

## Utilidad de la citometría de flujo para la identificación de linfocitos TCD4+CD8+ en adultos mayores

### Usefulness of flow cytometry for the identification TCD4+CD8+ lymphocytes in older adults

Yenisey Triana Marrero<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3391-0767>

Vianed Marsán Suárez <https://orcid.org/0000-0001-5659-8214>

Imilla Casado Hernández <https://orcid.org/0000-0003-0432-7943>

<sup>1</sup>Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu)

Recibido 12/8/21

Aceptado 13/9/21

#### **Al Director:**

*Durante los últimos 50 años el número de individuos mayores de 65 años se ha triplicado en todo el mundo. Cuba exhibe una de las poblaciones más envejecidas de América Latina y se espera que para el año 2030 la población mayor de 60 años podría alcanzar el 30 %.<sup>(1)</sup> Los cambios en el sistema inmune relacionados con la edad se han denominado inmunosenescencia, que afectan tanto la inmunidad innata como la adaptativa.<sup>(2)</sup> En tal sentido, dentro de las subpoblaciones de los linfocitos T se encuentra la población que expresa receptores clonotípicos de células T del tipo  $\alpha\beta$  en su mayoría, con inmunofenotipo CD3+CD4+CD8+ o doble positivos (TDP) maduros, los cuales una vez que abandonan el timo, circulan en bajas concentraciones en la sangre periférica (SP) y normalmente, no exceden el 5 % en personas sanas.<sup>(3)</sup> Los*

linfocitos TDP parecen desempeñar un papel importante en los sitios periféricos como potentes inmunosupresores o con alto potencial citotóxico.<sup>(4)</sup>

Por otra parte, se ha estimado que las subpoblaciones diferenciadas y funcionales CD3+CD4+CD8+, en cuanto no expresan el marcador tímico CD1a, podrían constituir a su vez un grupo heterogéneo de células T, de acuerdo con los niveles de expresión, tanto de CD4 como de CD8, con dos tipos predominantes: CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup> y CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>.<sup>(5)</sup>

En este sentido, uno de los métodos más importantes para determinar las concentraciones de dichas células inmunitarias es el inmunofenotipaje por citometría de flujo (CMF). Esta metodología cuantifica las poblaciones linfocitarias de forma relativa y absoluta.<sup>(3)</sup>

Un grupo de investigadores del Instituto de Hematología e Inmunología durante el año 2020 demostró la importancia de aplicar en el sistema de salud cubano la CMF para la identificación de las células TDP en adultos mayores cubanos, cuyo estudio original se encuentra disponible en ExpGerontol 2021.<sup>(4)</sup>

Se utilizaron 30 muestras procedentes de SP de adultos mayores de 60 años, antes de la administración de Biomodulina T, en el contexto del ensayo clínico “Evaluación de la eficacia y seguridad de un nuevo esquema posológico de BIOMODULINA T® para la prevención de infecciones entre ellas la COVID-19, en adultos mayores en Cuba”, con registro público <https://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000319-Sp>

Se añadieron 50µL de sangre total en dos tubos de 15mL por muestra, uno para el control y un segundo tubo para la determinación de los linfocitos TDP. Se incubaron 30 minutos, este último con 5µL de las combinaciones correspondientes de los AcMo conjugados con fluorocromos: anti-CD3PerCP/CD4F/CD8PE protegidos de la luz y a temperatura ambiente (TA). Se lisaron los hematíes con cloruro de amonio 10 min, TA. Posteriormente, las células fueron lavadas en dos ocasiones con cloruro de sodio

a 0,9 %, protegidas de la luz y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm. La lectura y análisis se realizó en un citómetro de flujo BeckmanCoulterGallios, USA, programa Kaluza versión 1.2.

Como estrategia de análisis se utilizó el gráfico de puntos sobre el total de células marcadas para la separación de los singletes. Posteriormente, se analizó el gateSSC-A vs CD3, para separar la población de linfocitos TCD3+, de la cual se derivó el gráfico CD4+CD8+. Seguidamente, se seleccionaron las subpoblaciones CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup> y CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup> según la intensidad de la fluorescencia.

Los rangos normales para células TDP se tomaron de estudios previos realizados en la población adulta cubana.<sup>(3,6)</sup>

Predominaron las mujeres con valores altos en porciento y valor absoluto de linfocitos TDP en relación con los hombres. Entre los valores altos porcentuales y el valor absoluto de linfocitos TDP predominó el grupo de edad  $\geq 80$  años. Altos valores porcentuales y absolutos de células TCD4+CD8+ predominaron en ancianos con infecciones y neoplasias, fundamentalmente.

Recientemente se demostró, que estas células participan en la inmunidad adaptativa al responder contra patógenos infecciosos y en particular, contra infecciones virales autolimitadas y latentes como las causadas por Epstein Barr y Citomegalovirus.<sup>(7)</sup>

Durante el envejecimiento se reduce la diversidad clonal y se incrementan poblaciones oligoclonales. Estos efectos se resumen dentro del proceso de inmunosenescencia, que en el cáncer se encuentra acelerado y se asocia con un peor pronóstico. Estos hallazgos apoyan los postulados de la inmunovigilancia del cáncer, al incrementarse considerablemente su incidencia con la edad.<sup>(3)</sup>

*Lo anterior sugiere que las células TCD4+CD8+ juegan un importante rol en la inmunopatogenia de las enfermedades infecciosas, el cáncer y la autoinmunidad. En ese sentido, la CMF constituye una plataforma factible para identificar las células TDP en este grupo etáreo.*

### Agradecimientos

Agradecemos la importante colaboración en el presente estudio a las doctoras Consuelo Milagros Macías Abraham, Yaneisy Duarte Pérez y Mary Carmen Reyes Zamora, a las licenciadas Elizabeth Hernández Ramos, Gabriela Díaz Domínguez y al Dr. Luis Felipe Heredia Guerra.

### Referencias bibliográficas

1. Saavedra Hernández D, García Verdecia B, González Morera A, Lorenzo Luaces Álvarez P, Lage Dávila A. Marcadores de inmunosenescencia y su relación con el cáncer de pulmón. Anales de la Academia de Ciencias de Cuba [revista en Internet]. 2021[acceso 30/07/2021];11(1):[aprox.0 p.]. Disponible en <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/826>
2. Barrera Salas M, Morales Hernández AE, Hernández Osorio JJ, Hernández Salcedo DR. Inmunosenescencia. Med Int Méx. 2017;33(5):696-704. DOI: <https://doi.org/10.24245/mim.v33i5.1204>
3. Arango Prado MC, Villegas Valverde CA, Soto Pardeiro P, Torres López G, Morejón Morales A, Faxas García ME. Caracterización de los inmunofenotipos linfocitarios de sangre periférica en pacientes con cáncer. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. [Internet] 2020[acceso 30/07/2021];36(2):e1187. Disponible en: <http://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1187>
4. Marrero YT, Suárez VM, Abraham CMM, Hernández IC, Ramos EH, Domínguez GD, et al. Immunophenotypic characterization of double positive T lymphocytes in Cuban older adults. Exp Gerontol 2021;152:111450. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111450>

5. Choi YJ, Park HJ, Park HJ, Jung KC, Lee JI. CD4<sup>hi</sup> CD8<sup>low</sup> Double-Positive T Cells Are Associated with Graft Rejection in a Non human Primate Model of Islet Transplantation. *J Immunol Res.* 2018;2018:3861079. DOI: <https://10.1155/2018/3861079>
6. Villegas-Valverde C, Kokuina E, Breff-Fonseca. Estimating Normal Values of Rare T-Lymphocyte Populations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. *MEDICC Review* 2018;20(4):20-26.
7. Ghia P, Prato G, Stella S, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br J Haematol.* 2007;139:780-90.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Yenisey Triana Marrero*: Revisión de literatura científica, diseño del estudio, ejecución de técnicas de laboratorio, análisis e interpretación de resultados y escritura del manuscrito. Aprobación de la versión para publicar.

*Vianed Marsán Suárez*: Conceptualización y diseño de la investigación. Revisión crítica del manuscrito. Aprobación de la versión para publicar.

*Imilla Casado Hernández*: Análisis e interpretación de resultados. Aprobación de la versión para publicar.