómico e infección.
MLX	Sensor metabólico que regula genes del metabolismo energético.	Contribuye a la adaptación metabólica necesaria para la activación de linfocitos.
MLXIP (MondoA)	Forma heterodímeros con MLX para controlar genes del metabolismo de glucosa.	Participa en la reprogramación metabólica que acompaña la activación y proliferación celular.

Tabla 4. Factores transcripcionales activos en linfocitos T CD8⁺ neonatos de pretérmino y término. Descripción de la función de los factores transcripcionales encontrados activos en muestras de neonatos prematuros y de término.

2. Proliferación homeostática de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ neonatales.

A partir de los experimentos de proliferación celular, logramos identificar que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tienden a proliferar en ausencia de estimulación. Esto ha sido identificado anteriormente por otros grupos como un evento de proliferación homeostática, debido al estado linfopénico con el que nacen los neonatos [142]. En la figura 36 se pueden observar las generaciones que se llegan a formar en ausencia de estímulo.

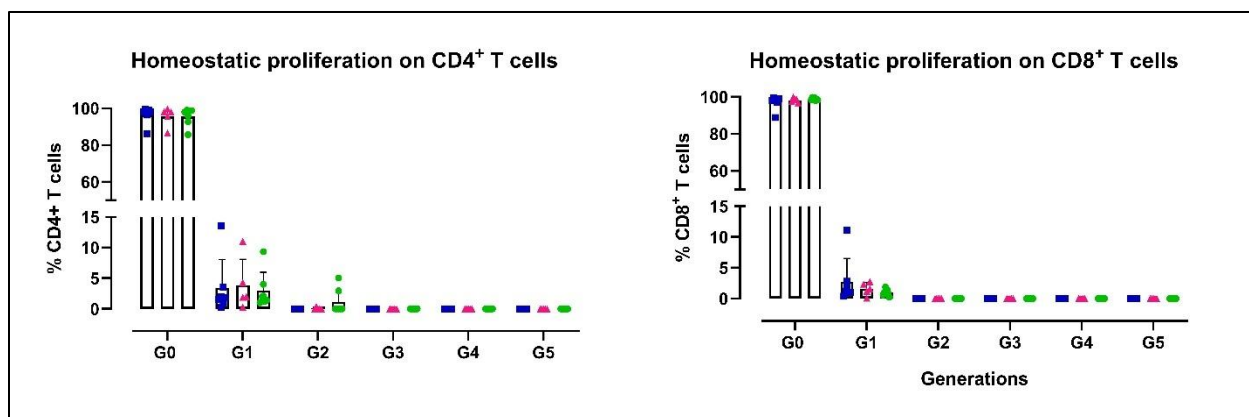


Figura 36. Proliferación homeostática de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ neonatales. A partir de la tinción con CFSE, se identificó la formación de generaciones en nuestra condición de control en estado basal en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos de término y prematuros. Parto vaginal = 7, cesárea término = 5, prematuros = 7.

3. Cinética de expresión de CD69 y CD25 en linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos

A continuación, se presenta la cinética de expresión de CD69 evaluada a las 6, 24, 48 y 72 horas de estimulación. Como se muestra en la Figura 37, en adultos CD69 exhibe una elevada expresión en los tiempos más tempranos, seguida de una disminución gradual conforme avanza el periodo de cultivo, lo que concuerda con su papel como marcador temprano de activación de los linfocitos T. Por otro lado, en estas células de adultos, la expresión de CD25 no mostró un aumento progresivo durante la cinética analizada. Considerando que CD25 forma parte del receptor de alta afinidad para IL-2 y desempeña un papel fundamental en la expansión clonal de los linfocitos T, su baja expresión podría estar relacionada con la proliferación celular limitada observada. Sin embargo, al ser resultados preliminares, es necesario incrementar el tamaño de la muestra en los tiempos de 6 y 24 horas para confirmar estas observaciones. Aun así, los datos muestran una clara tendencia en la regulación temporal de ambos marcadores de activación.

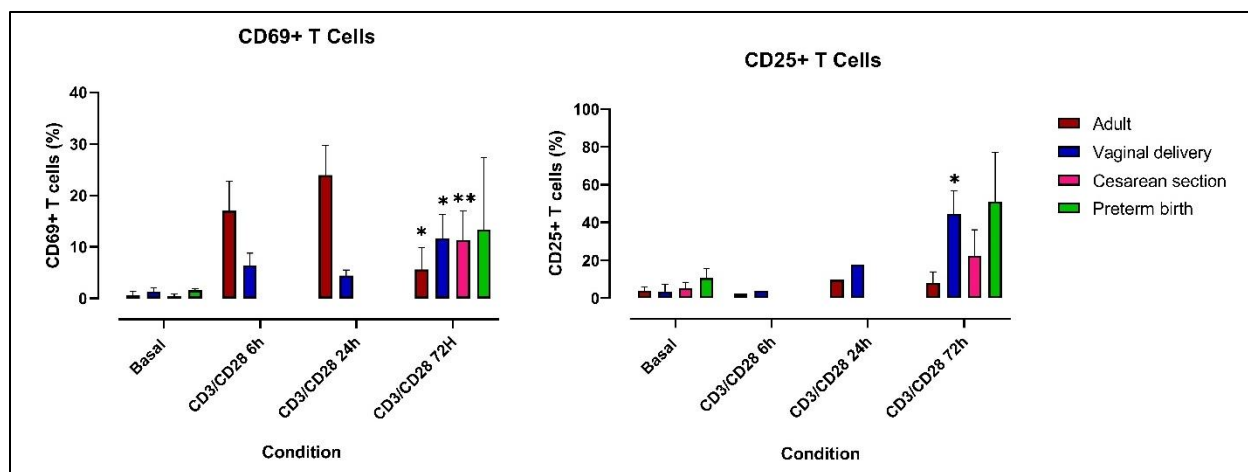


Figura 37. Cinética de expresión de CD69 a lo largo del tiempo. Se muestran los porcentajes de células CD69+ en linfocitos T CD4+ de adultos y de neonatos de término y prematuros. Adultos = 8, parto vaginal = 7, cesárea término = 8, prematuros = 3. Se realizó una prueba estadística no paramétrica de datos pareados (Wilcoxon). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Gráficas de barras de datos de citocinas de linfocitos T CD4+ purificados de adultos y neonatos.

Las siguientes gráficas de barras corresponden a los datos crudos obtenidos de la cuantificación de citocinas. En las gráficas se pueden apreciar los cambios significativos, así como los promedios de la concentración de cada una de las citocinas. En las figuras 38 y 39 se muestran los datos de citocinas de linfocitos T CD4+ en los perfiles Th e innatos o citotóxicos, respectivamente. Mientras que en las figuras 40 y 41 se encuentran las homólogas de linfocitos T CD8+.

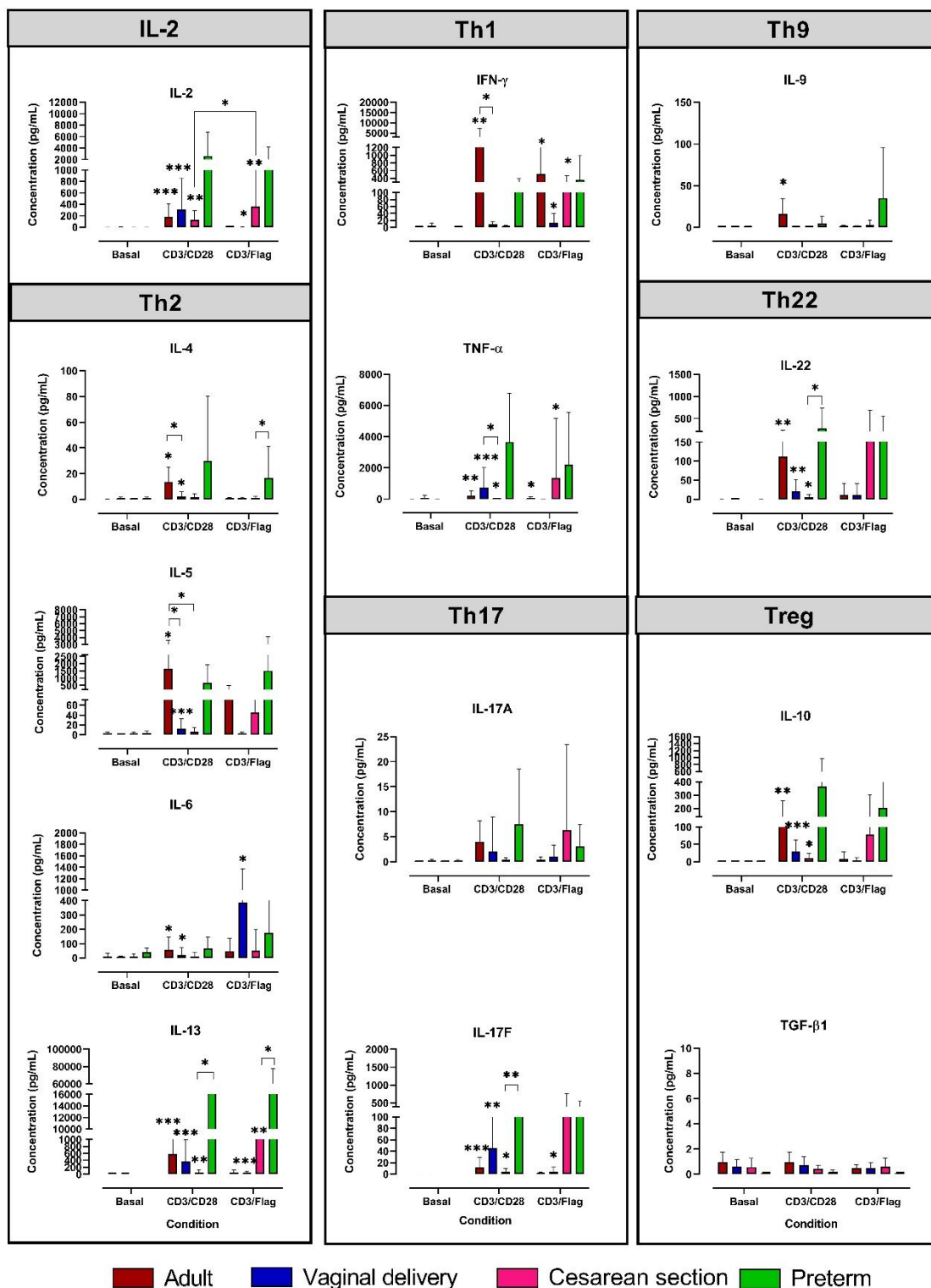


Figura 38. Concentración de citocinas en sobrenadantes de linfocitos T CD4⁺ de neonatos de término y adultos. Los sobrenadantes fueron colectados después de 72 h de estimulación en las condiciones antes mencionadas y se realizó la cuantificación de

citocinas. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y datos no pareados (Mann-Whitney). Adultos = 6, parto vaginal = 16, cesárea término = 8, prematuros = 4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

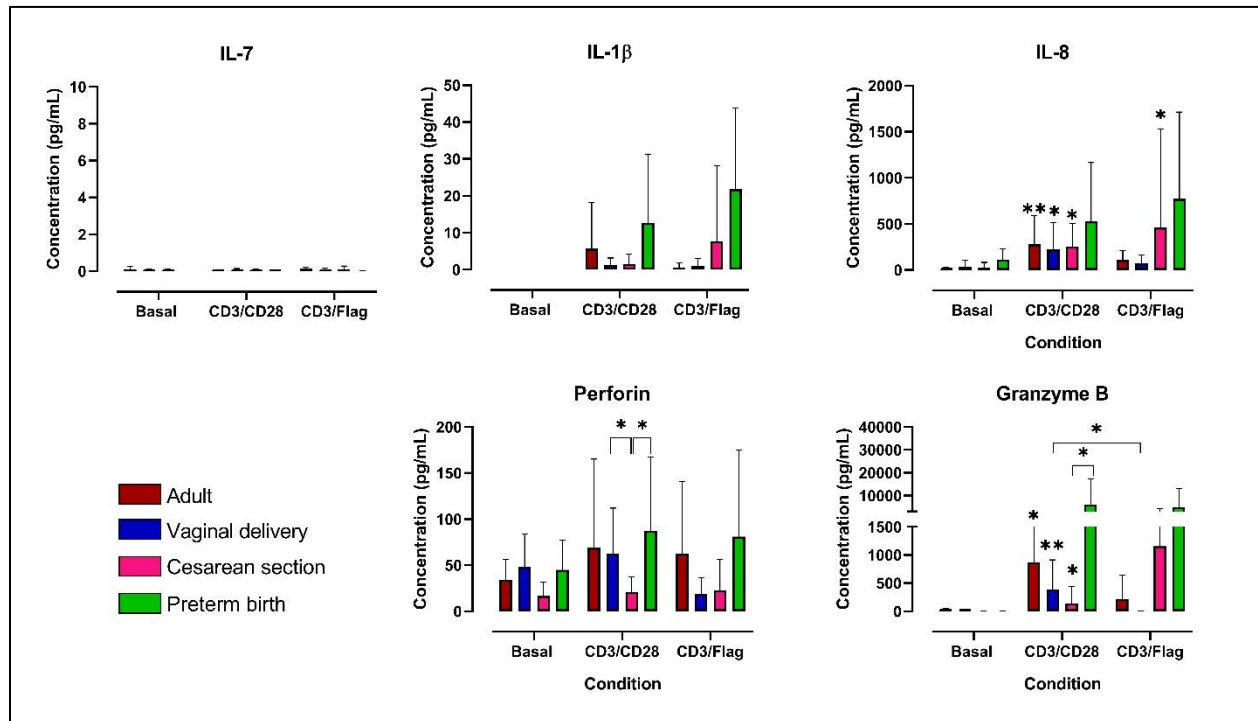


Figura 39. Cuantificación del segundo set de citocinas y moléculas citotóxicas en sobrenadantes de linfocitos T CD4⁺ de neonatos de término y adultos. Los sobrenadantes fueron colectados después de 72 h de estimulación, en las condiciones antes mencionadas, y se realizó la cuantificación de citocinas. Adultos = 5, parto vaginal = 14, cesárea término = 7, prematuros = 4. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y datos no pareados (Mann-Whitney). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

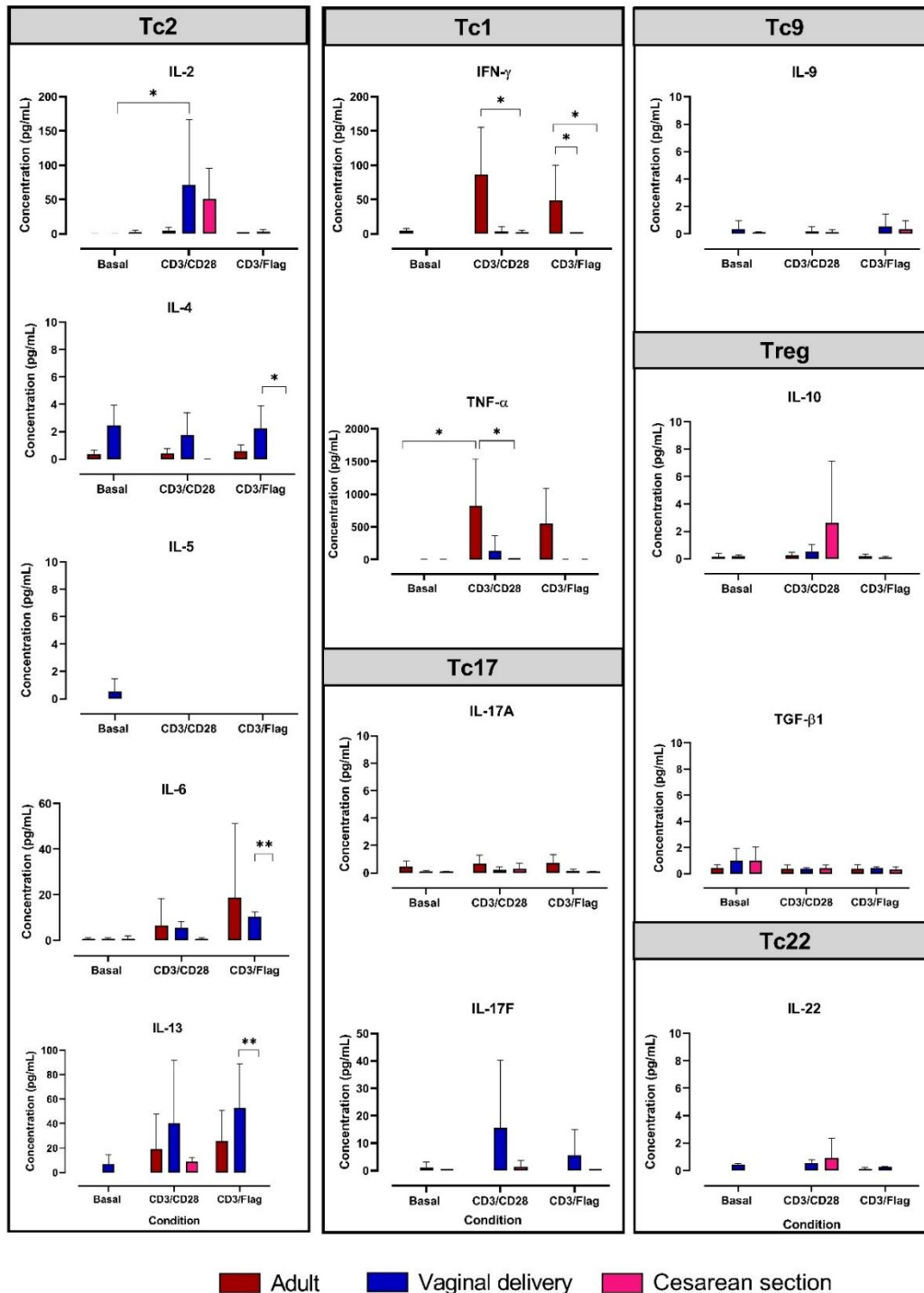


Figura 40. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ de neonatos de término y adultos. Los sobrenadantes fueron colectados tras 72 h de estimulación, en las condiciones antes mencionadas, y se cuantificaron las citocinas. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y datos

no pareados (Mann-Whitney). Adultos = 3, parto vaginal = 3, cesárea término = 3, prematuros = 3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

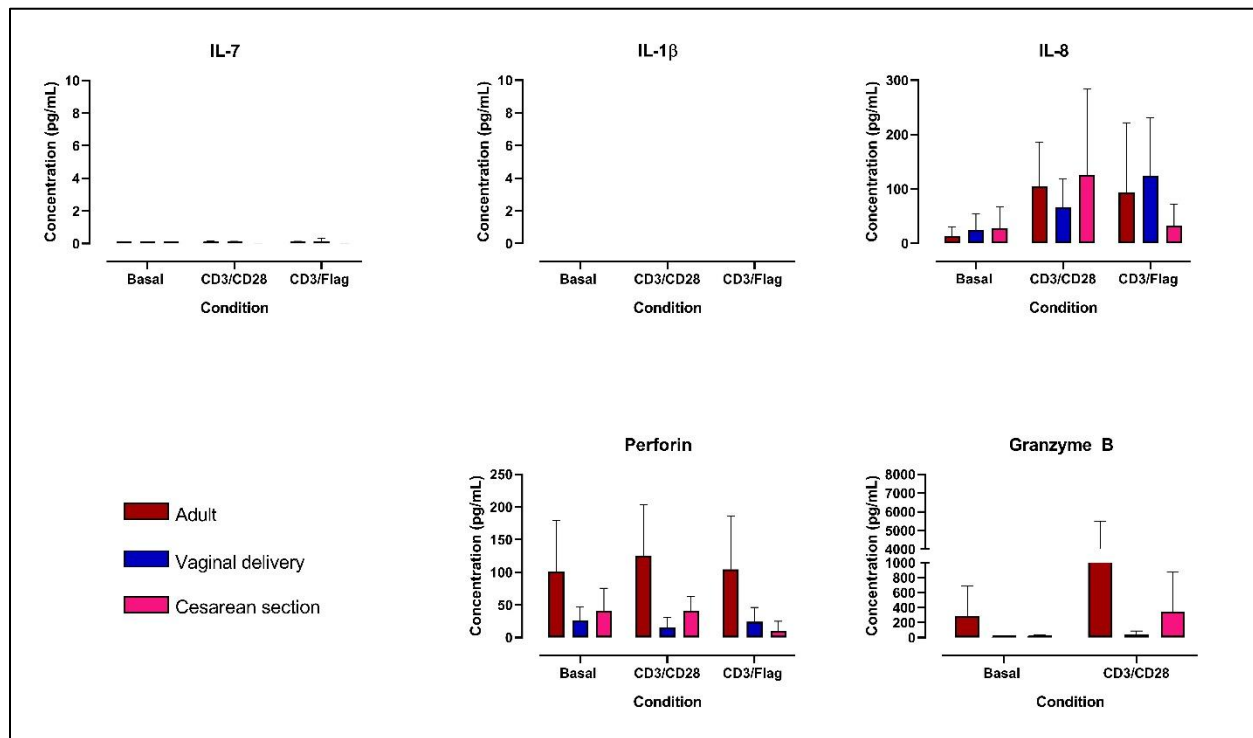


Figura 41. Cuantificación del segundo set de citocinas y moléculas citotóxicas en sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ de neonatos de término y adultos. Los sobrenadantes fueron colectados después de 72 h de estimulación, en las condiciones antes mencionadas, y la cuantificación de las citocinas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit Legendplex. Adultos = 3, parto vaginal = 3, cesárea término = 3. Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de datos pareados (Wilcoxon) y datos no pareados (Mann-Whitney). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. A. Santana and F. Esquivel-Guadarrama, "Cell Biology of T Cell Activation and Differentiation," vol. 250, no. 06, 2006, doi: 10.1016/S0074-7696(06)50006-3.
- [2] R. Wang *et al.*, "The interaction of innate immune and adaptive immune system," *MedComm*, vol. 5, no. 10, p. e714, Oct. 2024, doi: 10.1002/mco2.714.
- [3] S. E. Turvey and D. H. Broide, "Innate immunity," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2, pp. S24–S32, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016.

- [4] S. P. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, *Inmunologia celular y molecular*. 2015. [Online]. Available: papers3://publication/uuid/5EA1AA7A-8B6E-424A-B367-0DC1E86B0C47
- [5] P. X. Liew and P. Kubes, "The Neutrophil's Role During Health and Disease," *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 2, pp. 1223–1248, Apr. 2019, doi: 10.1152/physrev.00012.2018.
- [6] C. A. Thaiss, N. Zmora, M. Levy, and E. Elinav, "The microbiome and innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, doi: 10.1038/nature18847.
- [7] J. C. Yu et al., "Innate Immunity of Neonates and Infants," *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1759, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01759.
- [8] C. Macri, E. S. Pang, T. Patton, and M. O. Keeffe, "Dendritic cell subsets," *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2017, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.12.009.
- [9] T. Kawai and S. Akira, "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 5, pp. 373–384, May 2010, doi: 10.1038/ni.1863.
- [10] H. H. Oberg, M. Juricke, D. Kabelitz, and D. Wesch, "Regulation of T cell activation by TLR ligands," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 90, no. 6–7, Art. no. 6–7, 2011, doi: 10.1016/j.ejcb.2010.11.012.
- [11] D. A. Cronkite and T. M. Strutt, "The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes," *Hindawi*, 2018.
- [12] J. Brown, H. Wang, G. N. Hajishengallis, and M. Martin, "TLR-signaling networks: An integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk," *J. Dent. Res.*, vol. 90, no. 4, Art. no. 4, 2011, doi: 10.1177/0022034510381264.
- [13] B. D. Sinnott, B. Park, M. C. Boer, A. Deborah, and C. L. Lancioni, "Direct TLR-2 Costimulation Unmasks the Proinflammatory Potential of Neonatal CD4 + T Cells," *J. Immunol.*, 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1501297.
- [14] N. K. Crellin, R. V. Garcia, O. Hadisfar, S. E. Allan, T. S. Steiner, and M. K. Levings, "Human CD4+ T Cells Express TLR5 and Its Ligand Flagellin Enhances the Suppressive Capacity and Expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T Regulatory Cells," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 12, Art. no. 12, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.12.8051.
- [15] S. McComb, A. Thiriot, B. Akache, L. Krishnan, and F. Stark, "Introduction to the Immune System," in *Immunoproteomics*, vol. 2024, K. M. Fulton and S. M. Twine, Eds., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2024. , New York, NY: Springer New York, 2019, pp. 1–24. doi: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1.
- [16] S. P. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, *Inmunologia celular y molecular*. 2015. [Online]. Available: papers3://publication/uuid/5EA1AA7A-8B6E-424A-B367-0DC1E86B0C47
- [17] G. E. Kaiko, J. C. Horvat, K. W. Beagley, and P. M. Hansbro, "Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response?," *Immunology*, vol. 123, no. 3, pp. 326–338, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x.

- [18] M. Vukmanovic-Stejic, B. Vyas, P. Gorak-Stolinska, A. Noble, and D. M. Kemeny, "Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes," *Blood*, vol. 95, no. 1, pp. 231–240, Jan. 2000, doi: 10.1182/blood.V95.1.231.
- [19] R. V Uzhachenko and A. Shanker, "CD8 + T Lymphocyte and NK Cell Network : Circuitry in the Cytotoxic Domain of Immunity," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. August, pp. 1–7, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01906.
- [20] K. Liu, "In Vivo Analysis of Dendritic Cell," vol. 392, 2009, doi: 10.1126/science.1170540.
- [21] J. Smith-Garvin and G. Koretzky, "T cell activation," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 591–619, 2009, doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.T.
- [22] Z. Zhang *et al.*, "The dual role of T cells in solid organ transplant rejection and immune tolerance," *Front. Immunol.*, vol. 17, p. 1787579, Mar. 2026, doi: 10.3389/fimmu.2026.1787579.
- [23] L. M. Sompayrac, *How the Immune System Works*. 2016.
- [24] Y. Xu, W. Yuan, K. Li, and P. Li, "Nutritional intervention alleviates T cell exhaustion and empowers anti-tumor immunity," *Front. Immunol.*, vol. 16, p. 1689317, Dec. 2025, doi: 10.3389/fimmu.2025.1689317.
- [25] L. Almeida, M. Lochner, L. Berod, and T. Sparwasser, "Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation," *Semin. Immunol.*, vol. 28, no. 5, Art. no. 5, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.smim.2016.10.009.
- [26] N. M. Chapman, M. R. Boothby, and H. Chi, "Metabolic coordination of T cell quiescence and activation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41577-019-0203-y.
- [27] L. Almeida, M. Lochner, L. Berod, and T. Sparwasser, "Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation," *Semin. Immunol.*, vol. 28, no. 5, pp. 514–524, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.smim.2016.10.009.
- [28] J. A. Shyer, R. A. Flavell, and W. Bailis, "Metabolic signaling in T cells," *Cell Res.*, vol. 30, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41422-020-0379-5.
- [29] C. Hu, Y. Xuan, X. Zhang, Y. Liu, S. Yang, and K. Yang, "Immune cell metabolism and metabolic reprogramming," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 49, no. 10, pp. 9783–9795, Oct. 2022, doi: 10.1007/s11033-022-07474-2.
- [30] M. McCarron and D. J. Reen, "Activated Human Neonatal CD8 + T Cells Are Subject to Immunomodulation by Direct TLR2 or TLR5 Stimulation," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.182.1.55.
- [31] O. Rodríguez-Jorge *et al.*, "Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4 + T cell activation," *Sci. Signal.*, vol. 12, no. 577, Art. no. 577, Apr. 2019, doi: 10.1126/scisignal.aar3641.

- [32] M. Crespo *et al.*, “Neonatal T-cell maturation and homing receptor responses to Toll-like receptor ligands differ from those of adult naive T cells : relationship to prematurity,” *Int. Pediatr. Res. Fund.*, vol. 71, no. 2, 2012, doi: 10.1038/pr.2011.26.
- [33] O. Rodríguez-jorge, L. A. Kempis-calanis, W. Abou-jaoudé, D. Y. Gutiérrez-reyna, C. Hernandez, and O. Ramirez-pliego, “Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4 + T cell activation,” vol. 88, pp. 1–11, 2019.
- [34] R. G. Labastida-Conde *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*, vol. 36, no. 29, pp. 4188–4197, 2018, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.06.005.
- [35] J. Pettmann, A. M. Santos, O. Dushek, and S. J. Davis, “Membrane Ultrastructure and T Cell Activation,” *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2152, Sep. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02152.
- [36] A. H. Courtney, W.-L. Lo, and A. Weiss, “TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2017.11.008.
- [37] F. Macian, “NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 6, pp. 472–484, 2005, doi: 10.1038/nri1632.
- [38] H. Oh and S. Ghosh, “NF- κ B: roles and regulation in different CD4 + T-cell subsets,” *Immunol. Rev.*, vol. 252, no. 1, pp. 41–51, Mar. 2013, doi: 10.1111/imr.12033.
- [39] E. Serfling, A. Avots, S. Klein-Hessling, R. Rudolf, M. Vaeth, and F. Berberich-Siebelt, “NFATc1/A: The other face of NFAT factors in lymphocytes,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 10, no. 1, p. 1, 2012, doi: 10.1186/1478-811X-10-16.
- [40] S. Sharma *et al.*, “Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 28, pp. 11381–11386, Jul. 2011, doi: 10.1073/pnas.1019711108.
- [41] G. P. Mognol, F. R. G. Carneiro, B. K. Robbs, D. V. Faget, and J. P. B. Viola, “Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 4, pp. e2199–e2199, Apr. 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.97.
- [42] E. I. Y. Cáncer, N. P. E. R, and I. M. S, “FACTOR NUCLEAR κ B (NF- κ B): SIGNALOSOMA Y SU IMPORTANCIA EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y CÁNCER,” vol. 56, no. 2, pp. 133–146, 2008.
- [43] A. Oeckinghaus and S. Ghosh, “The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. a000034–a000034, 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
- [44] A. Voisin and Y. Grinberg-bleyer, *The many-sided contributions of NF- κ B to T-cell biology in health and disease*, 1st ed., vol. 361. Elsevier Inc., 2021. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.10.006.

- [45] Q. Ruan and Y. H. Chen, "Nuclear Factor- κ B in Immunity and Inflammation: The Treg and Th17 Connection," in *Current Topics in Innate Immunity II*, vol. 946, J. D. Lambris and G. Hajishengallis, Eds., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 946, New York, NY: Springer New York, 2012, pp. 207–221. doi: 10.1007/978-1-4614-0106-3_12.
- [46] O. Maguire, K. O'Loughlin, and H. Minderman, "Simultaneous assessment of NF- κ B/p65 phosphorylation and nuclear localization using imaging flow cytometry," *J. Immunol. Methods*, vol. 423, pp. 3–11, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.jim.2015.03.018.
- [47] R. Moreno, J.-M. Sobotzik, C. Schultz, and M. L. Schmitz, "Specification of the NF- κ B transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK ϵ ," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 18, pp. 6029–6044, Oct. 2010, doi: 10.1093/nar/gkq439.
- [48] C. C. King, M. Sastri, P. Chang, J. Pennypacker, and S. S. Taylor, "The Rate of NF- κ B Nuclear Translocation Is Regulated by PKA and A Kinase Interacting Protein 1," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, p. e18713, Apr. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018713.
- [49] H. Buss, A. Dörrie, M. L. Schmitz, E. Hoffmann, K. Resch, and M. Kracht, "Constitutive and Interleukin-1-inducible Phosphorylation of p65 NF- κ B at Serine 536 Is Mediated by Multiple Protein Kinases Including I κ B Kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF Family Member-associated (TANK)-binding Kinase 1 (TBK1), and an Unknown Kinase and Couples p65 to TATA-binding Protein-associated Factor II31-mediated Interleukin-8 Transcription," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 53, pp. 55633–55643, Dec. 2004, doi: 10.1074/jbc.M409825200.
- [50] L. Reber, L. Vermeulen, G. Haegeman, and N. Frossard, "Ser276 Phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 Controls SCF Expression in Inflammation," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 2, p. e4393, Feb. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004393.
- [51] A. G. Papavassiliou and A. M. Musti, "The Multifaceted Output of c-Jun Biological Activity: Focus at the Junction of CD8 T Cell Activation and Exhaustion," *Cells*, vol. 9, no. 11, p. 2470, Nov. 2020, doi: 10.3390/cells9112470.
- [52] C. U. Blank *et al.*, "Defining 'T cell exhaustion,'" *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 19, no. 11, pp. 665–674, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41577-019-0221-9.
- [53] H. Seo *et al.*, "TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no. 25, pp. 12410–12415, Jun. 2019, doi: 10.1073/pnas.1905675116.
- [54] B. J. Pulverer, J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. R. Woodgett, "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases," *Nature*, vol. 353, no. 6345, pp. 670–674, Oct. 1991, doi: 10.1038/353670a0.
- [55] M. Karin, "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 28, Art. no. 28, 1995, doi: 10.1074/jbc.270.28.16483.
- [56] T. Kawai and S. Akira, "Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity," *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 637–650, 2011, doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.

- [57] A. O. Galindo-Albarrán *et al.*, “CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response,” *Cell Rep.*, vol. 17, no. 8, pp. 2151–2160, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.056.
- [58] B. Cui, X. Liu, Y. Fang, P. Zhou, Y. Zhang, and Y. Wang, “Flagellin as a vaccine adjuvant,” *Expert Rev. Vaccines*, vol. 0, no. 0, 2018, doi: 10.1080/14760584.2018.1457443.
- [59] S. Cytokine, J. M. Curtsinger, C. M. Johnson, F. Matthew, and S. Cytokine, “CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine,” *J. Immunol.*, 2003, doi: 10.4049/jimmunol.171.10.5165.
- [60] D. W. Clapp, “Developmental Regulation of the Immune System,” *Semin. Perinatol.*, vol. 30, no. 2, pp. 69–72, 2006, doi: 10.1053/j.semperi.2006.02.004.
- [61] K. R. Qazi *et al.*, “Extremely Preterm Infants Have Significant Alterations in Their Conventional T Cell Compartment during the First Weeks of Life,” *J. Immunol.*, 2020, doi: 10.4049/jimmunol.1900941.
- [62] I. R. Amaia, G. M. M. P. Inés, M. J. Polaino, M. M. R. María, F. G. Manuel, and Y. M. Pacheco, “An in vitro system of autologous lymphocytes culture that allows the study of homeostatic proliferation mechanisms in human naive,” *USACAP*, 2018.
- [63] M. Á. Muñoz-fernández, “Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory t-cell values and diminished IL-7,” *Int. Pediatr. Res. Fund.*, vol. 71, no. 5, 2012, doi: 10.1038/pr.2012.6.
- [64] Y. Corripio-Miyar *et al.*, “Functionally distinct T-helper cell phenotypes predict resistance to different types of parasites in a wild mammal,” *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, p. 3197, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-07149-9.
- [65] S. Malik and A. Awasthi, “Transcriptional Control of Th9 Cells: Role of Foxo1 in Interleukin-9 Induction,” *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 995, May 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00995.
- [66] S. Eyerich *et al.*, “Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling,” *J. Clin. Invest.*, p. JCI40202, Nov. 2009, doi: 10.1172/JCI40202.
- [67] M. W. Plank *et al.*, “Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity,” *J. Immunol.*, vol. 198, no. 5, pp. 2182–2190, Mar. 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1601480.
- [68] R. Basu *et al.*, “Th22 Cells Are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria,” *Immunity*, vol. 37, no. 6, pp. 1061–1075, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.024.
- [69] Q. Jiang *et al.*, “Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases,” *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 688066, Jul. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.688066.
- [70] S. Crotty, “Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}),” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, no. 1, pp. 621–663, Apr. 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400.

- [71] C. G. Vinuesa, M. A. Linterman, D. Yu, and I. C. M. MacLennan, "Follicular Helper T Cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 34, no. 1, pp. 335–368, May 2016, doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055605.
- [72] K. Motwani *et al.*, "Human Regulatory T Cells From Umbilical Cord Blood Display Increased Repertoire Diversity and Lineage Stability Relative to Adult Peripheral Blood," vol. 11, no. April, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00611.
- [73] M. J. Butcher and J. Zhu, "Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice," *Fac. Rev.*, vol. 10, Mar. 2021, doi: 10.12703/r/10-30.
- [74] M. Barry and R. C. Bleackley, "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 6, pp. 401–409, Jun. 2002, doi: 10.1038/nri819.
- [75] D. Miller, M. Gershater, R. Slutsky, R. Romero, and N. Gomez-Lopez, "Maternal and fetal T cells in term pregnancy and preterm labor," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 17, no. 7, pp. 693–704, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0471-2.
- [76] N. Gomez-Lopez, D. StLouis, M. A. Lehr, E. N. Sanchez-Rodriguez, and M. Arenas-Hernandez, "Immune cells in term and preterm labor," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 11, no. 6, pp. 571–581, Nov. 2014, doi: 10.1038/cmi.2014.46.
- [77] O. Shynlova, L. Nadeem, J. Zhang, C. Dunk, and S. Lye, "Myometrial activation: Novel concepts underlying labor," *Placenta*, vol. 92, pp. 28–36, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.placenta.2020.02.005.
- [78] R. Menon, "Fetal inflammatory response at the fetomaternal interface: A requirement for labor at term and preterm*," *Immunol. Rev.*, vol. 308, no. 1, pp. 149–167, Jul. 2022, doi: 10.1111/imr.13075.
- [79] S. Vikberg *et al.*, "Labour promotes systemic mobilisation of monocytes, T cell activation and local secretion of chemotactic factors in the intervillous space of the placenta," *Front. Immunol.*, vol. 14, p. 1129261, Mar. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1129261.
- [80] I. A. Stelzer *et al.*, "Integrated trajectories of the maternal metabolome, proteome, and immunome predict labor onset," *Sci. Transl. Med.*, vol. 13, no. 592, p. eabd9898, May 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.abd9898.
- [81] R. Romero, F. Gotsch, B. Pineles, and J. P. Kusanovic, "Inflammation in Pregnancy: Its Roles in Reproductive Physiology, Obstetrical Complications, and Fetal Injury," *Nutr. Rev.*, vol. 65, pp. S194–S202, Jun. 2008, doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00362.x.
- [82] Q. Huang, X. Jin, P. Li, Z. Zheng, Y. Jiang, and H. Liu, "Elevated inflammatory mediators from the maternal-fetal interface to fetal circulation during labor," *Cytokine*, vol. 148, p. 155707, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.cyto.2021.155707.
- [83] M. Frascoli *et al.*, "Alloreactive fetal T cells promote uterine contractility in preterm labor via IFN- γ and TNF- α ," *Sci. Transl. Med.*, vol. 10, no. 438, p. eaan2263, Apr. 2018, doi: 10.1126/scitranslmed.aan2263.
- [84] UNICEF, "Cada Vida Cuenta," pp. 2–3, 2018.

- [85] I. Debock and V. Flamand, "Unbalanced neonatal CD4 + T-cell immunity," vol. 5, no. August, pp. 1–7, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00393.
- [86] T. R. Kollmann, B. Kampmann, S. K. Mazmanian, A. Marchant, and O. Levy, "Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases : Lessons from Immune Ontogeny," *Cell Press*, 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.03.009.
- [87] B. D. Rudd, "Neonatal T Cells: A Reinterpretation," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 38, no. 1, pp. 229–247, Apr. 2020, doi: 10.1146/annurev-immunol-091319-083608.
- [88] N. N. Brodsky *et al.*, "Early-life human CD8⁺ T cells exhibit rapid, short-lived effector responses and a unique transcription factor landscape," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 122, no. 31, p. e2421106122, Aug. 2025, doi: 10.1073/pnas.2421106122.
- [89] L. R. Dwyer *et al.*, "CD38 expression by neonatal human naïve CD4⁺ T cells shapes their distinct metabolic state and tolerogenic potential," Jan. 02, 2025, *Immunology*. doi: 10.1101/2025.01.02.631038.
- [90] N. P. Corbett *et al.*, "Ontogeny of Toll-Like Receptor Mediated Cytokine Responses of Human Blood Mononuclear Cells," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 11, p. e15041, Nov. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0015041.
- [91] A. Georgountzou and N. G. Papadopoulos, "Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood," *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 957, Aug. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00957.
- [92] T. R. Kollmann *et al.*, "Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 11, pp. 7150–7160, Dec. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0901481.
- [93] S. M. Lawrence, R. Corriden, and V. Nizet, "Age-Appropriate Functions and Dysfunctions of the Neonatal Neutrophil," *Front. Pediatr.*, vol. 5, Feb. 2017, doi: 10.3389/fped.2017.00023.
- [94] G. P. Tsafaras, P. Ntontsi, and G. Xanthou, "Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System," *Front. Pediatr.*, vol. 8, p. 5, Jan. 2020, doi: 10.3389/fped.2020.00005.
- [95] O. Zenarruzabeitia *et al.*, "The expression and function of human CD300 receptors on blood circulating mononuclear cells are distinct in neonates and adults," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 32693, Sep. 2016, doi: 10.1038/srep32693.
- [96] J. C. Yu *et al.*, "Innate Immunity of Neonates and Infants," *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1759, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01759.
- [97] A. Quaiser *et al.*, "Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents," *Scand. J. Immunol.*, vol. 84, no. 5, pp. 291–298, 2016, doi: 10.1111/sji.12474.
- [98] L. A. Kempis-Calanis *et al.*, "Neonatal CD4⁺ T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with proliferation and yet a limited immune response," *J. Leukoc. Biol.*, p. qiad162, Dec. 2023, doi: 10.1093/jleuko/qiad162.

- [99] A. Sevelsted, J. Stokholm, K. Bønnelykke, and H. Bisgaard, "Cesarean Section and Chronic Immune Disorders," vol. 135, no. 1, 2015, doi: 10.1542/peds.2014-0596.
- [100] O. E. Keag, J. E. Norman, and S. J. Stock, "Long-term risks and benefits associated with cesarean delivery for mother, baby, and subsequent pregnancies: Systematic review and meta-analysis," *PLOS Med.*, vol. 15, no. 1, p. e1002494, Jan. 2018, doi: 10.1371/journal.pmed.1002494.
- [101] P. Kothiyal *et al.*, "Differences in maternal gene expression in Cesarean section delivery compared with vaginal delivery," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 17797, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-74989-8.
- [102] D. Nacionales, "COMUNICADO DE PRENSA NÚM . 209 / 20 7 DE MAYO DE 2020 ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA DE LA MADRE," no. 878 mil, 2020.
- [103] R. M. Tribe, "Parturition and the perinatal period : can mode of delivery impact on the future health of the neonate ?," vol. 23, pp. 5709–5722, 2018, doi: 10.1113/JP275429.
- [104] A. Mar, E. Mart, and T. Hern, "Prenatal and Perinatal Environmental Influences Shaping the Neonatal Immune System : A Focus on Asthma and Allergy Origins," 2021.
- [105] A. P. Betran, J. Ye, B. Moller, and J. P. Souza, "Trends and projections of caesarean section rates : global and regional estimates," 2021. doi: 10.1136/bmjgh-2021-005671.
- [106] C. Antoine and B. K. Young, "Cesarean section one hundred years 1920 – 2020 : the Good , the Bad and the Ugly," *J Perinat Med*, vol. 49, no. 1, pp. 5–16, 2021.
- [107] H. Lamadrid-Figueroa and J. Fritz, "The impact of excessive caesarean deliveries on gestational age at birth in Mexico: National-level trends, 2010–2023".
- [108] A. Sevelsted, J. Stokholm, K. Bønnelykke, and H. Bisgaard, "Cesarean Section and Chronic Immune Disorders," *Pediatrics*, vol. 135, no. 1, pp. e92–e98, Jan. 2015, doi: 10.1542/peds.2014-0596.
- [109] C. E. Cho and M. Norman, "immune system in the offspring," *YMOB*, vol. 208, no. 4, pp. 249–254, 2013, doi: 10.1016/j.ajog.2012.08.009.
- [110] R. G. Nichols and E. R. Davenport, "The relationship between the gut microbiome and host gene expression: a review," *Hum. Genet.*, vol. 140, no. 5, pp. 747–760, May 2021, doi: 10.1007/s00439-020-02237-0.
- [111] J. L. W. Amélie Collins, Jörn-Hendrik Weitkamp, "Why are preterm newborns at increased risk of infection?," vol. 35, no. 14, pp. 1252–1260, 2016, doi: 10.1177/0333102415576222.Is.
- [112] J. M. Melville and T. J. M. Moss, "The immune consequences of preterm birth," vol. 7, no. May, pp. 1–9, 2013, doi: 10.3389/fnins.2013.00079.
- [113] F. R. Helmo *et al.*, "Intrauterine infection, immune system and premature birth," *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, vol. 31, no. 9, pp. 1227–1233, 2018, doi: 10.1080/14767058.2017.1311318.

- [114] World Health Organization, "WHO recommendations on interventions to improve preterm birth outcomes," *World Health Organ.*, vol. 22, no. 1–2, pp. 1–98, 2015, doi: 10.1016/S0928-8244(98)00076-5.
- [115] L. A. Kempis-Calanis, O. Rodríguez-Jorge, C. J. Ventura-Martínez, D. Y. Gutiérrez-Reyna, S. Spicuglia, and M. A. Santana, "Unique Characteristics of Neonatal T Cells," *Med. Res. Arch.*, vol. 11, no. 1, 2023, doi: 10.18103/mra.v11i1.3568.
- [116] C. J. Ventura-Martínez *et al.*, "PREMATURE BIRTH AND CESAREAN SECTION AFFECT NEONATAL CD4+ T CELL GENE EXPRESSION AND CELLULAR FUNCTION".
- [117] P. Palma, D. L. Farber, L. Konnikova, and O. Levy, "Immune development in early life," *Nat. Immunol.*, vol. 27, no. 6, pp. 1119–1129, Jun. 2026, doi: 10.1038/s41590-026-02523-5.
- [118] Z. Tan *et al.*, "Immune development differs between preterm newborns fed mothers' own milk and donor milk," *iScience*, vol. 28, no. 7, p. 112918, Jul. 2025, doi: 10.1016/j.isci.2025.112918.
- [119] P. Lopez Valencia, "Perfil de expresión génica de los linfocitos T CD8+ de neonatos nacidos prematuros y a término, por parto natural y cesárea," Universidad Autonoma del Estado de Morelos, 2026.
- [120] M. Svenvik *et al.*, "Chemokine and cytokine profiles in preterm and term labor, in preterm prelabor rupture of the membranes, and in normal pregnancy," *J. Reprod. Immunol.*, vol. 164, p. 104278, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.jri.2024.104278.
- [121] O. Olaloye *et al.*, "A single-cell atlas of circulating immune cells over the first 2 months of age in extremely premature infants," *Sci. Transl. Med.*, vol. 17, no. 788, p. eadr0942, Mar. 2025, doi: 10.1126/scitranslmed.adr0942.
- [122] L. A. Kempis-Calanis, "Evaluación de la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF-κB en linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos humanos.," Universidad Autonoma del Estado de Morelos, 2018.
- [123] C. J. Ventura-Martínez, "Evaluación de la activación de NFAT en función de las señales de TCR y flagelina en células T CD4+ de neonatos y adultos humanos.," Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
- [124] S.-H. Im and A. Rao, "Activation and deactivation of gene expression by Ca²⁺/calcineurin-NFAT-mediated signaling.," *Mol. Cells*, vol. 18, no. 1, Art. no. 1, 2004, doi: 750 [pii].
- [125] D. Y. Gutiérrez-Reyna *et al.*, "IL-12 Signaling Contributes to the Reprogramming of Neonatal CD8+ T Cells," *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 1089, Jun. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01089.
- [126] S. M. Kaech and W. Cui, "Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 11, pp. 749–761, Nov. 2012, doi: 10.1038/nri3307.

- [127]F. Marangoni *et al.*, “The Transcription Factor NFAT Exhibits Signal Memory during Serial T Cell Interactions with Antigen-Presenting Cells,” *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 237–249, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.012.
- [128]L. D. Notarangelo, “Immunodeficiency and immune dysregulation associated with proximal defects of T cell receptor signaling,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 31, pp. 97–101, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.coi.2014.10.003.
- [129]A. J. Benitez Salgado, “Determinación del efecto de la flagelina y la IL-6 sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺ neonatales,” Universidad Autonoma del Estado de Morelos, 2024.
- [130]L. Kleberg, A. Courey-Ghaouzi, M. J. Lautenbach, A. Färnert, and C. Sundling, “Regulation of B-cell function and expression of CD11c, T-bet, and FcRL5 in response to different activation signals,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 54, no. 8, p. 2350736, Aug. 2024, doi: 10.1002/eji.202350736.
- [131]R. Medzhitov, “Recognition of microorganisms and activation of the immune response,” *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819–826, Oct. 2007, doi: 10.1038/nature06246.
- [132]W. Zeng, “‘All things considered’: transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation,” *Immunology*, vol. 140, no. 1, pp. 31–38, Sep. 2013, doi: 10.1111/imm.12121.
- [133]J. J. O’Shea and W. E. Paul, “Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4⁺ T Cells,” *Science*, vol. 327, no. 5969, pp. 1098–1102, Feb. 2010, doi: 10.1126/science.1178334.
- [134]E. Fouka, A. Lindén, and A. Bossios, “The role of T-helper and T regulatory cells in driving neutrophilic and eosinophilic inflammation in bronchiectasis,” *Front. Immunol.*, vol. 16, p. 1598257, Jun. 2025, doi: 10.3389/fimmu.2025.1598257.
- [135]A. C. Palin, V. Ramachandran, S. Acharya, and D. B. Lewis, “Human Neonatal Naive CD4⁺ T Cells Have Enhanced Activation-Dependent Signaling Regulated by the MicroRNA miR-181a,” *J. Immunol.*, vol. 190, no. 6, Art. no. 6, Mar. 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1202534.
- [136]J. R. Bermick *et al.*, “Differences in H3K4ME3 and chromatin accessibility contribute to altered T-cell receptor signaling in neonatal naïve CD4⁺ T cells,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 100, no. 7, Art. no. 7, Aug. 2022, doi: 10.1111/imcb.12561.
- [137]K. Sato, H. Nagayama, and T. a Takahashi, “Aberrant CD3- and CD28-mediated signaling events in cord blood T cells are associated with dysfunctional regulation of Fas ligand-mediated cytotoxicity,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 162, pp. 4464–4471, 1999, doi: 10.4049/jimmunol.1300193.
- [138]L. Nazerai, M. R. Bassi, I. E. M. Uddback, P. J. Holst, J. P. Christensen, and A. R. Thomsen, “Early life vaccination: Generation of adult-quality memory CD8⁺ T cells in infant mice using non-replicating adenoviral vectors,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 38666, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep38666.

- [139]R. G. Labastida-Conde *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*, vol. 36, no. 29, Art. no. 29, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.06.005.
- [140]A. Quaiser *et al.*, “Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 84, no. 5, Art. no. 5, 2016, doi: 10.1111/sji.12474.
- [141]P. Kothiyal *et al.*, “Differences in maternal gene expression in Cesarean section delivery compared with vaginal delivery,” *Sci. Rep.*, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-74989-8.
- [142]S. O. Schönland *et al.*, “Homeostatic control of T-cell generation in neonates,” *Blood*, vol. 102, no. 4, Art. no. 4, Aug. 2003, doi: 10.1182/blood-2002-11-3591.

PUBLICACIONES REALIZADAS

PREMATURE BIRTH AND CESAREAN SECTION ARE ASSOCIATED WITH SIGNIFICANT DIFFERENCES IN NEONATAL CD4⁺ T CELL GENE EXPRESSION AND FUNCTION

Carlos Jesús Ventura-Martínez^{1#}, Linda Aimara Kempis-Calanis^{1#}, Sebastian Mijares-Guevara¹, Alejandra Cedillo-Baños¹, Ingrid Yaritzit Carreón-Cortés¹, Darely Yarazeth Gutiérrez Reyna², Stephania Vázquez Rodríguez³, Addy Cecilia Helguera-Repetto³, Claudine Irles⁴⁻⁵, Salvatore Spicuglia⁶⁻⁷, Otoniel Rodríguez-Jorge^{1*}, María Angélica Santana^{1*}.

1. 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. Avenida Universidad 1001, Chamilpa, 62209, Cuernavaca, México.
2. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 1001, Chamilpa, 62209, Cuernavaca, México.
3. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Montes Urales 800, 11000, Ciudad de México, México.
4. INSERM UMR 1349, 93017, Bobigny, France.
5. SIMHEL, UFR SMBH, Université Sorbonne Paris Nord, 93017, Bobigny, France.
6. Aix-Marseille University, Inserm, TAGC, UMR1090, Marseille, France.
7. Equipe Labélisée LIGUE contre le Cancer, Marseille, France.

[#]First authors. These authors have equal contributions.

*Corresponding authors: Email: santana@uaem.mx; orj@uaem.mx

Financial and personal conflict of Interest statement: None

Abstract

Premature birth and cesarean section are associated with increased morbidity and inflammatory diseases. However, their impact on neonatal immunity remains incompletely defined. To explore how gestational age and mode of delivery contribute to early immune programming, we analyzed CD4⁺ T cells, central regulators of adaptive responses, from preterm neonates and full-term neonates born by cesarean section or vaginal delivery.

We performed transcriptomic profiling (mRNA-seq) and functional assessment of T cell activation, proliferation, and cytokine production following stimulation. The mode of delivery emerged as a key factor for CD4⁺ T cell transcriptome and function. CD4⁺ T cells from full-term neonates born by vaginal delivery exhibited an immune activation signature, produced higher levels of multiple cytokines, and showed reduced proliferative capacity.

In contrast, prematurity was associated with modest changes in basal gene expression relative to full-term cesarean section neonates. CD4⁺ T cells from preterm neonates displayed enhanced proliferation and increased secretion of inflammatory cytokines (IL-13, TNF α , IL-6, and IL-17F) upon stimulation, consistent with heightened responsiveness.

Collectively, our findings show that CD4⁺ T cells from preterm neonates exhibit augmented inflammatory potential, which becomes more regulated at term. Mode of delivery further contributes to this developmental trajectory: cesarean section is associated with a restrained functional profile, whereas vaginal delivery is associated with a mild immune activation signature and increased responsiveness. These results support a model in which neonatal CD4⁺ T cell trajectories are established during fetal life and further modulated at birth, highlighting the layered influence of perinatal factors on immune development.

Keywords

CD4⁺ T cells, premature birth, cesarean section, vaginal delivery, neonates, transcriptome

1. Introduction

The neonatal period, comprising the first 28 days of life, is the most vulnerable period for child survival. The neonatal immune system exhibits distinct characteristics and is believed to be programmed during the intrauterine period. This results in neonates having limited

1 innate inflammatory and Th1 immune responses, but predominant Th2, Th17, and tolerant
2 immune responses¹⁻⁵. Neonatal T cells exhibit a limited activation response, biased toward
3 innate immunity⁶⁻⁹. We previously published transcriptomic and epigenetic analyses of
4 CD4⁺ and CD8⁺ T cells from human neonates, compared with adult naïve T cells, showing
5 distinct functional programming characterized by high proliferation, a highly glycolytic
6 metabolism, an innate-biased response, and low effector functions¹⁰. Furthermore, early
7 events that occur during gestation, childbirth, and the perinatal period have a significant
8 impact on an individual's development and health throughout life. The immune system's
9 development and response are also affected by early life events. Premature birth is one of
10 the major causes of death in early life, causing around 28% of deaths in the population of
11 under-5-year-old children in Mexico^{11,12}. In addition to the high rate of fatalities, premature
12 babies often suffer morbidities that leave sequels that impact their health for life,
13 particularly those who are born with a very low weight or before 33 weeks of gestational age
14 (wga)^{13,14}. Premature babies are highly susceptible to infections and have limited protective
15 immune responses^{2,15,16}. However, their immune system is hyperreactive, often leading to
16 highly inflammatory conditions such as sepsis and necrotizing enterocolitis¹⁷⁻²⁰. The causes
17 of prematurity have been previously studied; maternal conditions such as obesity,
18 preeclampsia and intrauterine infections have been associated, while maternal and fetal
19 inflammatory responses contribute to preterm labor²¹⁻²⁵.

20 The rate of cesarean section (c-section, cesarean) for babies born under 33 wga is between
21 45% and 72% worldwide¹⁴. In addition, many full-term infants are also delivered by cesarean
22 section, including planned surgeries without a clear medical indication. Globally, cesarean
23 deliveries account for approximately 32.5% of all births, and their frequency continues to
24 increase²⁶. In Mexico, approximately 55% of all births are delivered by cesarean section.
25 These rates are similar to those reported in several Latin American countries, where
26 cesarean section rates are among the highest worldwide^{11,27,28}.

27 The effects of prematurity and birth type on neonatal development and immune response
28 have been studied, but clear results remain lacking. Some epidemiological studies have
29 shown, however, a predisposition of infants born by cesarean section to a series of

1 metabolic and inflammatory conditions, such as obesity, diabetes, asthma, and
2 autoimmune diseases^{27,29–32}.

3 To better understand the impact of birth type and gestational age on the immune system, we
4 evaluated CD4⁺ T cells, as these cells are central to the strength and type of adaptive
5 immune response. Here, we present the evaluation of the transcriptome, cell activation,
6 proliferation, and cytokine secretion of CD4⁺ T cells from preterm (28 to 36 weeks of
7 gestation) newborns born by cesarean section, as well as full-term newborns born by
8 cesarean section (cesarean) or vaginal delivery (natural birth). Our results show a greater
9 difference in the transcriptome between full-term neonates born by cesarean section and
10 those born by vaginal delivery, whereas prematurity exhibits only minor changes relative to
11 their controls. The gene expression profile of vaginal delivery CD4⁺ T cells showed a mild
12 “immune activation” signature. Upon stimulation, CD4⁺ T cells from vaginal delivery
13 produced modest but higher amounts of all cytokines, but proliferated less than those from
14 cesarean section, which indicates a predisposition to respond to stimulation. Of note, CD4⁺
15 T cells from premature babies showed a remarkably high production of cytokines, especially
16 IL-13, TNF- α , IL-6, and IL-17F, and a high proliferation rate as compared to cells from full-
17 term neonates from cesarean section.

18 Together, these findings suggest that birth mode is a contributing factor in the functional
19 programming of neonatal CD4⁺ T cells, whereas prematurity plays a role in potent
20 inflammatory responses. This study provides molecular and functional evidence that
21 immune trajectories are programmed during fetal life and further modulated at birth,
22 underscoring the immunological relevance of delivery practices and gestational age in
23 neonatal health.

24 25 **2. Materials and Methods**

26 27 **Type of study and statistical analysis**

1 This study was conducted in an observational cohort of neonates recruited at birth, as
2 described in Supplementary Table S1. Umbilical cord blood was collected at delivery from
3 three independent groups of neonates: (i) full-term neonates delivered vaginally (VD), (ii) full-
4 term neonates delivered by cesarean section (CS), and (iii) preterm neonates delivered by
5 cesarean section (PT). These groups were defined according to naturally occurring clinical
6 conditions, without investigator intervention. Exclusion criteria were defined *a priori* and
7 included neonatal infection (confirmed by culture or compatible clinical findings),
8 congenital malformations, neonatal fever, low Apgar score, maternal diseases known to
9 affect neonatal immune function, and lack of maternal informed consent.

10 Cord blood mononuclear cells (CBMCs) and purified CD4⁺ T cells were isolated from each
11 neonate and cultured under basal conditions or stimulated *in vitro* with anti-CD3/CD28
12 antibodies. Each donor therefore contributed paired measurements (basal and stimulated
13 conditions). Accordingly, the study followed a mixed design comprising one between-
14 subject factor (birth group) and one within-subject factor (stimulation).

15 Because the birth groups were observational rather than experimentally assigned, the
16 statistical analysis focused on prespecified biologically relevant comparisons rather than all
17 possible pairwise group comparisons. Planned comparisons were defined *a priori* according
18 to the study hypotheses rather than factorial interaction effects. Specifically, we evaluated
19 (i) the effect of stimulation (Basal vs CD3/CD28) within each birth group using paired
20 analyses and (ii) differences among birth groups under the same experimental condition
21 (being of interest Cesarean section vs Preterm and Cesarean section vs Vaginal delivery).

22 Given the relatively small sample sizes and the inherent biological variability of primary
23 human neonatal samples, nonparametric statistical methods were used throughout.
24 Comparisons among independent birth groups were performed using the Kruskal–Wallis
25 rank-sum test, whereas paired comparisons between basal and stimulated conditions were
26 evaluated using the Wilcoxon signed-rank test. To account for multiple testing across
27 cytokines, *P*-values were adjusted using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR)

1 procedure. Unless otherwise indicated, adjusted *P*-values < 0.05 were considered
2 statistically significant.

3 **Cell purification and stimulation**

4 Neonatal blood was collected as previously described⁷. Briefly, the blood was collected just
5 after the babies' birth by puncture of the umbilical cord vein, from births through vaginal
6 delivery or cesarean section at Hospital General José G. Parres (Cuernavaca, Morelos,
7 Mexico), Hospital General de Temixco (Temixco, Morelos, Mexico), Instituto Nacional de
8 Perinatología (Mexico City, Mexico), with full informed consent from the mothers and the
9 ethical approval of the hospital (CONBIOÉTICA-17-CEI-001-20160329). An official
10 agreement (File 1372/1706) was granted by Servicios de Salud Morelos to collect the blood
11 samples in Cuernavaca and by the Instituto Nacional de Perinatología (2018-1-149).
12 Samples were processed immediately to obtain mononuclear cells by density gradient
13 centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield). Then, they were cultured overnight in tissue
14 culture dishes (cat. 353003, Corning) to eliminate adherent cells and obtain cord blood
15 mononuclear cells (CBMCs). To obtain CD4⁺ T cells, CBMCs were mixed with the
16 RosetteSep CD4⁺T-cell enrichment cocktail (STEMCELL) and 1 mL of cultured erythrocytes
17 from the same blood sample, and then separated by a second density gradient. Cells were
18 cultured at 37 °C and 5% CO₂ in supplemented RPMI medium (10% Fetal bovine serum, 1%
19 glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin) (Thermo Fisher Scientific). All
20 samples were at least 93% CD3⁺/CD4⁺, as determined by flow cytometry, and very similar
21 purities were obtained in all populations (Supplementary figure 1). The purity of our
22 populations of CD4⁺ T cells was evaluated with antibodies (anti-CD4 (20-0048-T100) and
23 anti-CD3 (20-0037-T100); TONBO biosciences). The absence of maternal cell contamination
24 and the unstimulated status were verified by staining for CD45RO and CD69, markers of
25 memory and activated T cells. Cells were stimulated by crosslinking both CD3 and CD28
26 antibodies (1 µg/mL) with a secondary antibody (Goat Anti-Mouse IgG Antibody (H + L) bs-
27 0296G, Bioss).

1 All samples from term pregnancies were delivered at the same public hospitals from
2 Secretaría de Salud Morelos (SSM), where the decision to have cesarean delivery was made
3 according to standard obstetric indications during labor, and all mothers received the same
4 care. For term deliveries, clinical evaluation was performed at birth, ensuring that samples
5 were obtained exclusively from clinically healthy mothers (at the time of delivery) and
6 neonates. We specifically excluded any cases involving maternal diseases like active
7 infections, or any other medical condition identified upon hospital admission. We also
8 excluded samples from neonates presenting clinical conditions that could influence
9 immune function at birth, including neonatal infection (confirmed by culture or compatible
10 clinical findings), congenital malformations, maternal fever during labor, and low Apgar
11 score.

12 Samples from preterm neonates were obtained from the Instituto Nacional de Perinatología,
13 a tertiary referral center specializing in the management of high-risk pregnancies, including
14 multiple gestations and other obstetric complications. Because prematurity frequently
15 occurs in the context of high-risk pregnancies, some mothers in this cohort had pregnancy-
16 associated conditions, including preeclampsia, obesity, or gestational diabetes, and some
17 received antibiotic treatment before delivery. Nevertheless, only mothers without evidence
18 of active infection or other acute illness at the time of delivery and clinically healthy
19 neonates were included in the study. Most preterm deliveries included in this cohort were
20 associated with fetal growth restriction rather than maternal infectious disease. The
21 characteristics of our neonatal cohort is described in Supplementary Table 1.

22 **RNA preparation and sequencing**

23 We prepared total RNA using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, 15596-018,
24 Invitrogen), as indicated by the manufacturer. RNA integrity was analyzed using a Bioanalyzer
25 nano-RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific), and only samples with an RNA Integrity Number
26 (RIN) > 8.0 were included. For each sample, 500 ng of total RNA was used to prepare an RNA-
27 seq library using the Illumina Stranded mRNA Prep Ligation kit, according to the
28 manufacturer's instructions. The samples were sequenced on the HiSeq-2500 Sequencer

(Illumina). Sequencing was performed in paired-end mode, with a read length of 75, and a sequencing depth of $47.04 \pm 11.3 \times 10^6$ reads per sample.

Transcriptome analysis

The workflow for transcriptome analysis was previously described by Kempis-Calanis *et al*⁷. Briefly, it consisted in: i) the evaluation of the Data quality using FASTQC program³³; ii) elimination of adaptors and low-quality reads with Trimmomatic program (version 0.39)³⁴; iii) reads alignment against the reference genome (GRCh38/hg38), using the STAR 2.4.2^a software³⁵; iv) visualization of the alignment with IGV³⁶; v) obtention of the read counts per gene with HTSeq-count³⁷; vi) Identification of the differentially expressed genes using DESeq2³⁸ package in R (Bioconductor). All samples were normalized and a design formula that accounted for the experimental groups (design = ~ group) was used. Differential expression analyses were then performed using the contrasts of interest: (1) term cesarean section (CS) versus term vaginal delivery (VD), (2) preterm cesarean section (PT) versus term cesarean section (CS). Differentially expressed genes (DEGs) were identified using our predefined statistical criteria ($|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$ and $\text{FDR} < 0.05$); vii) identification of the enriched pathways with ClusterProfiler³⁹ package in R, using the function EnrichKEGG; viii) visualization of the enriched pathways (enrichplot (Bioconductor)). We also performed an analysis of transcription factor activity based on the expression of their targets using decoupleR⁴⁰ package in R. Additionally, gene set enrichment analysis (GSEA)⁴¹ was performed in R using the whole DESeq2 results table and the clusterProfiler package. Finally, a protein-protein interaction (PPI) network was generated for the differentially expressed genes (DEGs) with the STRINGdb⁴² R package (v2.22.0), recovering all available interactions from the STRING database (v12.0) for Homo sapiens (taxonomyID: 9606). Interactions were filtered using a minimum score of 0.7 (high confidence), and isolated nodes were removed from the final network. The network was visualized and analyzed in Cytoscape (v3.10.4)⁴³. Functional enrichment analysis for Gene Ontology (GO) Biological Process terms was performed using the STRING enrichment function implemented in the stringApp plug-in for Cytoscape (v2.2.0)⁴⁴ to finalize network annotation.

Note: The anonymized RNA-seq datasets are deposited in the GEO repository (GSE322854).

Cell activation analysis

Cell response was measured by evaluation of i) the activation markers CD69 and CD25, and iii) AP-1 and NF- κ B activation. For the evaluation of activation markers, we used anti-CD69-FITC (cat. 310904, BioLegend) and anti-CD25-APC (cat. 20-0259-T100, Cytex). After 72 hours of stimulation, purified CD4⁺ T cells were collected and incubated with a cell viability reagent (Invitrogen) to assess viability, as well as with anti-CD69-FITC and anti-CD25-APC for 30 minutes at 4°C. After incubation, cells were washed with PBS containing 2% FBS, then fixed with 1% formaldehyde.

To assess transcription factor activation, we evaluated p65 and c-Jun phosphorylation by intracellular staining. Activation of p65 and c-Jun was assessed by evaluation of phosphorylation at specific residues. We used anti-phospho c-Jun (Ser63, cat. GTX61170, GeneTex), secondary anti-rabbit FITC-conjugated antibody (GeneTex), and anti-phospho p65 (Ser529)-APC (Milenyi Biotec). After cell stimulation, cord blood mononuclear cells (CBMCs) were collected and washed with PBS containing 2% FBS, then washed again with 1X PBS. Subsequently, CD4⁺ T cells were stained with anti-CD4-BV605 (cat. 317438, Biolegend) and a viability reagent (cat. L34975, Invitrogen), and incubated for 30 minutes at 4°C. After incubation, cells were washed with PBS supplemented with 2% FBS and then subjected to a permeabilization protocol, which included fixation with 1.5% formaldehyde for 10 minutes, permeabilization with cold absolute methanol for 10 minutes (0°C or -80°C), a wash with PBS supplemented with 2% FBS, incubation with the antibody solution for 30 minutes at 4°C, and a final wash followed by fixation with 1% formaldehyde. Samples were acquired on an Attune NxT cytometer (Invitrogen), and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, CA). Differences in the levels of activated proteins between conditions were assessed using Mann-Whitney or Wilcoxon tests in GraphPad Prism 7.

Proliferation assay

CBMCs were left untreated or activated through the TCR and CD28 molecules for 96 h in the presence of CFSE (cat. 21888, Sigma) 50 nM. CD4⁺ T cells were followed by staining the CD4 molecule (CD4-PerCP-Cyanine 5.5 (cat. 65-0048-T100, TONBO)). Cell division was evaluated by CFSE dilution using an Attune cytometer (Life Technologies) and analyzed with FlowJo X software. The percentage of divided cells was used for the statistical analysis. This represents the frequency of cells within the precursor population, or the fraction of the original population that underwent at least one division.

Soluble cytokines/molecules

Production of cytokines and other soluble molecules by CD4⁺ T cells (2×10^6 cells/mL) stimulated for 72h through the TCR and CD28 was evaluated using the Legendplex kit (cat. 741028, Biolegend), according to the manufacturer's instructions. The following cytokines were evaluated: Th1 (IFN- γ and TNF- α), Th2 (IL-13, IL-5, IL-6, and IL-4), Th9 (IL-9), Th17 (IL-17A and IL-17F), Th22 (IL-22), Treg (IL-10), and IL-2 with the standard Th kit. In addition, we evaluated innate cytokines (IL-7, IL-1 β , and IL-8), TGF- β , and cytotoxic molecules (GZMB and Perforin) relevant to neonatal cells using an ad hoc kit. Cytokine quantification was performed by flow cytometry using an Attune cytometer (Life Technologies).

3. Results

The type of birth is associated with a significant change in the gene expression profile

To investigate the impact of preterm birth and cesarean section on the gene expression profile of CD4⁺ T cells, we obtained transcriptomes of CD4⁺ T cells from preterm neonates born by cesarean section and full-term newborns born by cesarean section or vaginal delivery (VD). First, we purified cells from preterm newborns (28 to 33 wga) born by cesarean section (preterm, PT) and full-term babies (37 to 41 wga) born by cesarean section as controls (cesarean, CS). Additionally, we purified cells from neonates born full-term via vaginal delivery (VD) to compare them with those from term cesarean section. To ensure cell

1 purity and prevent cross-contamination with maternal blood, we evaluated CD45RO and
 2 CD69 expression in each sample by flow cytometry. As shown in Supplementary Figure 1, all
 3 cells showed comparable purity across populations. All samples had CD3+CD4+ purity
 4 above 93% and were negative for CD45RO^{hi} or CD69 expression. The transcriptome
 5 (Supplementary Tables 2-5) was analyzed as previously described⁷. As an indication of the
 6 dispersion of the data, we show a principal components graph (Fig. 1A). To our surprise, the
 7 biggest separation among the three different CD4⁺ T cell populations was found between
 8 CD4⁺ T cells obtained from neonates born at term by cesarean section (CS) and those of
 9 vaginal delivery (VD). Preterm (PT) samples were dispersed, perhaps because the ages
 10 varied between 28 and 33 wga. Preterm and full-term babies born by cesarean section
 11 showed no real separation in the PCA. We present a volcano plot of differentially expressed
 12 genes (DEGs) between vaginal delivery and cesarean section samples, showing 600
 13 differentially expressed genes (Fig. 1B). Some of the genes overexpressed by the natural birth
 14 cells were *IL1B*, *TNFA*, *CD40*, *LTBR*, *CD36*, *FOSB*, and *FGR*, which are involved in immune
 15 responses (Figure 1B). On the other hand, cells from cesarean sections expressed *KLF9*,
 16 *MIR186*, and *MIR1244-4*, all of which are associated with proliferation/differentiation. We
 17 used the overexpressed genes from these two populations to perform overrepresentation
 18 analysis with clusterProfiler³⁹. Only one pathway, taste transduction, was found enriched in
 19 the full-term cesarean section samples as compared to natural birth samples. This path
 20 contains genes from G protein signaling pathways with innate immune functions^{45,46}. In the
 21 VD samples, however, 27 pathways were found enriched (Supplementary Fig. 2A). The most
 22 significant pathways and their corresponding genes are shown in Figure 1C-D. These
 23 pathways are related to cytokine and chemokine expression, as well as their receptors,
 24 particularly those associated with inflammatory pathways such as TNF and IL-1; T cell
 25 activation; signal transduction (CD40, ICAM1, MPK, and FOSB), and cell motility
 26 (amoebiasis). Next, we identified differentially expressed genes between CD4⁺ T cells from
 27 preterm (PT) and full-term (CS) neonates, both from cesarean sections (Supplementary Fig.
 28 2B). Only 16 genes were found differentially expressed, with the overexpression of *CLIC3*, a
 29 chlorine channel involved in pH, volume, and cell growth regulation, *PTPRN2*, a phosphatase

involved in the secretory pathway, and PTGDR2 involved in prostaglandin metabolism. Overrepresentation analysis didn't identify any pathways enriched with these DEGs. All the DEGs from the 2 comparisons are shown in Supplementary Fig. 3.

We also performed gene set enrichment analysis to further identify processes and pathways potentially relevant to each of the three conditions. In the comparison between VD and CS samples, we identified Biological Processes and Pathways related to adaptive immune response, effector response, chemotaxis, and cytokine production in vaginal delivery CD4⁺ T cells, while CS transcriptomes were enriched for pathways of RNA processing and splicing (Fig. 2A-B and Supplementary Fig. 4). The protein-protein interaction network generated with these genes is shown in Fig. 2C, which shows two main subnetworks: the bigger one related to immune response (*TNF*, *CD36*, *CD40*, *ICAM1*, *NKG7*, *GNLY*, *IL-1 β* , *NLRP3*, *EOMES*, *TBX21*, *PTGS2*, *BCL6*, and others) and the smaller one related to regulation of cell cycle (*FOXM1*, *CDC45*, *MCM10*, *CDC20*, *TICRR*, *AURKB*, and others). When comparing PT and CS samples, a low oxygen response was observed in the PT samples (Fig. 2), as well as a notable enrichment of pathways related to proliferation, glycolysis, aminoacid biosynthesis, and the cytoskeleton (Supplementary Fig. 4).

To identify transcription factors potentially responsible for the observed transcriptomic signatures, we performed Transcription Factor Activity analysis with decoupleR⁴⁰. In Figure 3, we show the identified transcription factors (TF). When comparing VD and CS samples, we identified NF- κ B, AP-1, STAT1, 3, 6, 5A, HIF1A, and MYC activity in CD4⁺ T cells from vaginal delivery, which are typically associated with inflammatory responses.

These results expand our previous report, which showed that, compared with adult CD4⁺ T cells, neonatal cells from vaginal delivery exhibit a gene expression profile characterized by a limited immune response⁷. However, compared with CS cells, CD4⁺ T cells from VD exhibit an "immune activation" signature, presumably due to brief activation associated with vaginal delivery, though not reaching adult levels. On the other hand, the transcription factor analysis didn't identify statistically significant hits in the comparison between CS and PT samples, perhaps due to the small differences in gene expression.

Taken together, these results indicate that CD4⁺ T cells from vaginal delivery show a mild “immune activation” genomic signature, while cesarean section cells lack this immune signature.

Activation of CD4⁺ T cells is different according to the birth type

We next sought to determine whether differences existed in the responsiveness of the three CD4⁺ T cell populations to TCR/CD28 stimulation. Therefore, we stimulated CD4⁺ T cells from full-term neonates born by vaginal delivery or cesarean section, or preterm babies born by cesarean section, in vitro by crosslinking soluble antibodies (CD3/CD28) with an anti-mouse antibody for 72h, and evaluated the expression of the activation markers CD69 and CD25. As shown in Fig. 4A-B, CD4⁺ T cells from all three populations were similarly activated. Interestingly, CD25 expression was higher (23-51%) than CD69 expression (5-13%) in all three populations at that time point (Fig. 4B).

We also evaluated the phosphorylation of two important transcription factors as a measure of their activation upon TCR/CD28 signals, p-ser529-p65 (classical NF- κ B)⁴⁷ and p-ser63-c-Jun (classical AP-1)⁴⁸, as previously reported⁴⁹. The gating strategy for these evaluations is shown in Supplementary Fig. 5A. All three populations showed p65 activation (phosphorylation) upon stimulation (Fig. 4C and E), whereas preterm cells exhibited lower MFI levels (Fig. 4C). However, we were not able to evaluate other members of the NF- κ B family. On the other hand, a higher induction of c-Jun activation (phosphorylation) was observed in the samples from vaginal delivery as compared to both term and preterm neonates born by cesarean section (Fig. 4D-F). However, the cesarean section term CD4⁺ T cells showed lower activation of c-Jun upon stimulation, while preterm cells showed overall lower activation (Fig. 4F). This is in agreement with the higher expression of MAPKs and c-Fos in the natural birth samples in the transcriptomic analysis (Fig. 1D), as well as with the high activity of Jun and Fos identified in the Transcription factor activity analysis (Fig. 3). Of note, it has been reported that heightened Calcium signaling, but lower NFAT activation and NFAT-mediated transcription, occur in neonatal T cells^{50,51}. In this regard, it has been

described that activation of NFAT (calcium signals) without proper activation of AP-1 signals can lead to the activation of the Th2 cytokine profile, characterized by a higher expression of IL-4 and IL-13, and predisposing to allergies and asthma, as has been observed in the cesarean section-born neonates⁵².

T cells from preterm and full-term neonates born by cesarean section show high proliferation rates

We evaluated the proliferation of the three CD4⁺ T cell populations in response to activation by soluble antibodies (CD3/CD28). The gating strategy used for this is shown in Supplementary Fig. 5B. In response to stimulation by TCR/CD28 signals, all the populations proliferated for up to three or four generations (Fig. 5A). A higher percentage of cell division was observed in CD4⁺ T cells from cesarean section babies, both full-term and preterm (Fig. 5B). This is consistent with the gene expression profile and functional annotation of preterm CD4⁺ T cells (Fig. 2), which indicate cell cycle progression. This high activation-induced proliferation in preterm and cesarean cells contrasts with the results for transcription factor activation, particularly for c-Jun, which was more pronounced in vaginal delivery CD4⁺ T cells but did not reach the same levels in preterm cells.

CD4⁺ T cells produce cytokines from all Th phenotypes when stimulated in isolation

To evaluate the functional properties of the three neonatal CD4⁺ T cell subsets, cells were stimulated through TCR/CD28 for 72 h. Cytokines representative of major T helper (Th) lineages were then quantified in culture supernatants using a LegendPlex multiplex assay and analyzed by flow cytometry. Upon TCR/CD28 stimulation, CD4⁺ T cells from all three populations produced IL-2 (Fig. 6). However, average production was highest in preterm cells, followed by those from vaginal delivery, and only a small production was detected in cesarean section cells, as shown in Figs. 6 and 7.

1 CD4⁺T cells from vaginal delivery produced a significant amount of all four Th2 cytokines (IL-
2 4, IL-5, IL-6, and IL-13). Cells obtained from the full-term cesarean section neonates only
3 induced a small amount of IL-13. On the other hand, cells from preterm neonates showed
4 higher expression of all Th2 cytokines, with markedly elevated IL-13 production.

5 The evaluation of Th1 cytokines showed, as expected, no significant induction of IFN- γ upon
6 stimulation, yet, within the low amount of this cytokine, a higher level was observed in the
7 cells of vaginal delivered neonates compared with those from cesarean section. Again, a
8 high degree of dispersion was observed in preterm neonates, with some samples showing
9 higher IFN- γ levels. TNF- α expression was observed in full-term babies, with lower levels in
10 cesarean section neonates. The cells of the preterm babies showed a very high expression
11 of this cytokine.

12 From the Th17 profile, only IL-17F showed a significant induction by TCR/CD28 signals in full-
13 term neonates. However, the expression of this cytokine was significantly higher in preterm
14 cells than in term cells from cesarean section neonates.

15 Regarding the Treg phenotype, IL-10 was expressed in all stimulated cells, with a tendency
16 to higher expression in preterm cells, while TGF- β 1 was not detected.

17 On the other hand, IL-22 was induced by TCR/CD28 signals in all cell populations, but was
18 higher in preterm babies than in cesarean section neonates. Finally, IL-9 expression was very
19 low in all samples.

20 Other molecules relevant to neonatal cell biology were also evaluated, like innate cytokines
21 (IL-1 β and IL-8), and cytotoxic molecules (GZMB and PRF), which are shown in Fig. 6 & 7.

22 Only two samples of pre-term babies induced the expression of IL-1 β . The chemokine IL-8
23 was produced in all three cell populations of neonatal T cells, as was previously described⁵³.

24 Interestingly, Granzyme B expression was stimulated by TCR/CD28 signals, whereas perforin
25 expression remained stable, with higher expression in cells from babies born by vaginal
26 delivery at term and pre-term by cesarean section. The biological significance of this
27 expression in neonatal CD4⁺ T cells is yet to be determined.

1 Although not all comparison reached statistical significance, due to aspects such as high
2 dispersion of the data, present among all groups but especially important in preterm
3 samples, it is clear that stimulation (CD3/CD28) induces the production of all cytokines,
4 which is stronger in PT samples, then VD samples, and barely detectable in CS samples, as
5 shown in Fig. 7. Also, mean expression of all cytokines and molecules induced is much
6 higher in preterm (PT) samples than Term samples.

7 To further explore neonatal T cell activation, we evaluated cytokine production upon
8 stimulation in the presence of other mononuclear cells (CBMCs). T cells express a more
9 restricted panel of cytokines and molecules (Supplementary Fig. 6). Of note, only IL-6, IL-10,
10 IL-1 β , and IL-8 are produced in all three populations, as well as Granzyme B and perforin.
11 However, IL-1 β is more produced in natural delivery CBMCs, which also produce IL-5. On the
12 other hand, in cells from preterm babies, IL-5, IL-13, IL-17F, and IL-22 are also significantly
13 produced. Besides IL-8, which is the most highly expressed across all three populations, IL-
14 6, IL-13, IL-17F, and Granzyme B are the most highly expressed in preterm CBMCs. The
15 mechanism underlying the discrepancies between the cytokines and molecules produced
16 by CD4⁺ T cells in isolation and those produced in the presence of other CBMCs is unclear,
17 but one possible explanation is the direct or indirect roles of the other cells present in the
18 CBMC culture, such as CD8⁺ T cells.

20 4. Discussion

21 The transcriptomic results identified a genomic signature of CD4⁺ T cells from vaginal
22 delivery (VD) compared with those from cesarean section (CS) in term neonates. The gene
23 expression profile was enriched for pathways and processes associated with immune
24 responses, including T cell activation, cytokine pathways (TNF, IL1, and IL17), and Integrin
25 and adhesion molecule signaling (Figs. 1-3). We call this feature of CD4⁺ T cells the “vaginal
26 delivery-associated immune activation” signature, which is linked to a greater response to
27 TCR/CD28 stimulation *in vitro*. However, it remains unclear whether this immune activation
28 signature is an effect of parturition, indicates neonatal T cells' participation in labor

1 induction, or both, or is attributable to other confounding factors that cannot be excluded.
2 One possible hypothesis is the bystander activation of neonatal CD4⁺ T cells during labor,
3 driven by signals that promote parturition, such as maternal cytokines^{54,55}. However, other
4 hypotheses, such as stress molecules from passage through the birth canal or longer-term
5 changes in oxygen levels, among others, cannot be excluded. Mothers of all full-term
6 neonates were from the same hospital, were clinically healthy, and received no
7 pharmacological treatments before birth. On the other hand, most mothers of preterm
8 newborns received antibiotic treatment, and some presented with obesity or preeclampsia,
9 while one mother had gestational diabetes. Of note, at the moment of delivery, there weren't
10 symptoms or diagnostic of infection or inflammatory conditions for any of the mothers or the
11 newborns participating in the study. Although it is possible that the results from preterm
12 samples were affected by the conditions of the mothers, it is unlikely. The transcriptome of
13 pre-term samples clustered with that of full-term cesarean section babies. Furthermore,
14 pre-term birth samples didn't express CD45RO or CD69 before stimulation, but showed
15 strong proliferation and a high production of pro-inflammatory cytokines upon activation.

16 Following *in vitro* stimulation with soluble antibodies (CD3/CD28), CD4⁺ T cells from all three
17 populations showed similar levels of activation markers (CD25 and CD69) at 72h. Notably,
18 CD69 levels were low (5-13%) in neonatal T cells, while CD25 was more expressed (25-51%)
19 in all three populations upon stimulation. This indicates that typical T cell activation markers
20 may not function similarly in neonatal cells. Additionally, we evaluated p65 (NF-κB) and c-
21 Jun (AP-1) phosphorylation as a proxy of their activation. Higher activation (phosphorylation)
22 of c-Jun and p65 was observed in vaginal delivery (VD) and cesarean section (CS) CD4⁺ T
23 cells as compared to pre-term (PT) ones (Fig. 4). This could affect the gene expression profile
24 of PT CD4⁺ T cells, including genes that require AP-1 or NF-κB activation. Of note, it has been
25 previously reported that neonatal VD CD4⁺ T cells have diminished AP-1-dependent
26 transcription when compared to their adult counterparts⁵¹. Notably, it has been reported
27 that NFATc2 expression and NFAT activation in neonatal T cells are also diminished relative
28 to those in adult naïve cells^{50,56,57}. However, we cannot exclude the possibility of other AP-1
29 and/or NF-κB members participating.

1 Regarding cell proliferation in response to stimulation (TCR/CD28), a higher percentage of
2 cell division was observed in CD4⁺ T cells from CS babies, both full-term and preterm (Fig.
3 5), as compared to VD cells. This contrasts with c-Jun activation, which is higher in VD
4 samples.

5 Upon stimulation, purified CD4⁺ T cells from VD produced small but significant amounts of
6 cytokines from phenotypes Th1, Th2, Th17, Th22, Treg, IL-8, IL-2, and cytotoxic molecules
7 granzyme B and perforin (Figs. 6 & 7). However, when stimulated in the CBMC mixture, T cells
8 only produced IL-5, IL-6, IL-1 β , IL-8, granzyme B, and perforin. This suggests that full-term
9 neonatal CD4⁺ T cells from VD have great immune potential, which may be modulated by
10 their regulatory environment, either through soluble or cellular factors. Another confounding
11 factor could be the reactivity of the CD8⁺ T cells present in these mixtures, which may also
12 produce cytokines and other molecules. On the other hand, CD4⁺ T cells from term CS
13 neonates produce very low levels of only a few cytokines, including detectable levels of IL-
14 2, IL-13, TNF- α , IL-17F, IL-10, and IL-22, as well as normal levels of IL-8, granzyme B, and
15 perforin. Of note, CS CD4⁺ T cells produce fewer IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , and perforin than VD
16 cells. In the CBMCs mixture, CS cells produce only IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8, granzyme, and
17 perforin. This might indicate that CS cells are blocked from a Th1 response, while VD cells
18 are more prone to respond in this way, which correlates with T-bet (TBX21) expression in VD
19 cells (Fig. 2C). This is in agreement with the previously reported predisposition of cesarean
20 section newborns to asthma and allergies^{31,58}.

21 Preterm (PT) cesarean CD4⁺ T cells express a variable quantity of cytokines, with a high
22 average. Due to dispersion, not all data were significant; however, cytokines IL-2, IL-6, IL-17F,
23 TNF- α , and IL-8, as well as the molecules granzyme B and perforin, were produced at high
24 levels by these cells in isolation. This is consistent with previous reports associating IL-6⁵⁹,
25 TNF- α ⁶⁰ and IL-8⁶¹ in preterm CD4⁺ T cells. Notably, CD4⁺ T cells from preterm neonates
26 produced significantly higher levels of IL-6, IL-13, IL-17F, IL-22, granzyme B, and perforin than
27 CD4⁺ T cells from cesarean section (CS) neonates. In the culture of CBMCs, preterm (PT) T
28 cells produce IL-5, IL-6, IL-13, IL-17F, IL-10, IL-22, IL-1 β , IL-8, granzyme B, and perforin. Of
29 those, IL-5 and IL-22 were produced in higher amounts than in cesarean section (CS) term T

1 cells. These results further support the notion that preterm CD4⁺ T cells are highly pro-
2 inflammatory, as previously suggested^{59,62}. Moreover, more cytokines and molecules might
3 be relevant in the pathophysiology of preterm birth beyond those previously recognized. In
4 particular IL-6, IL-13, TNF- α , and IL-17F may play important roles in the immune
5 dysregulation associated with prematurity.

6 Together, our findings suggest that neonatal CD4⁺ T cells acquire the capacity to mount
7 inflammatory responses in utero, before term, as evidenced by the heightened functional
8 profile observed in preterm neonates. By full-term gestation, these cells appear to transition
9 toward a more regulated or tolerogenic state, with reduced responsiveness, as evidenced by
10 samples obtained from cesarean section deliveries. In contrast, the physiological processes
11 associated with vaginal birth appear to actively influence CD4⁺ T cell reprogramming,
12 promoting a more complex and functionally balanced immune profile, which is responsible
13 for the “immune activation” profile and functional responsiveness observed in this study.
14 This vaginal delivery-associated program likely reflects exposure to perinatal environmental
15 cues that fine-tune CD4⁺ T cell responsiveness within the broader cellular and tissue
16 context.

18 **Acknowledgments and sources of funding**

19 We thank the Transcriptomics and Genomics Marseille-Luminy (TGML) sequencing
20 platform. We thank Hospital General José G. Parres (Cuernavaca, Morelos, Mexico), Hospital
21 General de Temixco (Temixco, Morelos, Mexico), and the Instituto Nacional de Perinatología
22 (Mexico City, Mexico). We also thank all the mothers and babies who donated samples for
23 this study. Work in the SS laboratory was supported by recurrent funding from the Institut
24 National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Aix-Marseille University, and the
25 Ligue Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2023). Work in the ORJ lab was supported by the
26 SECIHTI grant CF2019 1727995. CJVM and ACB received PhD grants (960641 and 1136695,
27 respectively) from SECIHTI. LAKC receives a Postdoc grant from SECIHTI (BP-PM-
28 20250513122652290-11414813).

Data availability statement

The anonymized RNA-seq datasets are deposited in the GEO repository GSE322854.

Authorship contribution statement

CJVM and LAKC participated in the investigation and formal analysis, wrote the original manuscript, and revised the final version. SMG, ACB, IYCC, and SVR participated in the investigation. ACHR, CI, and SS revised the manuscript. AS participated in the conceptualization of the idea, oversaw the project, wrote the original manuscript, edited, and revised the final version. ORJ conceptualized the idea, oversaw the project, wrote the original manuscript, edited and revised the final version.

5. References

1. Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, et al. Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults. *The Journal of Immunology*. 2009;183(11):7150-7160. doi:10.4049/jimmunol.0901481
2. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity*. 2012;37(5):771-783. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.014
3. Chen L, Cohen AC, Lewis DB. Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006;12(2):160-171. doi:10.1016/j.bbmt.2005.10.027
4. Debock I, Flamand V. Unbalanced Neonatal CD4+ T-Cell Immunity. *Front Immunol*. 2014;5(August):1-7. doi:10.3389/fimmu.2014.00393
5. Sinnott BD, Park B, Boer MC, Lewinsohn DA, Lancioni CL. Direct TLR-2 Costimulation Unmasks the Proinflammatory Potential of Neonatal CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology*. 2016;197(1):68-77. doi:10.4049/jimmunol.1501297
6. Galindo-Albarrán AO, López-Portales OH, Gutiérrez-Reyna DY, et al. CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Rep*. 2016;17(8):2151-2160. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.056

7. Kempis-calanis LA, Rodríguez-jorge O, Gutiérrez-reyna DY, et al. Neonatal CD4+T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with proliferation and yet a limited immune response. *J Leukoc Biol.* 2024;Jun(Jun 2024):1-13. doi:10.1093/jleuko/qiad162
8. Bermick JR, Issuree P, DenDekker A, et al. Differences in H3K4me3 and chromatin accessibility contribute to altered T-cell receptor signaling in neonatal naïve CD4 T cells. *Immunol Cell Biol.* 2022;100:562-579. doi:10.1111/imcb.12561
9. Palin AC, Ramachandran V, Acharya S, Lewis DB. Human Neonatal Naïve CD4 + T Cells Have Enhanced Activation-Dependent Signaling Regulated by the MicroRNA miR-181a . *The Journal of Immunology.* 2013;190(6):2682-2691. doi:10.4049/jimmunol.1202534
10. Kempis-Calanis LAA, Rodríguez-Jorge O, Ventura-Martínez CJ V., et al. Unique Characteristics of Neonatal T Cells. *Med Res Arch.* 2023;11(1):1-10. doi:10.18103/mra.v11i1.3568
11. Lamadrid-Figueroa H, Fritz J. The impact of excessive caesarean deliveries on gestational age at birth in Mexico: National-level trends, 2010–2023. *Women's Health.* 2025;21:1-12. doi:10.1177/17455057251399895
12. Dhaded, Somannavar SM and, Vernekar, et al. Neonatal mortality and coverage of essential newborn interventions 2010-2013: a prospective, population-based study from low-middle income countries. *Reprod Health.* 2015;12(Suppl. 2):S6.
13. Goedicke-Fritz S, Härtel C, Krasteva-Christ G, Kopp M V., Meyer S, Zemlin M. Preterm birth affects the risk of developing immune-mediated diseases. *Front Immunol.* 2017;8(OCT):1-6. doi:10.3389/fimmu.2017.01266
14. Alqurashi MA. Impact of Mode of Delivery on the Survival Rate of Very Low Birth Weight Infants : A Single-Center Experience. *Cureus.* 2020;12(12):1-7. doi:10.7759/cureus.11918
15. Marchant EA, Kan B, Sharma AA, et al. Attenuated innate immune defenses in very premature neonates during the neonatal period. *Pediatr Res.* 2015;78(5):492-497. doi:10.1038/pr.2015.132
16. Lavoie PM, Huang Q, Jolette E, et al. Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. *Journal of Infectious Diseases.* 2010;202(11):1754-1763. doi:10.1086/657143
17. Sossou D, Ezinmegnon S, Agbota G, et al. Regulatory T cell homing and activation is a signature of neonatal sepsis. *Front Immunol.* 2024;15(July):1-17. doi:10.3389/fimmu.2024.1420554

- 1 18. Liu J, Joseph S, Manohar K, et al. Role of innate T cells in necrotizing enterocolitis. *Front*
2 *Immunol.* 2024;10(February):1-8. doi:10.3389/fimmu.2024.1357483
- 3 19. Qazi KR, Bach Jensen G, van der Heiden M, et al. Extremely Preterm Infants Have
4 Significant Alterations in Their Conventional T Cell Compartment during the First Weeks
5 of Life. *The Journal of Immunology.* 2020;204(1):68-77. doi:10.4049/jimmunol.1900941
- 6 20. Egozi A, Olaloye O, Werner L, et al. Single-cell atlas of the human neonatal small intestine
7 affected by necrotizing enterocolitis. *PLoS Biol.* 2023;21(5):1-29.
8 doi:10.1371/journal.pbio.3002124
- 9 21. Shaffer Z, Romero R, Tarca AL, et al. The Vaginal Immunoproteome for the Prediction of
10 Spontaneous Preterm Birth. *Elife.* 2024;12:1-36. doi:10.2139/ssrn.4259790
- 11 22. Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, et al. Fetal T Cell Activation in the Amniotic Cavity during
12 Preterm Labor: A Potential Mechanism for a Subset of Idiopathic Preterm Birth. *The*
13 *Journal of Immunology.* 2019;203(7):1793-1807. doi:10.4049/jimmunol.1900621
- 14 23. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr M a, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M.
15 Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol.* 2014;000(April):0.
16 doi:10.1038/cmi.2014.46
- 17 24. Mikkelsen E, Amabebe E, Olmos-Ortiz A, et al. The Pathophysiology of Spontaneous
18 Preterm Birth: Emerging Mechanisms Reviewed by the Preterm Birth International
19 Collaborative. *Reproductive Sciences. Springer Nature.* Preprint posted online May 1,
20 2026. doi:10.1007/s43032-026-02108-5
- 21 25. Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, et al. Fetal T Cell Activation in the Amniotic Cavity during
22 Preterm Labor: A Potential Mechanism for a Subset of Idiopathic Preterm Birth. *The*
23 *Journal of Immunology.* 2019;203(7):1793-1807. doi:10.4049/jimmunol.1900621
- 24 26. Angolile CM, Max BL, Mushemba J, Mashauri HL. Global increased cesarean section rates
25 and public health implications: A call to action. *Health Sci Rep.* 2023;6(5):1-5.
26 doi:10.1002/hsr2.1274
- 27 27. Thomaidi S, Sarantaki A, Tzitziridou Chatzopoulou M, Orovou E, Jotautis V, Papoutsis D.
28 The Rising Global Cesarean Section Rates and Their Impact on Maternal and Child Health:
29 A Scoping Review. *J Clin Med.* 2025;14(22):1-14. doi:10.3390/jcm14228102
- 30 28. Jauniaux E, Bartels HC, Nieto-Calvache AJ, Hussein AM. Evolution of modern cesarean
31 delivery: historic perspective and new challenges. *Am J Obstet Gynecol. Elsevier Inc.*
32 2026;233(6):S557-S568. doi:10.1016/j.ajog.2025.03.008

- 1 29. Martín-Calvo N, Martínez-González MA, Segura G. Cesarean delivery is associated with
2 higher risk of overweight in the offspring: within family analysis in the SUN cohort.
3 *Journal of Epidemiological Community Health*. 2020;74(7):586-591. doi:10.1136/jech-
4 2019-213724.Cesarean
- 5 30. Liu Y, Sun K, Gan Y, et al. RNA - Sequencing Reveals Gene Expression and Pathway
6 Signatures in Umbilical Cord Blood Affected by Birth Delivery Mode. *Phenomics*.
7 2023;3(3):228-242. doi:10.1007/s43657-022-00086-7
- 8 31. Laimighofer M, Lickert R, Fuerst R, et al. Common patterns of gene regulation associated
9 with Cesarean section and the development of islet autoimmunity – indications of
10 immune cell activation. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-42750-5
- 11 32. Keshet A, Rossman H, Shilo S, et al. Estimating the effect of cesarean delivery on long-
12 term childhood health across two countries. *PLoS One*. 2022;17(10 October):1-18.
13 doi:10.1371/journal.pone.0268103
- 14 33. Sheng Q, Vickers K, Zhao S, et al. Multi-perspective quality control of Illumina RNA
15 sequencing data analysis. *Brief Funct Genomics*. 2017;16(4):194-204.
16 doi:10.1093/bfpg/elw035
- 17 34. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence
18 data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- 19 35. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner.
20 *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
- 21 36. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. Integrative Genome Viewer. *Nat*
22 *Biotechnol*. 2011;29(1):24-26. doi:10.1038/nbt.1754.Integrative
- 23 37. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput
24 sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166-169. doi:10.1093/bioinformatics/btu638
- 25 38. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for
26 RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/s13059-014-
27 0550-8
- 28 39. Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting
29 omics data. *Innovation*. 2021;2(3):100141. doi:10.1016/j.xinn.2021.100141
- 30 40. Badia-I-Mompel P, Vélez Santiago J, Braunger J, et al. decoupleR: ensemble of
31 computational methods to infer biological activities from omics data. *Bioinformatics*
32 *Advances*. 2022;2(1):1-3. doi:10.1093/bioadv/vbac016

- 1 41. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-
2 based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S*
3 *A*. 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
- 4 42. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023 : protein – protein
5 association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of
6 interest. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(November 2022):638-646.
- 7 43. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape : A Software Environment for Integrated
8 Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res*. 2003;13(Feb 19):2498-2504.
9 doi:10.1101/gr.1239303.metabolite
- 10 44. Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. Cytoscape StringApp: Network Analysis
11 and Visualization of Proteomics Data. *J Proteome Res*. 2019;18(2):623-632.
12 doi:10.1021/acs.jproteome.8b00702.Figure
- 13 45. Wen J, Ma X, Zhou X, et al. Molecular basis for the activation of the bitter taste receptor
14 TAS2R14 by Ritonavir. *PLoS One*. 2025;20(9):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0332704
- 15 46. Rudolph E, Dychtenberg H, Pozniak A, Pundir P. Bitter Taste Receptors in Bacterial
16 Infections and Innate Immunity. *Immunity, Inflammation and Disease Inflammation and*
17 *Disease*. 2025;13(2025):1-22. doi:10.1002/iid3.70232
- 18 47. Maguire O, Loughlin KO, Minderman H. Simultaneous assessment of NF- κ B/p65
19 phosphorylation and nuclear localization using imaging flow cytometry ☆. *J Immunol*
20 *Methods*. 2015;423:3-11. doi:10.1016/j.jim.2015.03.018
- 21 48. Behre G, Whitmarsh AJ, Coghlan MP, et al. c-Jun is a JNK-independent coactivator of the
22 PU.1 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(8):4939-4946.
23 doi:10.1074/jbc.274.8.4939
- 24 49. Rodríguez-Jorge O, Kempis-Calanis LA, Abou-Jaoudé W, et al. Cooperation between T cell
25 receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4+ T cell activation. *Sci Signal*.
26 2019;12(577):1-11. doi:10.1126/scisignal.aar3641
- 27 50. Kaminski BA, Kadereit S, Miller RE, et al. Reduced expression of NFAT-associated genes in
28 UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood*.
29 2003;102(13):4608-4617. doi:10.1182/blood-2003-05-1732
- 30 51. Palin AC, Ramachandran V, Acharya S, Lewis DB. Human Neonatal Naive CD4 + T Cells
31 Have Enhanced Activation-Dependent Signaling Regulated by the MicroRNA miR-181a .
32 *The Journal of Immunology*. 2013;190(6):2682-2691. doi:10.4049/jimmunol.1202534

52. Macian F. NFAT PROTEINS : KEY REGULATORS OF T-CELL DEVELOPMENT AND FUNCTION. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(June):472-484. doi:10.1038/nri1632
53. 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.* 2014;20(10):1206-1210. doi:10.1038/nm.3670
54. Gomez-lopez N, Stlouis D, Lehr MA, Sanchez-rodriguez EN, Arenas-hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol.* 2014;(April):571-581. doi:10.1038/cmi.2014.46
55. Miller D. Maternal and fetal T cells in term pregnancy and preterm labor. *Cell Mol Immunol.* 2020;(April). doi:10.1038/s41423-020-0471-2
56. Weitzel RP, Lesniewski ML, Haviernik P, et al. microRNA 184 regulates expression of NFAT1 in umbilical cord blood CD4+ T cells. *Blood.* 2009;113(26):6648-6657. doi:10.1182/blood-2008-09-181156
57. 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. *Journal of immunology.* 2013;190(6):2682-2691. doi:10.4049/jimmunol.1202534
58. Liu Z, Xie L, Liu X, et al. Cesarean section and the risk of allergic rhinitis in children : a systematic review and meta - analysis. *Sci Rep.* 2023;13(13):1-13. doi:10.1038/s41598-023-44932-8
59. Misra R, Fowell D, Shah S, Wang H. Preterm Cord Blood CD4+ T Cells Exhibit Increased IL-6 Production in Chorioamnionitis and Decreased CD4+ T Cells in Bronchopulmonary Dysplasia. *Hum Immunol.* 2015;76(5):329-338. doi:10.1016/j.humimm.2015.03.007.Preterm
60. Govindaraj D. Effects of extremely preterm birth on cytokine and chemokine responses induced by T-cell activation during infancy. *Clin Transl Immunology.* 2024;13(1510):1-14. doi:10.1002/cti2.1510
61. 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.* 2014;20(10):1206-1210. doi:10.1038/nm.3670
62. Pereira RA, Amantéa SL. The Immune System of Preterm Infant : A Review for the Pediatrician. *Annals of Pediatric & Child Health.* 2025;13(2):1-10.

Figure legends

Figure 1. Transcriptomic profiling of CD4⁺ T cells from neonates born at term by vaginal delivery and cesarean section, or preterm neonates. (A) Principal component analysis of CD4⁺ T cells from neonates born by vaginal delivery (VD) or cesarean section (CS) at term, and preterm (PT). **(B)** Volcano plot showing the differentially expressed genes between vaginal delivery and cesarean section samples. **(C)** Pathway enrichment by over-representation analysis with clusterProfiler between vaginal delivery and cesarean section samples. **(D)** Network of genes and pathways of the vaginal delivery condition.

Figure 2. Gene set enrichment analysis and protein–protein interaction (PPI) network. (A) Gene set enrichment analysis of CD4⁺ T cells from full-term neonates born by vaginal delivery (VD) or cesarean section (CS), or preterm cells **(B)**, using the GO Biological Processes databases. **(C)** Protein–protein interaction (PPI) network of differentially expressed genes in CD4⁺ T cells from VD and CS neonates constructed using the STRING database and annotated with the most representative GO Biological Processes terms.

Figure 3. Transcription factor activity in neonatal CD4⁺ T cells. (A) Heatmap showing inferred transcription factor activity scores (z-scores) for selected transcription factors across individual samples from neonates born by vaginal delivery (VD), cesarean section (CS), and preterm birth (PT). Colors indicate relative activity levels, ranging from low (blue) to high (red). Samples and transcription factors were organized using unsupervised hierarchical clustering. **(B)** Comparative analysis of transcription factor activity between vaginal delivery and cesarean section. Bars represent differential activity scores, ordered from lowest to highest, with color indicating the associated *p*-value. **(C)** Comparative analysis of transcription factor activity between preterm birth and cesarean section, displayed analogously to panel B.

Figure 4. Evaluation of CD69 and CD25 markers and transcription factors activation. (A-B) We assessed T cell activation by measuring the expression of CD69 and CD25 on the cell surface. Purified CD4⁺ T cells from term and preterm neonates were either left unstimulated or stimulated under the indicated conditions for 72 hours. The percentages of CD69⁺ and CD25⁺ T cells were determined by flow cytometry. Mean values are shown above the error bars. **(C-D)** For transcription factor activation, we evaluate phosphorylation of c-Jun and p65 as markers of AP-1 and NF- κ B activation, respectively. CBMCs were either left unstimulated or stimulated under the indicated conditions for 90 minutes (to measure c-Jun activation) or 60 minutes (for p65 activation). Mean fluorescence intensity (MFI) values for the indicated phosphoproteins were determined by flow cytometry. **(E-F)** MFI normalized values. The Wilcoxon test was used for paired samples, and the Mann-Whitney U test was used for unpaired samples. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. For the evaluation of CD69 and CD25 expression, the sample sizes were vaginal delivery = 13, cesarean = 9, and preterm = 3. For the evaluation of transcription factor activation, the sample sizes were: vaginal delivery = 7, cesarean = 8, and preterm = 5.

Figure 5. Proliferation assay. CBMCs from term and preterm neonates were stained with CFSE and either left unstimulated or stimulated by crosslinking CD3 and CD28 molecules for 96 hours, followed by staining with anti-CD4-PerCP-Cy5.5. **(A)** Representative histograms of CFSE dilution in vaginal delivery, cesarean section, and preterm birth samples; **(B)** Percentage of division in unstimulated or stimulated CD4⁺ T cells. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon test for paired samples and the Mann-Whitney U test for unpaired samples. * $P < 0.05$. The sample sizes were as follows: vaginal delivery = 5, cesarean = 6, preterm = 5.

Figure 6. T helper cytokines, innate cytokines, and cytotoxic molecules produced by CD4⁺ T cells. Purified CD4⁺ T cells from term and preterm neonates were either left unstimulated or stimulated by crosslinking CD3 and CD28 molecules for 72 hours.

Cytokines were measured in the supernatants of cultured cells. Cytokine concentrations were analyzed using the Wilcoxon test for paired samples and the Kruskal–Wallis test for unpaired samples, followed by the original Benjamini–Hochberg (BH) false discovery rate (FDR) correction for multiple comparisons. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. The number of samples were: vaginal delivery = 16, cesarean = 7, and preterm = 4.

Figure 7. Heatmap of cytokine and cytotoxic molecules production by CD4⁺ T cells. Heatmap showing the normalized concentrations of T helper cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-9, IL-10, TGF- β 1 and IL-2), innate cytokines (IL-8 and IL-1 β), and cytotoxic molecules (Granzyme B and Perforin) produced by CD4⁺ T cells from neonates born by vaginal delivery (VD), cesarean section (CS), or preterm (PT) under basal or stimulated (CD3/CD28) conditions. Cytokine concentrations were normalized by row (Z-score of $\log_{10}(\text{concentration} + 1)$). Columns represent individual donors, while rows correspond to each cytokine or effector molecule. The top annotations indicate the experimental condition (Basal or CD3/CD28) and the study group (VD, CS, or PT). Color intensity reflects relative concentration levels, with blue indicating higher and yellow lower values. The number of samples were: vaginal delivery = 16, cesarean = 7, and preterm = 4.

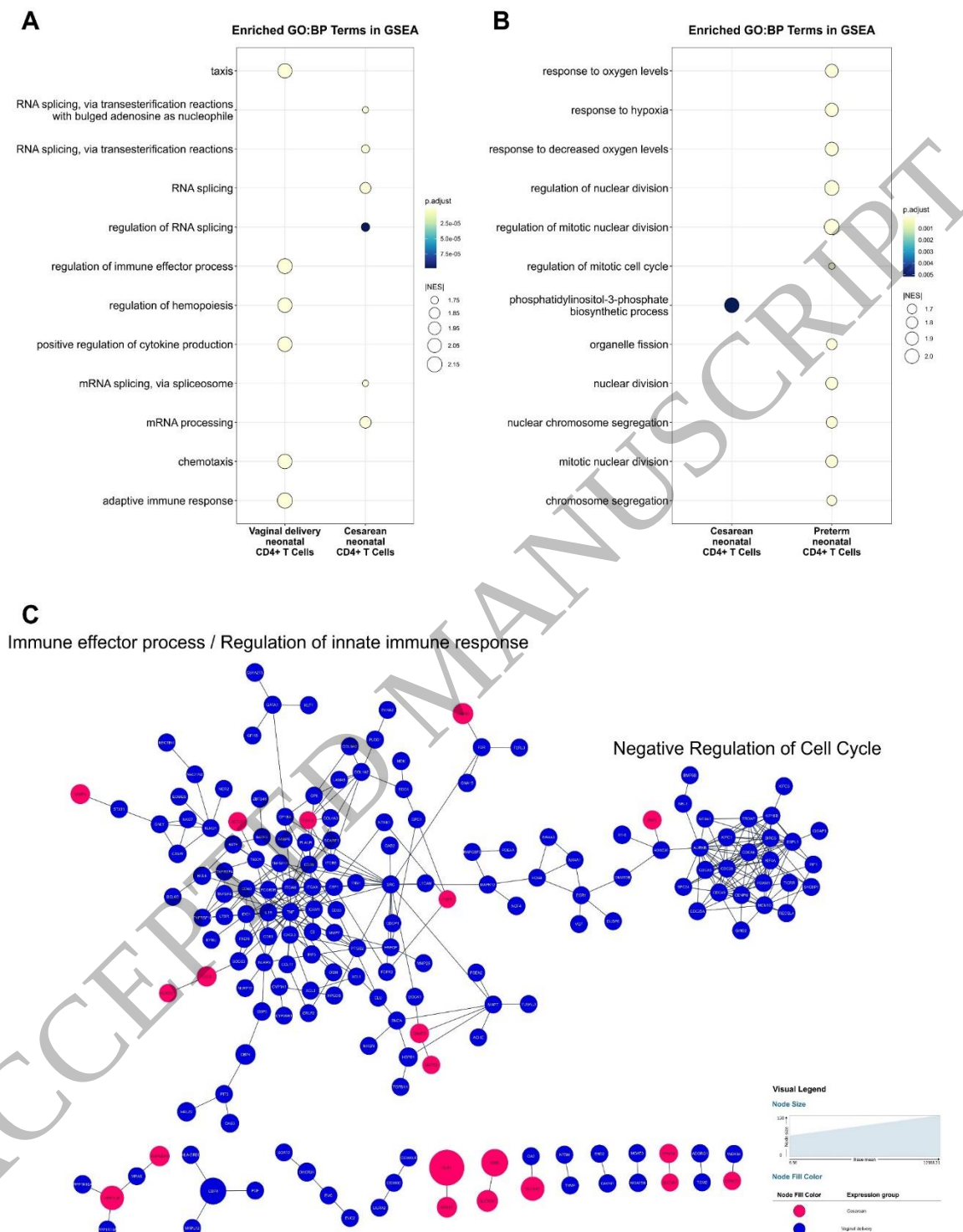


Figure 2
216x279 mm (x DPI)

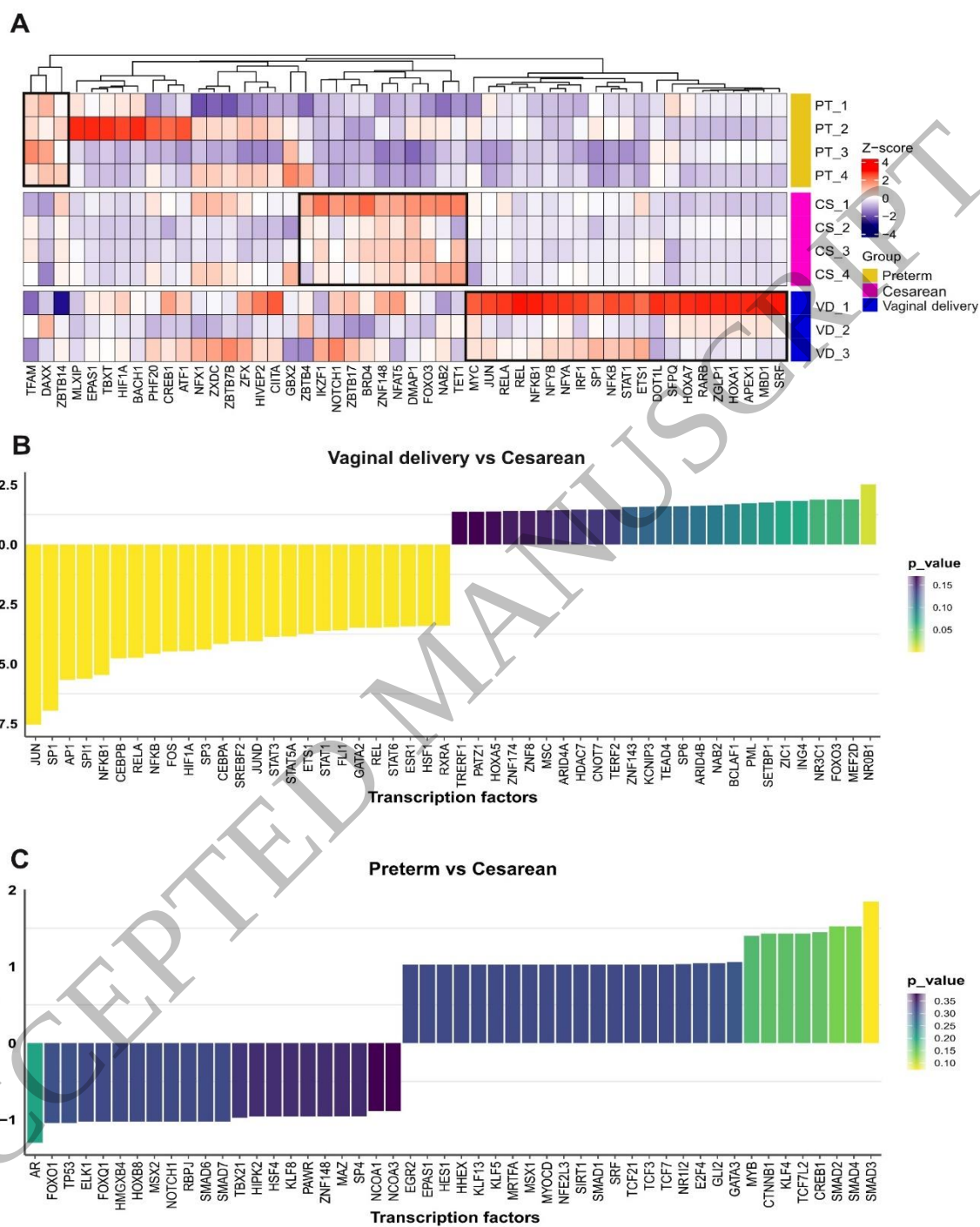


Figure 3
216x279 mm (x DPI)

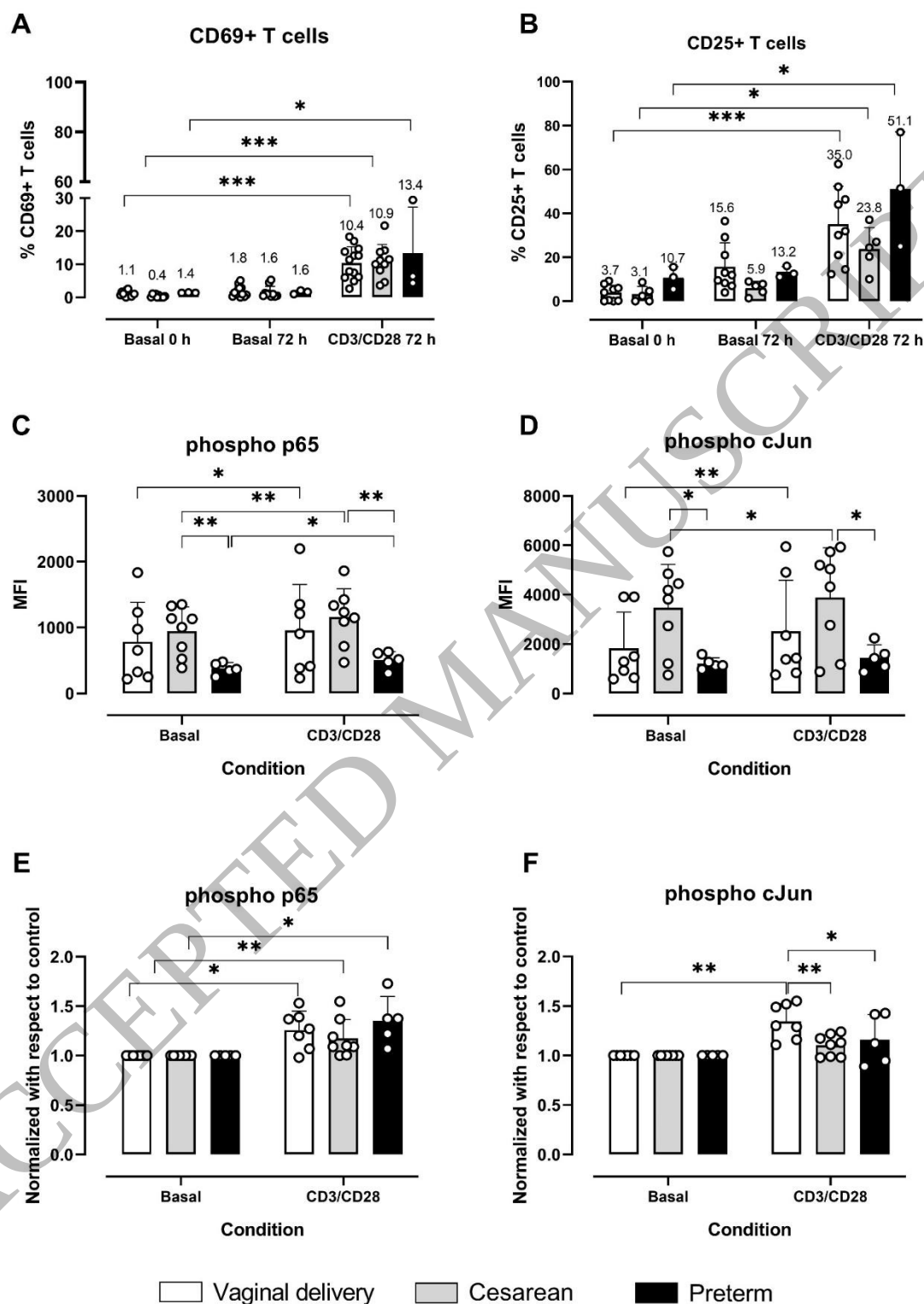


Figure 4
205x272 mm (x DPI)

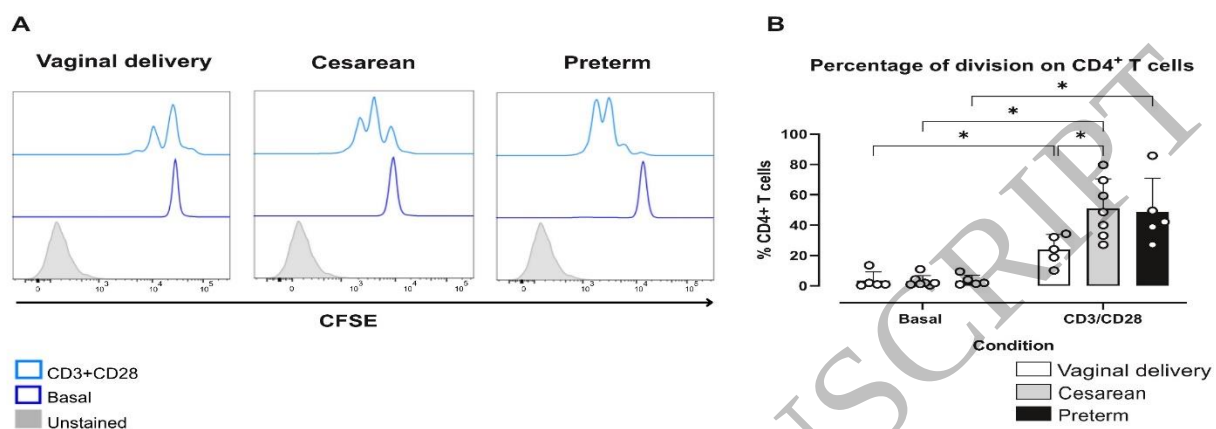


Figure 5
279x216 mm (x DPI)

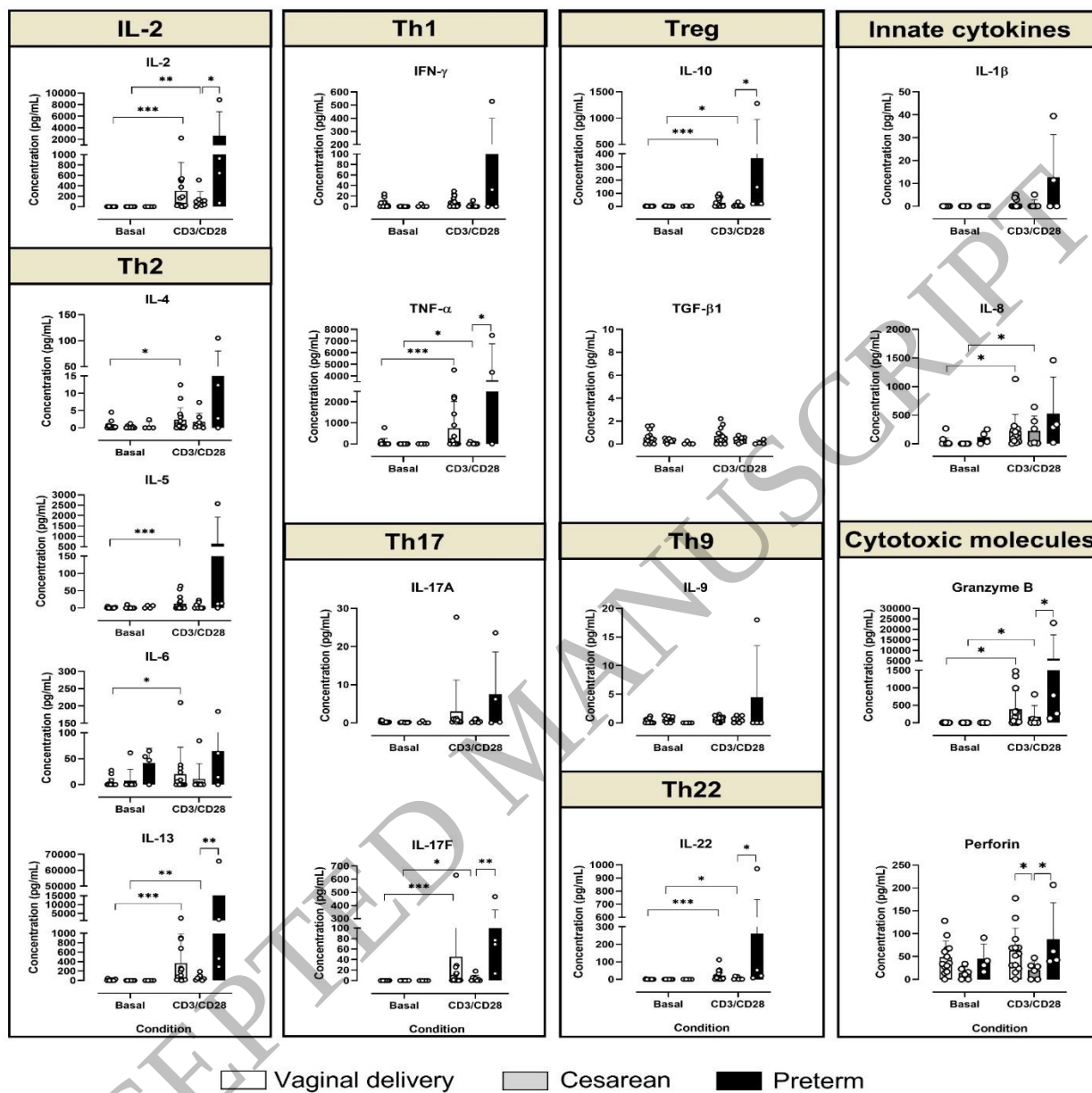


Figure 6
220x253 mm (x DPI)

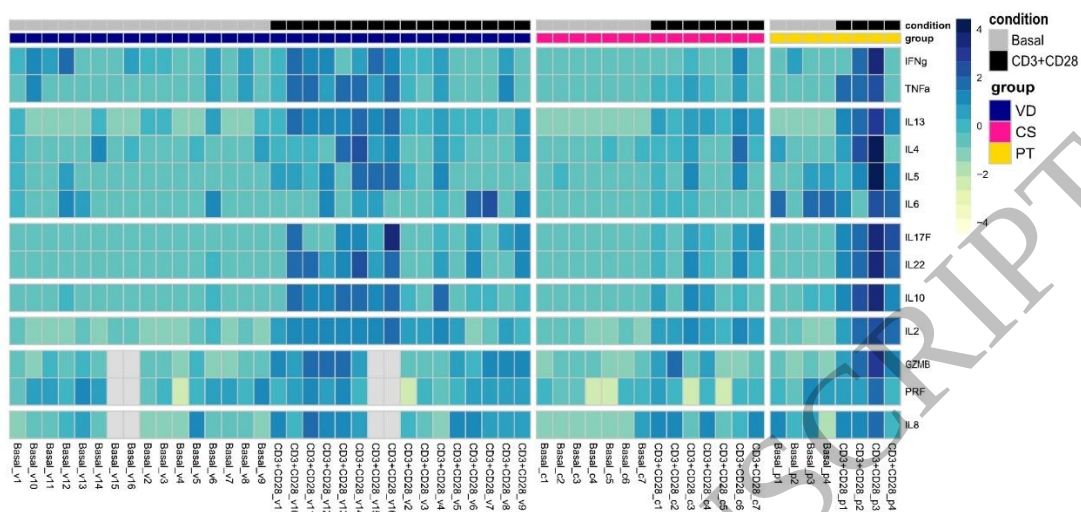


Figure 7
210x297 mm (x DPI)

Neonatal CD4⁺ 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,^{1,†} Otoniel Rodríguez-Jorge,^{1,*†,‡} Darelly Yarazeth Gutiérrez-Reyna,¹ Carlos Jesús Ventura-Martínez,¹ Salvatore Spicuglia,² Alejandra Medina-Rivera,³ Denis Thieffry,⁴ Aitor González,² and María Angélica Santana^{1,*†} 

¹Laboratorio 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

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

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

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

*Corresponding authors: Email: santana@uaem.mx; orj@uaem.mx

Abstract

The adaptive immune response is coordinated by CD4⁺ T cells, which determine the type and strength of the immune response and the effector cells involved. It has been reported that CD4⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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.¹ 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.^{2,3} 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.^{4,5} 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.^{6–11}

It has been shown that neonatal CD4⁺ T cells respond differently from adult cells, with a high production of IL-8,¹² a prevalent Th2 over Th1 profile that has been shown in mice, and an innate inflammatory response.^{3,4} 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,¹³ and higher levels of IL-13 were reported in neonatal serum and cord blood mononuclear cells (CBMC) stimulated with phytohaemagglutinin.¹⁴ 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⁺ T cells.¹⁵ At the level of cell signaling, neonatal CD4⁺ T cells display enhanced calcium signals, probably mediated by miR181a, but reduced AP-1 activation, probably contributing to the lower activation of the cells.¹⁶ A recent study evaluating open chromatin regions of neonatal and adult CD4⁺ T cells showed that the chromatin of adult cells is more open as compared to that of neonatal cells.¹⁷

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

[†] These authors equally contributed to this work.

[‡] These authors share the last authorship.

cytotoxicity and signal transduction genes.¹⁸ 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.¹⁹ Based on a qualitative dynamical model of the corresponding network, we predicted that this could negatively impact cell activation.¹⁹ Activation of neonatal CD8⁺ 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.²⁰

Several lines of evidence have suggested that neonatal CD4⁺ T cells respond differently as compared to the adult cells,^{21,22} 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⁺ T cells, we would be able to identify this regulatory network to expand our knowledge of neonatal CD4⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ T cells involved the closed chromatin mark H3K27me3, which maintains closed the adult-specific genes in neonatal CD4⁺ T cells. Then, using ChromHMM, we generated a model of chromatin states to characterize the specific epigenetic landscape of neonatal CD4⁺ 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⁺H3K4me1⁺). Neonatal CD4⁺ 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⁺ 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^{hi} 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⁺ T cells were isolated from mononuclear cells using the RosetteSep CD4⁺ 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% CO₂. The purity of our populations of CD4⁺CD3⁺CD45RO⁻ 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 × 10⁶ 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 × 10⁶.

2.3 Data analysis

Data quality was evaluated using the FASTQC program.²³ Adaptors and low-quality reads were cut using Trimmomatic²⁴ 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^a 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.²⁵ Read counts per gene were obtained using the software HTSeq-count.²⁶ To identify differentially expressed genes, we used the DESeq2 package in R (Bioconductor).²⁷ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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 γ and TNF α), 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⁺ T cells and stimulated them by crosslinking CD3 and CD28 for 72 h. Cells were cultured at a density of 2×10^6 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⁺) neonatal CD4⁺ T-cell samples and 4 naive (CD45RA⁺) adult CD4⁺ 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 ± 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 BinnerizeBed-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⁺; state 12) and enhancers (H3K4me1⁺H3K27ac⁺; 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 ± 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 ± 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⁺ 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⁺ T cells have a unique transcriptome

CD4⁺ T cells coordinate adaptive immune response, are crucial for the activation of other immune cells, and can shape antibody responses. In neonates, however, CD4⁺ T cells have a high threshold of activation and a low effector function.^{7–9,28,29} To better understand the functionality of these cells, we performed RNA-seq analysis of unstimulated CD4⁺ 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 Ensembl³⁰ 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),³¹ 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 repair³²; BCL11A, an important regulator of early lymphopoiesis, also involved in chromatin remodeling through its association with the SWI/SNF³³; and TOX, which is involved in the maturation of T cells and in the inhibition of effector functions, driving also T-cell exhaustion.³⁴ Also remarkable is the expression of the homeobox genes, HOXA and HHEX, which are involved in developmental processes³⁵; HOXA3 is particularly involved in thymus development.³⁶ CEBPA codes for a transcription factor controlling enhancer expression and function and regulates proliferation.³⁷ 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^{38,39} 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⁺ T cells.^{40–42}

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.

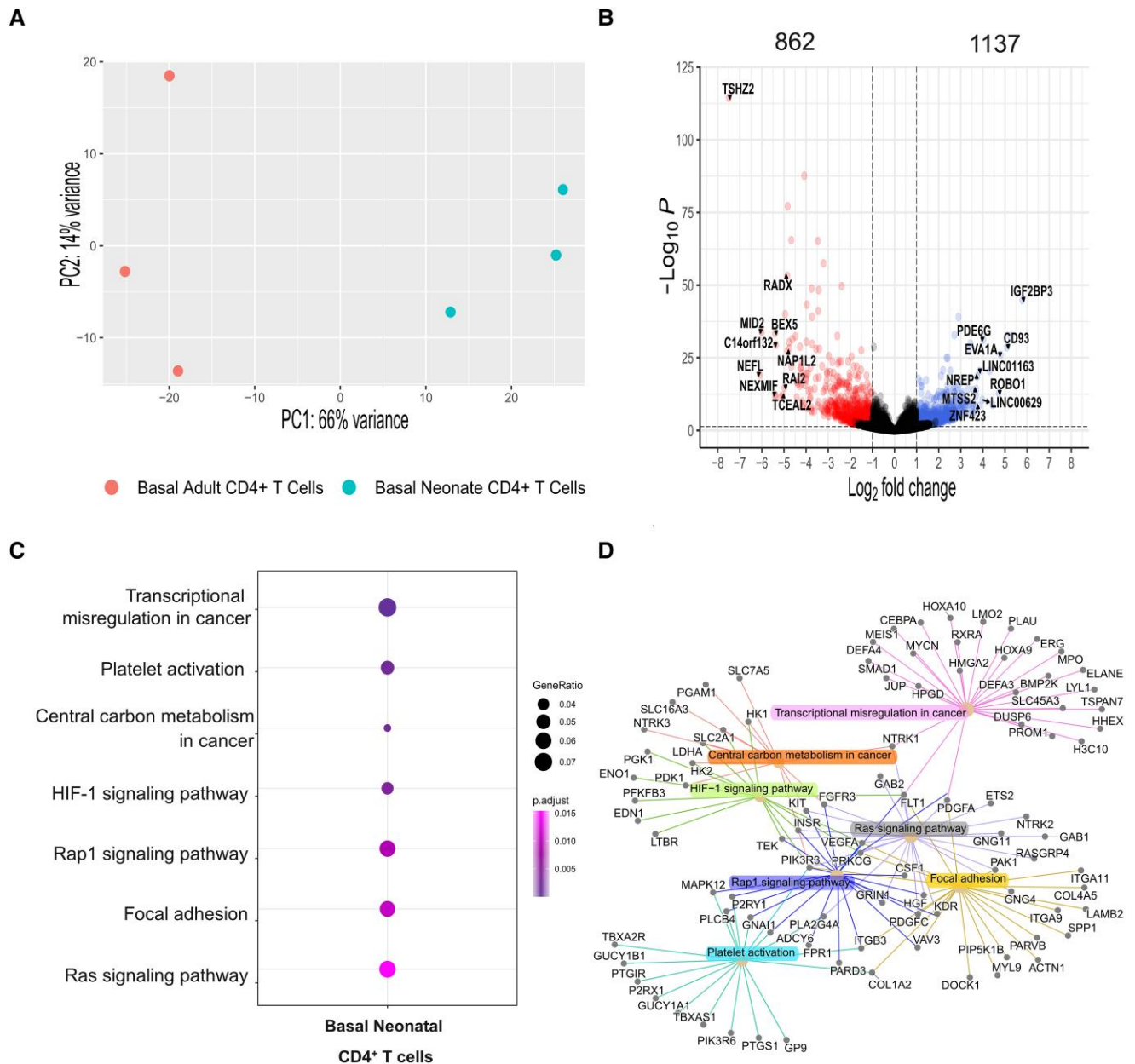


Fig. 1. Differentially expressed genes between unstimulated naive neonatal and adult CD4⁺ T cells. (A) Principal components analysis showing naive neonatal and adult cells. (B) Volcano plot displaying the differentially expressed genes in basal adult vs neonatal CD4⁺ T cells. (C) Functional analysis 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⁺ 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⁺ T cells.⁴³ 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⁺ population did not change the general protein expression profile ([Fig. 2A](#)).

Next, we evaluated neonatal and adult CD4⁺ 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

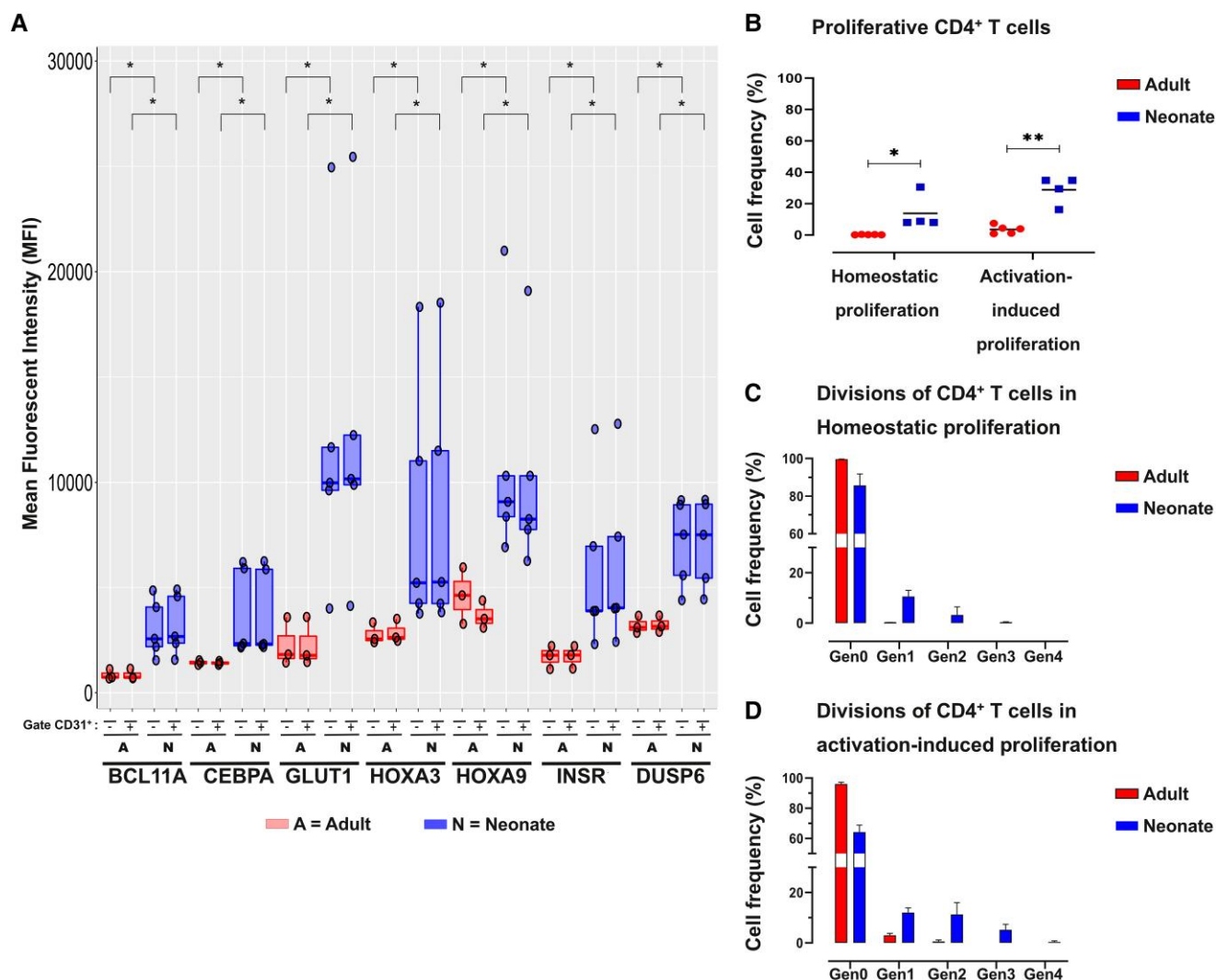


Fig. 2. Changes in protein expression and proliferation assays. (A) Protein expression in unstimulated cells was evaluated by intracellular flow cytometry in the general living cells gate and the CD31⁺ cells gate of the same samples to evaluate simultaneously protein expression in the CD4⁺ T populations 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⁺ 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^{44,45}

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⁺ 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

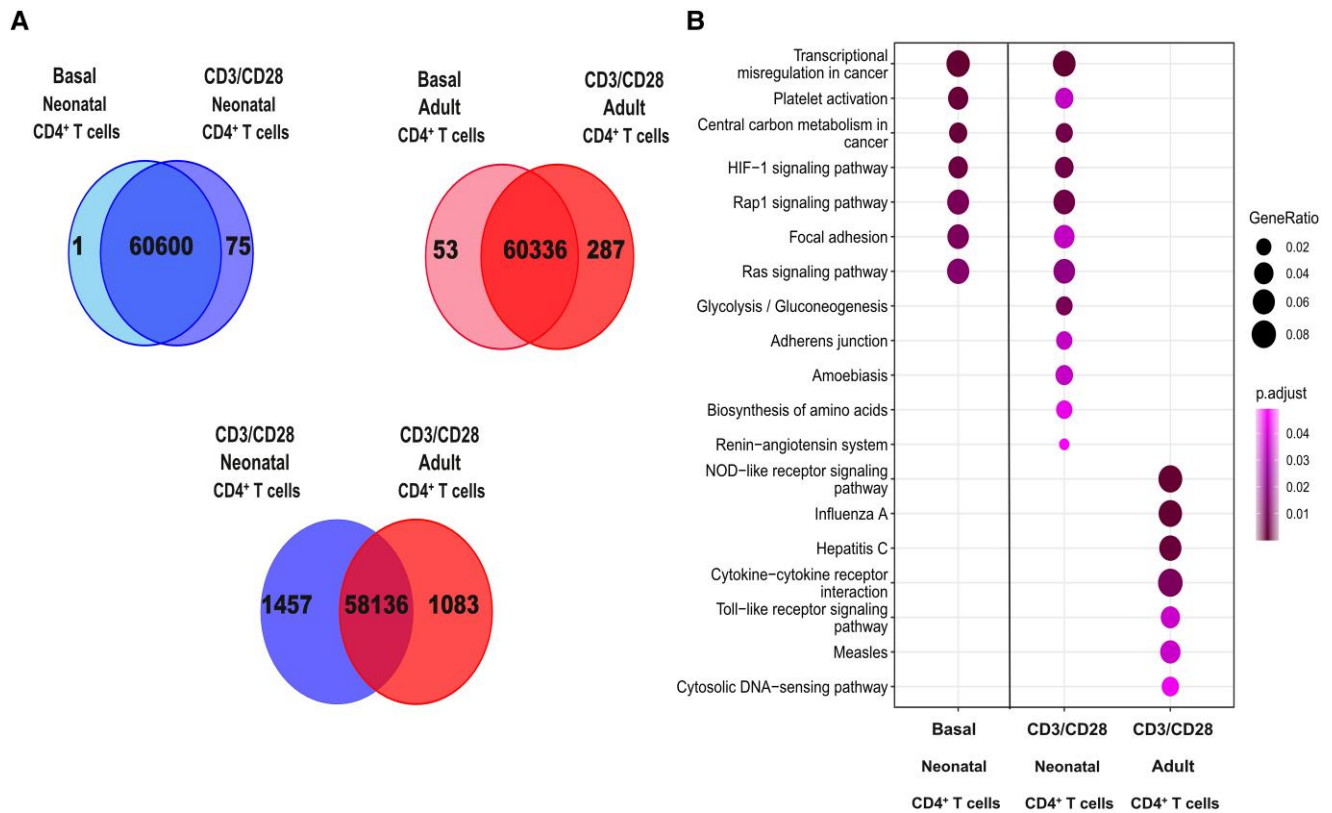


Fig. 3. Gene expression analysis of neonatal and adult CD4⁺ T cells after stimulation with CD3/CD28 signals. (A) Venn diagrams show the number of differentially expressed genes upon stimulation in neonatal or adult cells. (B) Functional annotation of the differentially expressed genes showing the enriched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

Next, we aimed to explore the epigenetic landscape underlying the characteristic gene expression profile of neonatal CD4⁺ 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 (± 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⁺ 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⁺ 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

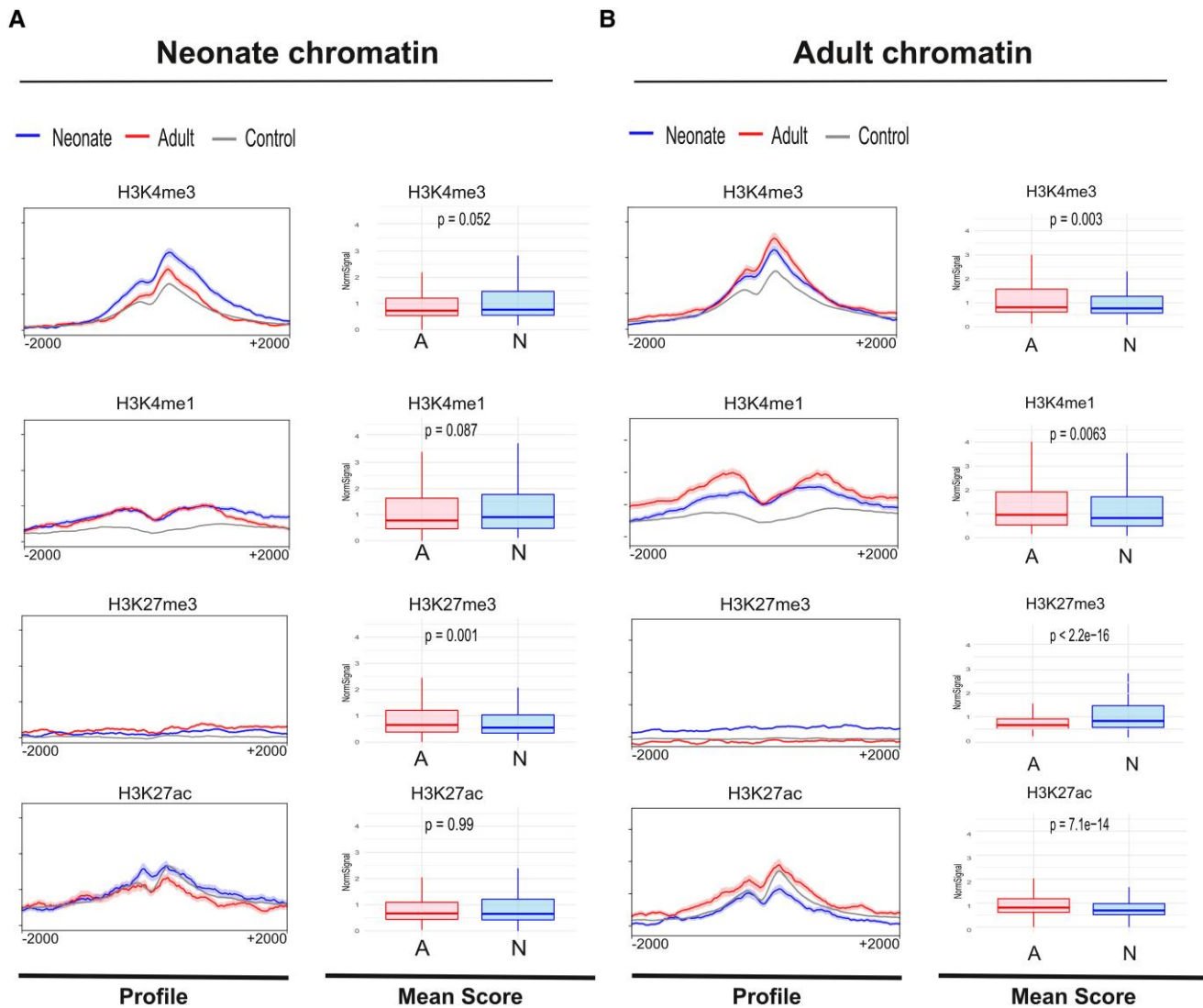


Fig. 4. Histone marks in promoter regions of genes overexpressed in neonatal or adult CD4⁺ T cells. Representative histone mark profiles (H3K4me3, H3K4me1, H3K27me3, and H3K27ac) in promoter regions (around TSS) of genes overexpressed in neonatal (A) and adult cells (B), as compared to genes that were 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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 both neonate 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.

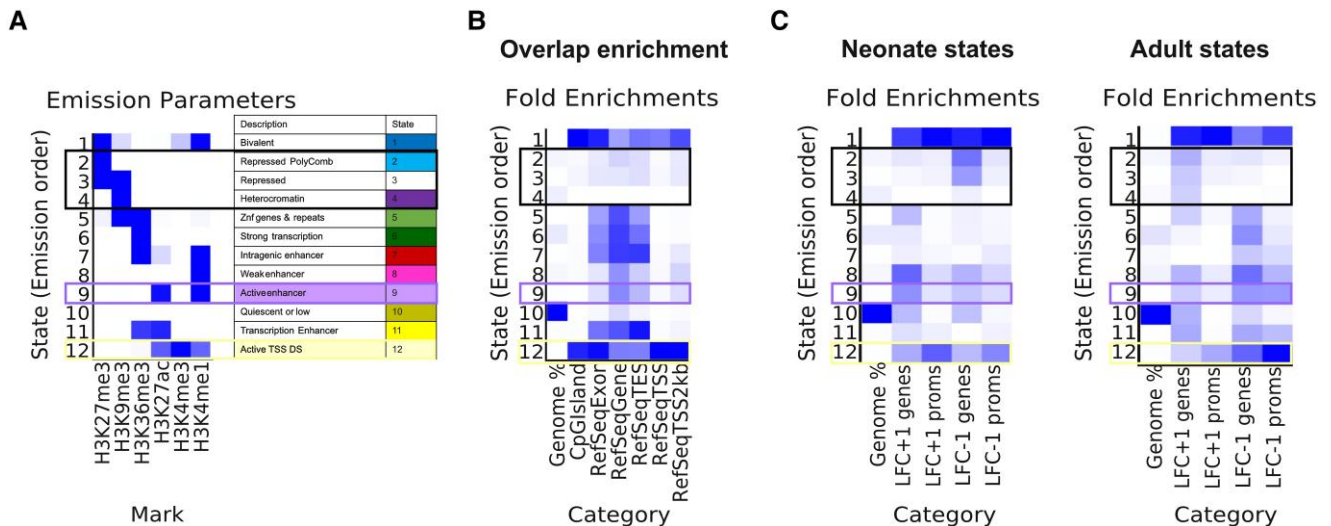


Fig. 5. The epigenetic landscape of the neonatal and adult CD4⁺ T cells. Chromatin states were computed with the software ChromHMM (A) generating a 12-state model. The color code for the ChromHMM states is shown. (B) Genome-wide region enrichment for the chromatin states. (C) Enrichment of relevant chromatin regions (differentially expressed genes and promoters) with chromatin states for adult and neonatal cells. LFC + 1: overexpressed in neonatal cells with log2 fold change >1. LFC-1: overexpressed in adult cells with log2 fold change <-1. Proms: promoters.

To further understand the potential function of regulatory regions enriched in the neonatal and adult CD4⁺ 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,⁴⁶ 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⁺ 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 repair³²; Bcl11a transcription factor, which binds the SWI/SNF chromatin remodelers³³; CEBPA, a transcription factor controlling enhancer expression and function, metabolism, proliferation, and myeloid cell development³⁷; and the transcription factor TOX, which is a master negative regulator of effector functions, reported for T-cell exhaustion.³⁴

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⁺ T cells, particularly those coding for the family of HOXA transcription factors.^{47,48} This was unexpected, as a progressive downmodulation of HOXA transcripts has been reported during thymic cell maturation,^{31,49} while sustained expression of HOXA genes during T-cell differentiation has been shown to impair T-cell maturation and induce oncogenic transformation.³¹ 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

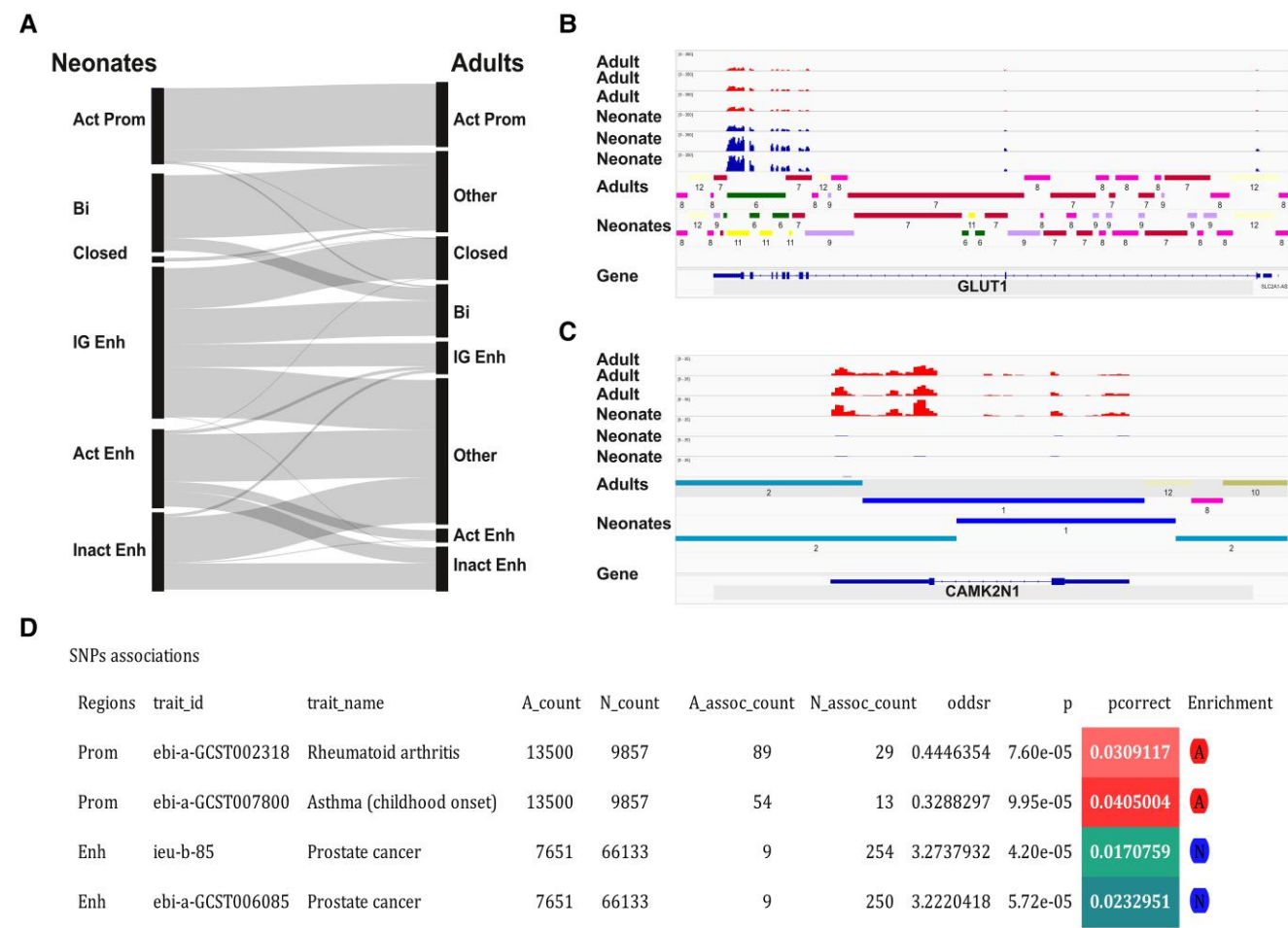


Fig. 6. Changes in the chromatin states between neonate and adult cells. (A) Sankey plot showing the changes between relevant chromatin states. (B, C) Genomic tracks for 2 selected genes overexpressed in neonatal cells or in adult cells, with their chromatin state annotations shown, with the color and 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⁺ T cells.¹⁸ Several characteristics are shared in the neonatal CD4⁺ T cells, such as cell cycle, antiviral response pathways, and antimicrobial peptides expression, but there are also important differences. Specifically, in neonatal CD4⁺ T cells, genes of the TCR signaling pathway were associated with active enhancers, which suggests that CD4⁺ T cells are readier to activate cell signaling upon the proper maturation stimuli. Negative signaling is also more strongly associated with the CD4⁺ 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⁺ T cells in response to stimulation, which was not found in the CD8⁺ T-cell population. Remarkably, neonatal CD4⁺ 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⁺, 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.⁵⁰ It has been claimed that cord blood does not represent neonates' blood,⁵¹ 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.⁵⁰

In any case, our data show that neonatal CD4⁺ 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 cells⁵² 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.⁵¹ 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.⁵³ It will be interesting to characterize these enzyme functions in the neonatal T cells.

Altogether, our results explain many characteristics of the neonatal CD4⁺ 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

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

2. Chen N, Field EH. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation*. 1995;59(7):933–941. <https://doi.org/10.1097/00007890-199504150-00002>
3. Debock I, Flamand V. Unbalanced neonatal CD4(+) T-cell immunity. *Front Immunol*. 2014;5:393. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00393>
4. Rudd BD. Neonatal T cells: a reinterpretation. *Annu Rev Immunol*. 2020;38(1):229–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-091319-083608>
5. Tsafaras GP, Ntontsi P, Xanthou G. Advantages and limitations of the neonatal immune system. *Front Pediatr*. 2020;8:5. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00005>
6. Glaesener S, Jaenke C, Habener A, Geffers R, Hagendorff P, Witzlau K, Imelmann E, Krueger A, Meyer-Bahlburg A. Decreased production of class-switched antibodies in neonatal B cells is associated with increased expression of miR-181b. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192230>
7. Mastelic-Gavillet B, Vono M, Gonzalez-Dias P, Ferreira FM, Cardozo L, Lambert PH, Nakaya HI, Siegrist CA. Neonatal T follicular helper cells are lodged in a pre-T follicular helper stage favoring innate over adaptive germinal center responses. *Front Immunol*. 2019;10:1845. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01845>
8. Gans HA, Arvin AM, Galinus J, Logan L, DeHovitz R, Maldonado Y. Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *JAMA*. 1998;280(6):527–532. <https://doi.org/10.1001/jama.280.6.527>
9. Marshall-Clarke S, Reen D, Tasker L, Hassan J. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today*. 2000;21(1):35–41. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01548-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01548-0)
10. Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*. 2001;19(25-26):3331–3346. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00028-7)
11. Mohr E, Siegrist CA. Vaccination in early life: standing up to the challenges. *Curr Opin Immunol*. 2016;41:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.04.004>
12. Gibbons D, Fleming P, Virasami A, Michel ML, Sebire NJ, Costeloe K, Carr R, Klein N, Hayday A. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nat Med*. 2014;20(10):1206–1210. <https://doi.org/10.1038/nm.3670>
13. Webster RB, Rodriguez Y, Klimecki WT, Vercelli D. The human IL-13 locus in neonatal CD4+ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture. *J Biol Chem*. 2007;282(1):700–709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609501200>
14. Silberer J, Ihorst G, Kopp MV. Cytokine levels in supernatants of whole blood and mononuclear cell cultures in adults and neonates reveal significant differences with respect to interleukin-13 and interferon-gamma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(2):140–147. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00605.x>
15. Ribeiro-do-Couto LM, Boeije LC, Kroon JS, Hooibrink B, Breur-Vriesendorp BS, Aarden LA, Boog CJ. High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur J Immunol*. 2001;31(11):3394–3402. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200111\)31:11<3394::AID-IMMU3394>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200111)31:11<3394::AID-IMMU3394>3.0.CO;2-B)
16. 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*. 2013;190(6):2682–2691. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202534>
17. Bermick JR, Issuree P, den Dekker A, Gallagher KA, Santillan D, Kunkel S, Lukacs N, Schaller M. Differences in H3K4me3 and chromatin accessibility contribute to altered T-cell receptor signaling in neonatal naive CD4 T cells. *Immunol Cell Biol*. 2022;100(7):562–579. <https://doi.org/10.1111/imcb.12561>
18. Galindo-Albarran AO, Lopez-Portales OH, Gutierrez-Reyna DY, Rodriguez-Jorge O, Sanchez-Villanueva JA, Ramirez-Pliego O, Bergon A, Llorid B, Holota H, Imbert J, et al. CD8(+) t cells from human neonates are biased toward an innate immune response. *Cell Rep*. 2016;17(8):2151–2160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.056>
19. Sanchez-Villanueva JA, Rodriguez-Jorge O, Ramirez-Pliego O, Rosas Salgado G, Abou-Jaoude W, Hernandez C, Naldi A, Thieffry D, Santana MA. Contribution of ROS and metabolic status to neonatal and adult CD8+ T cell activation. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226388>
20. Gutierrez-Reyna DY, Cedillo-Banos A, Kempis-Calanis LA, Ramirez-Pliego O, Bargier L, Puthier D, Abad-Flores JD, Thomas-Chollier M, Thieffry D, Medina-Rivera A, et al. IL-12 signaling contributes to the reprogramming of neonatal CD8(+) T cells. *Front Immunol*. 2020;11:1089. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01089>
21. Kempis-Calanis LA, Rodríguez-Jorge O, Ventura-Martínez CJ, Gutiérrez-Reyna DY, Spicuglia S, Santana MA. Unique characteristics of neonatal T cells. *Med Res Arch*. 2023;11(1). <https://doi.org/10.18103/mra.v11i1.3568>
22. van den Broek T, Borghans JAM, van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(6):363–373. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0001-y>
23. Braham Institute Bioinformatics A quality control tool for high throughput sequence data. 2020. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
24. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
25. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
26. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
27. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
28. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):553–564. <https://doi.org/10.1038/nri1394>
29. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, Siegrist CA. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol*. 2011;12(3):189–194. <https://doi.org/10.1038/ni0311-189>
30. Rainer J, Gatto L, Weichenberger CX. Ensembl: an R package to create and use ensembl-based annotation resources. *Bioinformatics*. 2019;35(17):3151–3153. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz031>
31. Cieslak A, Charbonnier G, Tesio M, Mathieu EL, Belhocine M, Touzart A, Smith C, Hypolite G, Andrieu GP, Martens JHA, et al. Blueprint of human thymopoiesis reveals molecular mechanisms of stage-specific TCR enhancer activation. *J Exp Med*. 2020;217(9):e20192360. <https://doi.org/10.1084/jem.20192360>
32. Chaki M, Airik R, Ghosh AK, Giles RH, Chen R, Slaats GG, Wang H, Hurd TW, Zhou W, Cluckey A, et al. Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell*. 2012;150(3):533–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.028>
33. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J, Crabtree GR. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human

- 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>



OPEN ACCESS

Published: January 31, 2023

Citation: Kempis-Calanis LA, Rodríguez-Jorge O, et al, 2023. Unique Characteristics of Neonatal T Cells, Medical Research Archives, [online] 11(1).

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

Copyright: © 2023 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.¹, Rodríguez-Jorge O.¹, Ventura-Martínez C.J.¹, Gutiérrez-Reyna D.Y.^{1,3}, Spicuglia S.^{2,4}, Santana M.A.*¹

¹Laboratorio 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.

²Aix-Marseille University, Inserm, TAGC, UMR1090, 13288, Marseille, France.

³Present address Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62209, Cuernavaca, Mexico

⁴Equipe Labelisée Ligue contre le cancer

*Correspondence: 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⁺ and CD8⁺ T cells, as compared with adult naïve cells. A specific transcriptome profile is present in both CD4⁺ and CD8⁺ 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⁺ 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 changes¹ 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 unique².

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 sequels³.

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 age⁴. After birth cells continue to change both in composition and in function⁵⁻⁷ and even in 12 years old children, some differences with the adult immune system still remain⁶.

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 response⁸⁻¹¹.

This paper reviews some of the main intrinsic differences of neonatal CD4⁺ and CD8⁺ 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⁺ and CD8⁺ 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⁺ T cells and tolerant phenotype

CD4⁺ 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 promoted¹²⁻¹⁴.

An activated CD4⁺ T cell can differentiate into several effector phenotypes, the best reported being Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, and T_{reg}, with distinctive functions. Th1 cells secrete IFN- γ and TNF- α and their main function is to fight intracellular pathogens¹⁵. Th2 cells secrete interleukin 4 (IL-4), IL-5 and IL-13, and eradicate helminths¹⁶. Th9 cells secrete IL-9 and are important for tumor immunity¹⁷. Th17 cells secrete IL-17A and IL-17F and have a protective role against extracellular bacteria and fungi¹⁸. Th22 cells secrete IL-22 and have a role in skin homeostasis and inflammation¹⁹. In contrast, T_{reg} cells suppress the immune response of other effector cells by secreting IL-10 and TGF- β ²⁰.

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_{regs} that suppress the activation and function of effector cells²¹. If an infection occurs during pregnancy and the fetal immune system is activated, the suppressive activity of T_{regs} could be reduced, the production of pro-inflammatory cytokines like TNF- α and IL-1- β augments and labor can be prematurely induced²²⁻²⁴. Besides, placental tissues secrete TGF- β , 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 birth¹¹.

In general, neonatal CD4⁺ T cells are considered immunotolerant, with minimal protective functions, which results in a high dependency of the neonates on their innate immune system^{25,26}. 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- γ , IL-2 and TNF- α)²⁷. As a result, neonates are highly susceptible to infections caused by viruses and

intracellular bacteria²⁸. In addition, neonatal T cells produce CXCL-8 and express complement receptors (CR), typically considered innate immunity, in comparison to adult T cells²⁹. 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^{30,31}.

Neonatal CD4⁺ T cells, like their CD8⁺ 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⁺ T cells from cord blood present hypermethylation of CpG and non-CpG sites in the promoter of IFN- γ gene³².

Single-cell and bulk RNA-seq technologies have been used to demonstrate that neonatal CD4⁺ 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⁺ T cells present an intermediate mean “developmental score” between fetal and adult CD4⁺ 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⁺ T cells, which instead expressed genes related to intracellular signaling and cell cycle, and partially retain a T_{reg} signature already present in fetal cells^{33,34}. It has also been found that genes from the TCR signaling pathway (CD4, CD3, TCR α , TCR β , LAT, LCK and ITK) are downregulated in neonatal CD4⁺ 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- γ , IL-17A, and TNF- α . In this study, the downregulated genes of neonatal CD4⁺ 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)³⁵. Another study has also shown differences in the accessibility of chromatin as a feature determining the level of gene expression in neonatal CD4⁺ T cells and other cord blood cells³⁶.

We have also studied the transcriptomic profile of neonatal CD4⁺ 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- γ , 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⁺ T cells proliferate more than adult naïve CD4⁺ T cells. Altogether this shows that neonatal CD4⁺ 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⁺ T cells and innate behavior

The main function of CD8⁺ T cells is to eliminate infected or nonfunctional cells. To characterize these cells in neonates, our group evaluated the transcriptome of neonatal CD8⁺ T cells as compared to the adult naïve CD8⁺ 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 granulocytes⁸. The neonatal cells were deficient in IFN- γ 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 cells³⁷. 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 response⁹. This higher activation was related to a more balanced metabolic profile. In agreement with the capability of neonatal CD8⁺ T cells to mount a strong response under strong challenges, it was reported that in neonatal mice, IFN- γ producing CD8⁺ T cells were observed after infection with the enteropathogen *Y. enterocolitica*³⁸. 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^{30,39}.

Among the specific characteristics of cord blood CD8⁺ T cells is the high expression levels of the chemokine CXCR3 and the transcription factor Eomes, associated with memory T cells⁴⁰. This Eomes⁺ innate-like CD8⁺ T cells were also identified in human fetal thymuses, and young infants up to 3 months old⁴¹. 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⁺ T cells respectively ⁴². In addition, neonatal CD8⁺ T cells express the co-inhibitory receptor killer-cell lectin like receptor G 1, which is present in the 20% of neonatal CD8⁺ T cells ⁴³. This could also account for the higher activation threshold of the neonatal CD8⁺ T cells ⁴⁴.

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⁺ T cells (Kempis-Calanis, submitted) and BCL11A, MYCN, HOXA3, and MEOX1 in CD8⁺ T cells ^{8,9}. Remarkably, these genes are expressed in normal hematopoietic or early T cell precursors in the thymus (i.e. CD34⁺ thymocytes) but are then switched off during T cell differentiation and maturation ^{45,46}. Moreover their ectopic or sustained expression in the T cell lineage is associated with a differentiation blockage and hyperproliferation ⁴⁵. 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 ⁴⁷⁻⁴⁹. The progressive down-modulation of HOXA transcripts has been reported during thymic cell maturation ^{46,50}, while the sustained expression of HOXA genes during T cell differentiation has been shown to impair T cell maturation and to induce oncogenic transformation ^{47,50,51}. Similarly, LMO2, MEOX1, MEIS1 are major T-ALL oncogenes and are normally expressed in HSCs and contribute to the stemness of the HSC cells ⁴⁵. 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 ζ , which are associated with the antigen recognition pair (α/β or γ/δ 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 κ B and NFAT, through the activation of MAP kinase cascades, PKC θ and Calcium waves, respectively ⁵².

It has been reported that TCR early signaling could be impaired in neonatal CD4⁺ T cells, due to differences in chromatin accessibility and a lower expression of important signaling molecules, such as Lat and Lck ^{28,35}. Other authors found, however, that calcium flux signals and MAP (Mitogen Activating Protein) kinase activation cascades were even higher in neonatal CD4⁺ 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⁺ T cell activation ⁵³. 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 ^{54,55}. A single-cell sequencing study of cord blood mononuclear cells, showed a higher expression of the inhibitor of NF κ B, I κ B α , in the neonatal cells, which could potentially further contribute to an unbalance in the main transcription factors' activation in neonatal cells ³⁶. We have also found differences in the expression of signaling molecules in the neonatal cells, both in CD8⁺ and in CD4⁺ T cells (Kempis-Calanis et. al. submitted and ⁸).

Among the genes that both neonatal CD4⁺ and CD8⁺ 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⁺ T cell population (Kempis-Calanis et. al. submitted and ⁸).

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 ⁶. We showed that neonatal CD8⁺ T cells respond to activation in the presence of IL-12 with an adult-like expression profile ⁹.

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 ⁵⁶⁻⁵⁸.

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⁺ and CD8⁺ T cells have a basal glycolytic program (Kempis-Calanis, et.al. submitted and ^{8,9,37}). 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 ⁵⁹⁻⁶¹.

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_{reg} activation ⁶²⁻⁶⁴. 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⁺ 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 ⁹. Based on these studies, we have proposed that the metabolic status and high production of ROS impair the activation and function of neonatal CD8⁺ T cells. We have also found that neonatal CD4⁺ 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⁺ and CD8⁺ T cells, which is accompanied by a highly glycolytic program already present in basal conditions ^{8,65} in agreement with the bias towards a rapid response with low memory generation of the neonatal cells ^{11,44}. 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) ^{62,66-68}. 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⁺ and CD8⁺ 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 immune-tolerant 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 ^{56,58}. The other is through nutrient use to improve the metabolic state of the cells.

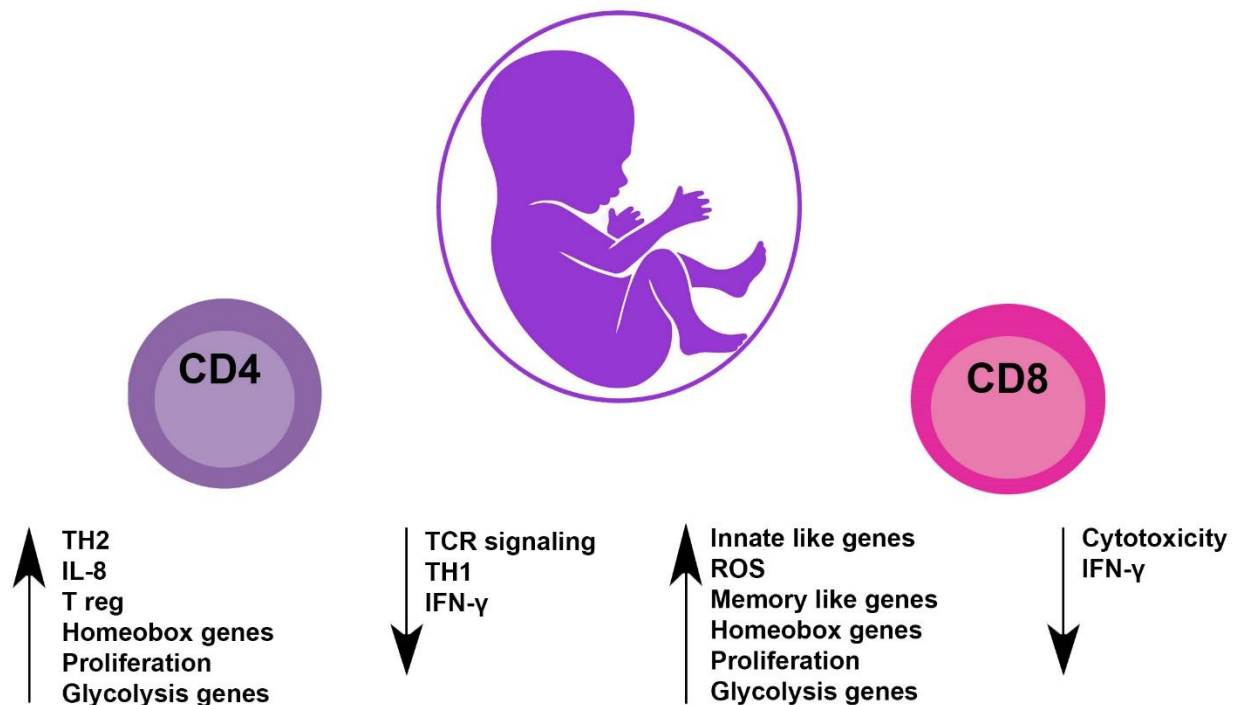


Figure 1: Graphical abstract of the characteristics of neonatal CD4⁺ and CD8⁺ T cells

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 ⁶⁹. This highlights the importance of proper maternal and newborn nutrition, and diet composition, for the immune development of neonates and infants ⁷⁰.

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, Bucciol 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, Skalleberg 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. Lin H, Zhao Y, Zhu Y, et al. Maternal High-Fat Diet Aggravates Allergic Asthma in Offspring via Modulating CD4(+) T-Cell Differentiation. *Nutrients*. Jun 16 2022;14(12)doi:10.3390/nu14122508

70. 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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 24 de julio de 2026

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: Estudio integrativo de los linfocitos T de neonatos prematuros y de término, nacidos por cesárea y parto vaginal, que presenta el M. en C. Carlos Jesús Ventura Martínez (10036247) para obtener el título de Doctorado en Ciencias.

Director de tesis: Dr. Otoniel Rodríguez Jorge

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

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM - UAEM	APROBADO	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM - UAEM	APROBADO	
Dra. Hilda Minerva González Sánchez INSP	APROBADO	
Dra. Delia Vanessa López Guerrero FN - UAEM	APROBADO	
Dr. José Luis Maravillas Montero IBT - UNAM	APROBADO	
Dra. Linda Aimara Kempis Calanis CIDC - UAEM	APROBADO	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC - UAEM	APROBADO	





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2026-07-25 16:56:47 | FIRMANTE

CdaWzXq22ESX6zTUDffPzEISHx0d0uCOHnAunlbZLwoNWZwf38C47pmDG4EwplQyADiv/c2a1PGLBxznW+B2N3f+7OW8lqapCqce8UuU4rmyil/gW3GyMJ3gdpolz4KgX9iD9O
ZtQ32TnwxNfTt/NQmj6XQ8BAL7Mz5W1LHn02e3Cqb52iKd26l1eX77iFolPwui00nnw3EPAQH14ftwkk26xwQYtmcGZzu+f7QyFPUB6BLW0Az0ucPnDhcLKIFv7ZpIUp4R9W58b
ytuWSDWD96lUsBkefOwFKB5uT8+MSyn2i1KpGzDQxW1wM5OAAToERb+LvpLm/00MvBeNoFw==

JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO | Fecha:2026-07-27 01:15:32 | FIRMANTE

MYPuBnZ27s8iFzwWww06qT5KbGsfREnNblFSMTwZ3cDVc2PENHOniePm2AaAj+gAteRzK54AwcWOkGRSAs+cmlrlfm4n/q69VNvhytbnSKVVTYVoj47oBAK7JnYCOfrB/XsTQdo
Fxo4O4pdsutuTEYUWh9dtMP+kqMoQOpUOZ/rSRtoX43W8mLiYHN8Ro3UGDg3Busj9wIR2w7WCvkCSsl8Y6mT66li/ULuCSJKRQcZcGDDZn/wlLqBCeBJC36w9D80hJNP7
mFRNqzKh6rJ0liv+PW0F6qR6hCJRjll8cw4//QTBbbRwMyHZRN2IWYheNutBYNlx4Zh0+rxhwUgA==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2026-07-27 11:20:14 | FIRMANTE

hR9CbMvgzBQ6k9RYzOT3KxYC+bWg96VJ6NajFZdZS38mTb/pVqNZar4HsVjFHWU12MdX71Wts3uaWah4j/wr0tjKfgFFwp26jIC6GVYTnPMqjff5/oLgR5YNba94VvYVj/N+LuxUe
lHsk79fjLfYmuTZ7Kzm47PLzqw9F6o8DPOjOqGNcLbIQDol50isxYWxdq4rxHFMQ4LexaMFwkhQ406S9jd9fNcy1DXR1+Cn+TlqdwppYNQV2ZUhx8BnV0ZsxhbRvYrkyUqjt0Hh
ng9uGHUpKgbhFlf+5idwkm7hpBCJWlZROaiuzFzfsRXm/DZw8Ttt6dNO7eSkHX60TUw==

LINDA AIMARA KEMPIS CALANIS | Fecha:2026-07-28 09:07:26 | FIRMANTE

QgGcgh74wKiqIPBSp8+x0/qM4AnMoqgw70/KVGDUTUoMjcyBsBINiKGS5my3Hyf2WGoII0OJ7tFOh8hpgJhy31BIMPKuTtPD6T3ee0uBweR7NwhSZXptudfulUKJqpVKg5h0TFiaQ
wiEuHdEypISO18kRxn52ogZ6gA1T++6VUMXrU6TN5AT4n5cBZmlEy3FQd0s38xZuJXK8/0E9FvokC/F9Y71T+xa+Zec8Y4EYvdKcsYaE/TdweS49mKKVy3LS82LrUqmbiusMR
1DeD/bXxlRWUEZojG/82ihknTASp2LfrMRLjNI4UYMfjsqA9H5r/+onh9cVVCjQtrJ7qCTQ==

HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ | Fecha:2026-08-06 09:10:31 | FIRMANTE

tgtowNsvoaIUUI/yfbW+HRT3FS7Q6G3DzgnOECw0y2cr0eZg0nSW2HYS4+ZUDLvcbywNmRnuecroH/MSpnBp9BwKqHOb7JslMBHdXDCOn8qqGprNbb1gEmd7Xcztk8BEqq3fu
mZVvezfdi8aIW+VK1njc/eGEbhvfwZNUkdKREtHODciom7RALhHch0H07BLBLWicfcszB/WTk1KOW0w5ftCinQ0CtSB3Lh2EUSJHq7iTES6AmDdskwa7ohXii/D5NH/fB/1IAIE7JDY
HG4kYRGCRHaaiuzXQe51sH0x60AjSjCYRjvpJ7ee/+Hdfq19nWtoVSW86Cx1ODO7Ullvg==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2026-08-06 11:42:04 | FIRMANTE

XSciUW1OHKDFs6lJ3W8Id8gJ7Byb+6iS/cqe9FYRkbzMDfngSsdXP+/p8MM2PvAJTmZf1PexZGcN5EsEnl04sxksM4KVcKuarf1wenyla9vcrdkqHxoNi7H2W7FK4rwn/v8JBPrFE
lhVLdNcw/e63avOpeinM4Xmz3YUyhzk33ugo1kU+MS/RTYfeqAakW2kKHpsrvxYehB91+VqcevHaqsiiZDBK4FRri7ZhORvs5Z/DQdZYDJvu6kzhwg4b9Nm3bmXNHNCT2tt1wy9
IU+Kwt+xqbJds6ncRwXoEx15WTr6aHbUUVpfT+p63R7D6EOzoUh8StpVRk72x60qQu7VLg==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2026-08-10 15:10:54 | FIRMANTE

JhPedLEqOWJgitG7S3Cq8aj+NidnA8YSZAJ+/AoNXpb5/xHKcJEycgMcltS66MvgzKHBN7prL9l5qvVC6QQKskAwyrdfowIJ2Y/KA0Xf/z4bx1tw6UT9Q++Eu+IYuilzJvzN+c0A6PFsD
rvZs1wDg5k1cA0ub3M7v9OH/KEBH1IwbXO6hUVGREkhCjBtBloHrm1jMhF2YpCRoWPS/36Wryup9aV3Ow/WmvJu88oAGYwJET2y3+ov9Ow7lr+3vjG/tENy19THKZ9NUxpgGo
ec1gepuJT+pLZ9nwd27R7nrMzslVS5CuvRC1KqlhOSTJ2cZKzju4aC+C7B+9jm4XDkw==

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



JbyNfd1mx

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/bR5QtiB5IU9O5WrrGOHwQkdBeNeeNYKv>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029