

“Linfocitos T doble negativos periféricos: una mirada en senescentes cubanos”

Yenisey Triana Marrero^{*a}, Vianed Marsán Suárez^b, Consuelo Milagros Macías Abraham^c, Imilla Casado Hernández^d, Elizabeth Hernández Ramos^e, Yaneisy Duarte Pérez^f, Gabriela Díaz Domínguez^g, Mary Carmen Reyes Zamora.^h

^{a-g}Departamento de Inmunología, Instituto de Hematología e Inmunología “José Manuel Ballester Santovenia”, La Habana, Cuba.

^hCentro Nacional de Biopreparados, Bejucal, Mayabeque, Cuba

**Autor para la correspondencia: yeniseyt@infomed.sld.cu*

RESUMEN

Introducción: los cambios en el sistema inmune relacionados con la edad se denominan inmunosenescencia. Dentro de los linfocitos T se encuentra la subpoblación de linfocitos doble negativos (TDN) periféricos que son inmunomoduladores de la respuesta inmune.

Objetivo: determinar la frecuencia de los linfocitos T doble negativos periféricos en adultos mayores cubanos.

Métodos: se realizó un estudio transversal en 30 adultos mayores, residentes en Cuba. Se cuantificaron los linfocitos T doble negativos en sangre periférica por citometría de flujo. Se utilizaron los valores porcentuales, la media y la desviación estándar y el estadígrafo Chi-cuadrado para relacionar los valores porcentuales de los TDN y las comorbilidades. Se consideró estadísticamente significativo si $p \leq 0.05$.

Resultados: hubo un predominio de mujeres que representaron el 70%. No se reportó ningún adulto mayor con valores bajos de linfocitos T doble negativos. Predominaron las mujeres con valores altos porcentuales y absolutos de linfocitos TDN en relación a los hombres. En el grupo ≥ 80 años predominaron los valores altos en % y absoluto de linfocitos TDN. Los valores porcentuales altos de células TDN se relacionó con la enfermedad cardiovascular principalmente, y predominaron en ancianos \geq de 80 años, los cuales presentaron infecciones respiratorias y en la piel, fundamentalmente. El valor porcentual normal en el grupo < 80 años resultó significativo ($p=0.0198$).

Conclusiones: la mayor parte los adultos mayores que exhibieron valores porcentuales y absolutos elevados de linfocitos TDN, tuvieron asociado alguna comorbilidad, idea que sugiere que las células TDN participan en la vigilancia, defensa y homeostasis inmunitarias según el microambiente inmunológico específico.

Palabras clave: linfocitos T doble negativos, citometría de flujo, adulto mayor, inmunosenescencia, enfermedades.

1. Introducción

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 pudiera alcanzar el 30 %. [1] El envejecimiento se relaciona con cambios en ambas ramas del sistema inmune, innata y adquirida. Los cambios en el sistema inmune relacionados con la edad se denominan inmunosenescencia. La existencia en esta etapa de la vida, de un entorno inflamatorio caracterizado por inflamación crónica de bajo grado, conocido por su nombre en inglés inflammaging, complementa el fenómeno de la inmunosenescencia. [1,2] En estudios realizados en octogenarios y nonagenarios saludables se identificó el llamado perfil de riesgo inmunitario, que se distingue por altas cifras de células T CD8+ y bajas de células T CD4+ (inversión del índice CD4+/CD8+), un incremento en el número de células T terminales diferenciadas disfuncionales que previamente estuvieron expuestas a antígenos (células efectoras y de memoria) y el agotamiento del número de células que son capaces de reconocer y combatir nuevos antígenos.[3]Estos cambios son en esencia atribuidos a la involución del timo, a la estimulación antigénica crónica (principalmente el citomegalovirus [CMV]) y la desregulación de algunas vías hormonales. [1, 4,5]

Los últimos veinte años de investigación han mostrado la estrecha relación entre estos fenómenos que acompañan al envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad como las cardiovasculares, cerebrovasculares, degenerativas y el cáncer [1,2].

Dentro de las subpoblaciones de los linfocitos T se encuentran los linfocitos CD3+ que no expresan los marcadores CD4 y CD8, y se conocen como células T doble negativas (TDN). Fueron descubiertos hace aproximadamente dos décadas y se caracterizan por un inmunofenotipo maduro (CD45+/CD3+/CD4-/CD8-/CD56-) y expresan receptores

clonotípicos de células T (TCR) de tipo $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Estas células se encuentran en mayor proporción en los ganglios linfáticos, y representan del 3 al 7 % del total de linfocitos en la sangre periférica (SP). [6, 7]

Las células TDN representan la etapa más temprana de diferenciación en el timo. En el timo maduro, las células TDN comprenden el 5% del total de timocitos y representan al menos tres poblaciones discretas. Una población expresa TCR $\gamma\delta$, otra población expresa TCR $\alpha\beta$ y el resto está comprometido con el linaje $\alpha\beta$ pero aún tiene que reorganizar su TCR. Tras la expresión de una cadena TCR β funcional, junto con la cadena α de la célula pre-T, las moléculas del correceptor CD4 y CD8 también se expresan en la superficie celular. La presencia de CD4 y CD8 es fundamental para las fuerzas selectivas positivas y negativas que dan forma al repertorio de TCR periférico.

En la periferia, las células TDN (CD3+CD4-CD8-) son principalmente positivas para TCR $\gamma\delta$, y las que tienen TCR $\alpha\beta$ representan solo 0.1-2% de las células mononucleares de la SP en individuos sanos. Las poblaciones de células TDN periféricas con cadenas TCR α conservadas pueden derivar de la población de células TDN tímicas; pueden derivar de células T CD4 o CD8 que han modulado la expresión de moléculas correceptoras; o, alternativamente, pueden desarrollarse de manera independiente del timo. [8]

Las funciones fisiológicas de los linfocitos TDN aún no se comprenden completamente. La inmunomodulación que se les atribuye se basa en su capacidad para suprimir las funciones de las células T simples positivas y su citotoxicidad para las células tumorales y las células infectadas por virus. Aunque solo se encuentran pequeñas cantidades de estos linfocitos en la sangre, juegan un papel importante en la inmunopatogénesis de varias enfermedades. Sus niveles en sangre brindan criterios para diagnosticar el síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), y pueden proporcionar un biomarcador de pronóstico para el cáncer o dianas terapéuticas eficaces para estas enfermedades. [6,9]

Por su parte, las células T TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- representan un subconjunto raro de células T con un papel controvertido en el sistema inmunitario. La proliferación de células TDN aumenta significativamente en la SP y en los tejidos afectados en varias enfermedades autoinmunes. [8] Además, exhiben un fenotipo proinflamatorio marcado por la secreción de interleucina (IL)-17 y el reclutamiento de células inmunitarias, y se

ha confirmado que promueven la producción de inmunoglobulina (Ig) en tejidos inflamados de pacientes con ALPS, síndrome de Sjögren primario y lupus eritematoso sistémico. [10-12] En esta última, los TDN se investigaron como posibles biomarcadores circulantes de disfunción renal. [13]

Se ha documentado un aumento en las células T $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN en pacientes con trastornos linfoproliferativos y enfermedad de injerto contra huésped. Se ha demostrado además, que aumentan la producción de Ig anti-ADN en la nefritis lúpica en humanos, lo que sugiere un papel inmunorregulador para estas células. También se les atribuye la supresión de la enfermedad letal de injerto contra huésped en ratones que se sometieron a trasplantes alogénicos de médula ósea y disminuyen la reacción de linfocitos mixtos in vitro, lo que implicaría un papel supresor o inmunorregulador para las células TDN en estas circunstancias. En el trasplante alogénico, los TDN circulantes están inversamente relacionados con el riesgo y la gravedad de la EICH aguda y crónica. [13] Se ha sugerido que esta población es distinta de la población de células TDN que surge en la enfermedad autoinmune. [14]

Por otra parte, las células T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN predominan en la SP. A diferencia de las células $\text{T}\alpha\beta^+$ DN, las células $\text{T}\gamma\delta^+$ DN pueden reconocer antígenos directamente sin moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y, por lo tanto, tienen la capacidad de responder directamente a patógenos específicos. Por lo tanto, las células $\text{T}\gamma\delta^+$ DN fácilmente forman un puente entre los sistemas inmunes innato y adaptativo. [7]

Por el contrario, las células TDN de individuos sanos se han descrito como un subconjunto de células T inmunorreguladoras capaces de suprimir eficazmente las funciones inmunitarias de las células T CD4^+ y CD8^+ . [10-12] Los TDN fisiológicos también están presentes en el intestino y el riñón y, en algunos informes, se ha demostrado que expresan B220 y/o secretan IL-10. [15]

En este sentido, la citometría de flujo (CF) permite el estudio de las poblaciones de linfocitos y su heterogeneidad. [6] Es una tecnología útil para la caracterización analítica y cuantitativa de las células, ya que ofrece información rápida, simultánea y completa sobre sus aspectos distintivos. [16]

La caracterización inmunofenotípica de los linfocitos TDN en adultos mayores constituye un elemento de interés en la inmunopatogenia de enfermedades que predominan en esta etapa de la vida, y en consecuencia, en la toma de decisiones médicas, razón por la cual se decidió realizar esta investigación.

2. Métodos

2.1. Diseño, sujetos y obtención de la muestra

Esta investigación se derivó de un ensayo clínico titulado: “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”, cuyo Centro promotor, es el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) y tiene como Centro coordinador, el Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos (CENCEC), con registro público <http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000319-Sp>

Se realizó un estudio transversal en marzo del año 2020, en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) de Cuba. La muestra se constituyó por 30 adultos mayores entre los 60 y 99 años de edad, procedentes del Hogar de Ancianos “Alfredo Gómez Gendra”, de La Habana, antes de la administración de la Biomodulina T (BT).

Como criterios diagnósticos se incluyó la presencia de al menos uno de las siguientes condiciones: ancianos frágiles con comorbilidad alta, antecedentes de enfermedades cardiovasculares, asma bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus, hipertensión arterial y evidencias clínicas de inmunosupresión.

Como criterios de inclusión: ancianos que cumplieran con el criterio diagnóstico, de cualquier sexo y color de la piel, con edad de 60 años y más, que expresaron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

Como criterios de exclusión: adultos mayores que hubieran recibido BT en los dos meses anteriores, con hipersensibilidad conocida a cualquier componente de la formulación, estados alérgicos agudos o historia de reacciones alérgicas severas, con enfermedad intercurrente no controlada que incluyeron, infecciones agudas con fiebre concomitante, insuficiencia cardíaca sintomática, angina de pecho inestable y bajo tratamiento inmunosupresor.

Se extrajeron 3mL de SP por cada paciente, por punción venosa y se depositaron en tubos con Ácido etilendiaminotetracético.

2.2. Procedimientos de laboratorio y Citometría de flujo

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 TDN. Se incubaron 30 minutos, este último con 5µL de las combinaciones correspondientes de los AcMoconjugados con fluorocromos: anti-CD3PC5/CD4PE/CD8PE/CD56PE/CD45F, protegidos de la luz y a temperatura ambiente. El lisado de los hematíes se realizó con cloruro de amonio 10 min, a temperatura ambiente. 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 se realizó en un citómetro de flujo BeckmanCoulterGallios, USA. Fueron adquiridas 100 000 células por tubo. El análisis se efectuó en un citómetro GALLIOS, software Kaluza, versión 1.2, ubicado en el departamento de Inmunología del IHI.

Se utilizó como estrategia de análisis, el gráfico de puntos sobre el total de células marcadas para la separación de los singletes; células que pasan una sola vez por el láser y presentan la altura de señal (FSC-H) y el área de señal (FSC-A) uniforme que el citómetro registra como un evento, descartando agregados celulares (dos o más células)(Fig1A).Posteriormente se analizó el gráfico de puntos SSC-A vs CD3, para separar la población de linfocitos TCD3+ sobre los singletes seleccionados previamente (Fig 1B).De la población de linfocitos TCD3+ se realizó un gráfico de puntos CD4-CD8- obteniéndose el valor porcentual (Fig 1C).

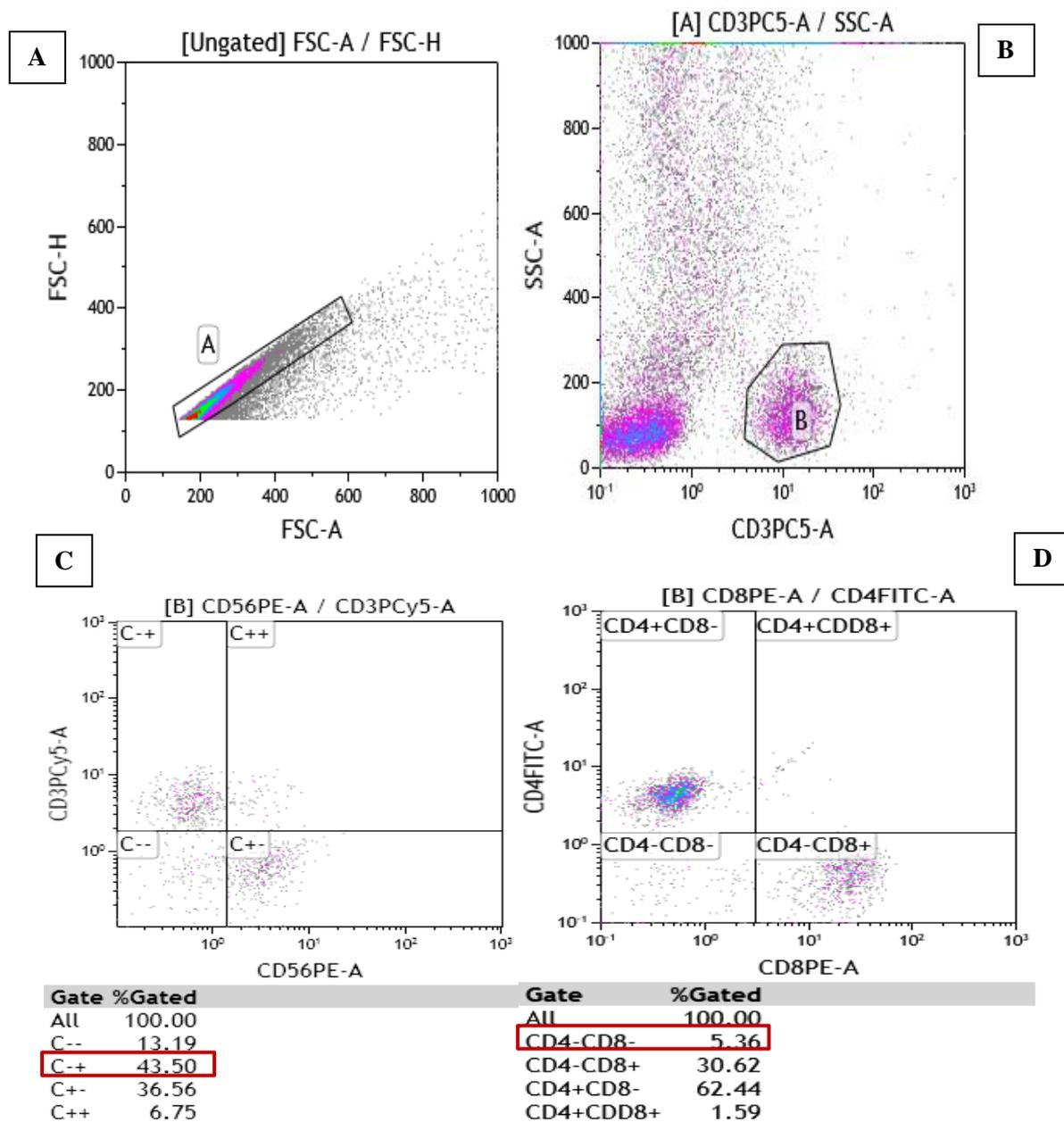


Figura 1. Ventana de estrategia de selección de las células T doble negativas. A: Dotplot FSC-H/FSC-A; selección de los singletes. B:Dotplot SSC-A/CD3PC5; selección de los linfocitos TCD3+. C: Dotplot CD3PC5/CD56PE: C+-: selección de linfocitos TCD3+CD56-.D: CD4FICT/CD8PE; selección de la población de YDN sobre la población de TCD3+CD56- .

Los resultados se expresaron mediante los valores relativos (% de células) y valores absolutos (células/ μ L). El número absoluto de la población celular TDNse calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

Conteo absoluto (células/ μ L)= Conteo de linfocitos (número de células/ μ L) en hemograma x % de la subpoblación celular de interés \div 100.

Se tomaron como referencia los valores absolutos de los TDN para mujeres 18,6-92,0 cel/ μ L y para hombres 13,5-81,7 cel/ μ L.[6]

Se consideró normal, si el porcentaje de expresión del antígeno se encontraba entre los valores de referencia para la población de linfocitos TDN para las mujeres 1,3-5,8% y para los hombres 1,2-7,3 %.[6]

En relación con la edad, se tomaron como referencia para los valores porcentuales, entre 1,3-6,6% y para los valores absolutos 17,9-90,1 cel/ μ L.[6]

Dentro de la población de TDN no se contemplaron los linfocitos NKT, los cuales fueron marcados con los AcMoCD16F/CD56PE/CD45PerCP, objeto de otra investigación.

2.3. Análisis estadístico

Se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel con la información obtenida. Se dividió la muestra por sexo y edad (< de 80 años y de 80 años y más). Los datos se procesaron mediante el programa estadístico GraphPadPrism versión 6.00 utilizando los valores porcentuales y la media para la descripción muestral. La desviación estándar (DE) indicó el grado de variabilidad de los datos. Se calculó el intervalo de confianza en cada caso para un 95%. Se utilizó el estadígrafo Chi-cuadrado para relacionar los valores porcentuales de los DNT y las comorbilidades. Se consideró estadísticamente significativo si el valor de $p \leq 0.05$. Los resultados obtenidos se le dieron salida en tablas para su mejor comprensión y análisis.

2.4. Ética

Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comités de Ética de la Investigación del IHI y el CITED.

3. Resultados

En este estudio hubo un predominio de mujeres que representaron el 70%. No se reportó ningún adulto mayor masculino ni femenina con valores porcentuales valores absolutos bajos de linfocitos TDN. Predominaron los valores altos de linfocitos TDN en

las mujeres tanto en % como en valor absoluto en relación con los hombres en un 16,67% y 23,33% respectivamente (calculado el valor porcentual en relación a los 30

ancianos del estudio). Al comparar las medias de los valores normales tanto del porcentaje como de los conteos absolutos de los TDN mostraron valores más bajos los hombres que las mujeres. Igual tendencia mostró la DE del valor alto de los conteos absolutos y porcentuales de los TDN, siendo mayor en las mujeres, en ambos parámetros, en relación con los hombres. Ningún valor fue significativamente estadístico. (Tabla 1)

Tabla 1. Distribución de los adultos mayores según valores de linfocitos T doblenegativos y sexo.

n: número de sujetos; DE: desviación estándar; IC: intervalo de confianza.

Valores porcentuales de linfocitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁻	Masculino (n=9)				Femenino (n=21)			
	Media/DE	IC del 95%	% del Total	p	Media/DE	IC del 95%	% del Total	p
<i>Normal</i>	2.914/1.874	1.474-4.355	30	0.1298	3.196/1.421	2.438-3.953	53.33	0.0898
<i>Alto</i>					8.788/2.651	5.496-12.08	16.67	
Valores absolutos de linfocitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁻	Media/DE	IC del 95%	% del Total		Media/DE	IC del 95%	% del Total	
<i>Normal</i>	36.73/22.89	17.59-55.86	26.67	0.0711	43.95/18.58	33.22-54.68	46.67	0.0912
<i>Alto</i>	108.7/0	0-0	3.33		151.2/52.87	102.3-200.1	23.33	0.0691

En relación a las comorbilidades el 83,3 % presentaron enfermedades cardiovasculares, 53,3 % demencia, 30 % diabetes mellitus, 26,6 % enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades cerebrovasculares, respectivamente, 13,3 % enfermedades neoplásicas y 6,7 % asma bronquial. Del total, el 60 % presentaron más de una comorbilidad. Además el 16,7 % manifestaron infecciones cutáneas, 13,3 % respiratorias agudas y 6,7 % urinarias. En 6,7 % coexistieron dos infecciones.

El valor porcentual normal de los linfocitos TDN fue mayor en el grupo de <80 años para un 53,33%. La mayor dispersión de los datos (DE: 60,32) predominó en el grupo <80 años para el valor absoluto alto. Respecto al porcentaje y los conteos absolutos altos de los TDN, ambos parámetros exhibieron mayor valor el grupo ≥80 años. El valor porcentual normal en el grupo < 80 años resultó estadísticamente significativo (p=0.0198). (Tabla 2)

Tabla 2. Distribución de los adultos mayores según valores de linfocitos T doble negativos y grupos de edades.

Valores porcentuales de linfocitos T CD4+/CD8-	< 80 años (n=13)				≥ 80 años (n=17)			
	Media/DE	IC del 95%	% del Total	p	Media/DE	IC del 95%	% del Total	p
<i>Normal</i>	3.123/1.560	2.292-3.954	53.33	0.0198	3.353/1.854	2.027-4.679	33.33	0.6500
<i>Alto</i>	12.57/0		3.33		8.410/1.784	3.978-12.84	10	
Valores absolutos de linfocitos T CD4+/CD8-	Media/DE	IC del 95%	% del Total		Media/DE	IC del 95%	% del Total	
<i>Normal</i>	43.34/22.01	30.63-56.04	46.67	0.1398	37.80/16.76	23.78-51.81	26.67	0.3735
<i>Alto</i>	175.2/60.32	25.39-325.1	10		128.3/41.68	76.56-180.1	16.67	

n: número de sujetos; DE: desviación estándar; IC: intervalo de confianza.

Entre las principales comorbilidades de los adultos mayores que se relacionaron con valores porcentuales altos de células TDN se encontró la enfermedad cardiovascular (EC), así como enfermedad cerebrovascular y neoplasias en las mujeres con tendencia a valores altos porcentuales. Predominaron los valores altos tanto en el porcentaje como en los conteos absolutos de linfocitos TDN en ancianos \geq de 80 años, los cuales presentaron infecciones respiratorias y en la piel, fundamentalmente. Cuatro ancianos presentaron neoplasias, de ellos, dos $<$ 80 y dos \geq de 80 años. El valor de Chi-cuadrado fue de 0,5995. (Tabla 3)

Tabla 3. Distribución de los adultos mayores según valores de linfocitos T doble negativos y comorbilidades.

Comorbilidades	Percentage values of CD4-/CD8- T lymphocytes
----------------	----------------------------------------------

	<i>Normal</i>	<i>Alto</i>
Enfermedades cardiovasculares	19	4
Enfermedades cerebrovasculares	9	0
Neoplasias	2	0
Diabetes mellitus	8	1
Asma Bronquial	3	0
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	6	0
Demencia	14	1
Infecciones	9	0

p de Chi-cuadrado: 0.5995^{ns}: no significativo

Discusión

El sistema inmunológico es inherentemente diferente entre hombres y mujeres, y la base genética se traduce en disparidades en, entre otros aspectos, grupos de linfocitos, producción de citocinas y quimiocinas e intensidades de respuesta a los antibióticos. En particular, las hormonas moldean el desarrollo y el funcionamiento del sistema inmunitario e influyen en la actividad funcional de las células inmunitarias y sus respuestas, lo que también da como resultado la prevalencia específica por sexo de enfermedades infecciosas y autoinmunes, respectivamente.[17-18]

Los genes de los cromosomas sexuales y las hormonas sexuales, como el estrógeno, la progesterona y los andrógenos, contribuyen a las diferencias entre hombres y mujeres en la respuesta inmunitaria. [19] Se sabe que el estrógeno mejora las respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales, mientras que los andrógenos suprimen la diferenciación de las células Th1 y reducen la producción de interferón gamma (IFN- γ) y las respuestas de anticuerpos de las células B. En general, las mujeres desarrollan respuestas humorales y celulares más fuertes que los hombres, asociadas con niveles más altos de anticuerpos y otros mediadores inmunitarios como IL-1, IL-4 e IFN- γ . [20]

Una diferencia relacionada con el sexo en el número y porcentaje de células TDN se encontró en este estudio, cuyo resultado fue superior en las mujeres en ambos casos. Esto se debe claramente a la influencia del sexo en este subconjunto de linfocitos T. Estudios previos también demostraron la diferencia relacionada con el sexo en el

número o porcentaje de células inmunitarias. Las influencias diferenciales de las hormonas sexuales podrían explicar ese fenómeno. Los andrógenos aceleran la apoptosis de los timocitos y, a su vez, pueden dar forma al repertorio de células T periféricas. [21]

La metilación del ADN, una modificación epigenética que determina la estructura de la cromatina y la accesibilidad transcripcional, tiene un papel crucial en la determinación de la función de las células inmunitarias. Es importante destacar que la metilación del ADN regula la expresión de citocinas y factores de transcripción que pueden determinar las respuestas inmunitarias y, en las células T CD4+, la diferenciación en subconjuntos de células T efectoras. Además, recientemente se ha demostrado que la remodelación epigenética mediada por CREM α y el silenciamiento de CD8 dan como resultado la expansión de las células TDN. [10]

La exposición a lo largo de la vida a patógenos da como resultado un aumento dependiente de la edad en las células T experimentadas con antígenos. En particular, las infecciones crónicas, como CMV y Epstein-Barr (EBV), inducen la expansión dependiente de la edad de las células de memoria, lo que reduce aún más el tamaño del repertorio de receptores de células T, lo que hace que el sistema inmunitario envejecido sea vulnerable a las infecciones. [22] En la población cubana existe una alta prevalencia de la infección por CMV, según un estudio realizado por Verdecia y colaboradores en 112 individuos adultos y adultos mayores cubanos. Estos autores encontraron que el 90,1% eran seropositivos a este virus. [23,24]

En la presente investigación predominaron los valores altos tanto en el porcentaje como en los conteos absolutos de linfocitos TDN en ancianos \geq de 80 años, los cuales presentaron infecciones respiratorias y en la piel, fundamentalmente. Sin embargo, el reclutamiento de estas células en la piel no está del todo dilucidado y, en la periferia, estas células parecen existir como una población madura. Se ha sugerido que estas células se originan a partir de un precursor de células T CD8+ y luego expresan CD4. Su presencia sugiere su participación en la respuesta inmune local y, por lo tanto, su reclutamiento en un microambiente inflamatorio. [25]

En relación a las comorbilidades, 4 ancianos presentaron neoplasias, de ellos, 2 $<$ 80 y 2 \geq de 80 años. Muchos estudios exploraron el papel de las células TDN en varios tipos de tumores y encontraron que poseen efectos protumorales o antitumorales según el tipo de

tumor. [26] En diversos infiltrados tumorales, estas células mostraron características superpuestas con las células T tolerogénicas. En un estudio realizado por Strippoli [27] y colaboradores, se documentó un enriquecimiento de TDN en los ganglios linfáticos invadidos por melanoma en comparación con los ganglios linfáticos negativos. Además, se encontró un aumento significativo de TDN en células supresoras/reguladoras en los ganglios linfáticos infiltrados de pacientes cuyo melanoma había progresado en comparación con pacientes que no habían progresado, lo que sugiere que estas células T están involucradas en los mecanismos inmunitarios que desencadenan la progresión metastásica.

Sin embargo, otros informes indicaron que es más probable que los TDN estén relacionados ontogénicamente con los linfocitos CD8+ y ejerzan una citotoxicidad hacia las células de cáncer hematológico, de pulmón, melanoma y páncreas. En esos informes, los TDN autólogos y alogénicos se cultivaron in vitro con líneas celulares de cáncer y mostraron citotoxicidad mediada por perforina y granzima B después de una interacción celular inducida por un TCR de alta afinidad o por el receptor inmunitario activador NKG2D, cuya expresión han sido moduladas por los inhibidores de PD1. Un papel anticancerígeno, en lugar de inmunosupresor, de los TDN podría parecer contradictorio, pero debe subrayarse que el escenario in vitro es diferente a las complejas interacciones entre los diferentes actores celulares involucrados en la respuesta inmune a los tumores que se observan in vivo. [27-30]

A pesar de que los TDN representan un pequeño porcentaje de las células T en la SP y los órganos linfoides, juegan un papel importante en muchas enfermedades. Pocos estudios han evaluado las funciones de las TDN en el cerebro. En un estudio realizado por Menga [31] y colegas se observó patrones de distribución completamente diferentes entre las células T CD4+, las células T CD8+ y las TDN en el cerebro isquémico. Tanto en muestras de SP humana como de ratón, el porcentaje de TDN, en lugar de células T CD4+ o células T CD8+, aumentó después del accidente cerebrovascular, lo que sugiere que las TDN desempeñan un papel crucial en la lesión cerebral isquémica. En esta casuística, hubo 9 adultos mayores con enfermedades cerebrovasculares, todos con valores normales de células TDN, lo que podría explicarse por el tiempo transcurrido del evento isquémico y la evaluación de esta población linfocitaria.

Las ECson características en este grupo etáreo, y este estudio, no estuvo exento de ello. En comparación con los adultos jóvenes, los ancianos tienden a tener condiciones nutricionales e inmunitarias deterioradas, que constituyen factores predisponentes. Estudios recientes han demostrado que la infiltración de células inflamatorias y la activación de mediadores inflamatorios juegan un papel importante en la progresión de la EC. La activación e infiltración de linfocitos T en el ventrículo izquierdo puede inducir fibrosis e hipertrofia cardíacas. [32]Los linfocitos T podrían activarse repetida y continuamente a lo largo del tiempo por antígenos de infecciones crónicas, y esta activación continua podría ser la causa de un aumento del grado inflamatorio y un probable daño tisular. Hasta la fecha, el principal inductor conocido de la diferenciación de células T es el CMV,[34] con sus consecuentes implicaciones en el aumento de los linfocitos TDN, como fue abordado anteriormente, ahora en un contexto inflamatorio.

Conclusiones

La mayor parte los adultos mayores que exhibieron valores porcentuales y absolutos elevados de linfocitos TDN, tuvieron asociado alguna comorbilidad, entre ellas las enfermedades cardiovasculares. Las infecciones y el cáncer se presentaron en adultos mayores con tendencia a los valores porcentuales altos, bases sobre la cual se sugiere que las células TDN participan en la vigilancia, defensa y se representan como la bisagra de un delicado equilibrio en la homeostasis del sistema inmunitario atendiendo a su doble identidad, es decir, su fenotipo patógeno o inmunosupresor según el microambiente inmunológico característico. Se necesitan más estudios en modelos de enfermedades para comprender las funciones críticas de las células TDN y los mecanismos subyacentes en entornos específicos, lo que puede facilitar el diagnóstico de estas entidades y abrir nuevas direcciones en las opciones de tratamiento inmunomodulador.

Referencias bibliográficas

1. Saavedra HD, García VB, González MA, Lorenzo-Luaces AP, Lage DA. Marcadores de inmunosenescencia y su relación con el cáncer de pulmón. Anales de la Academia de

Ciencias de Cuba. 2021; 11(1).

<http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/826>

2. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, et al. Immunosenescence and Inflamm-Aging As TwoSides of theSameCoin: FriendsorFoes? Front Immunol. 2017;8:1960. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
3. 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>
4. Lang PO, Samaras D. Aging adults and seasonal influenza: does the vitamin D status (H) arm the body? J Aging Res. 2012; 2012:806198. Doi: <https://doi.org/10.1155/2012/806198>
5. Lang PO, Mendes A, Socquet J, Assir N, Govind S, Aspinall R. Effectiveness of influenza vaccine in aging and older adult comprehensive analysis of the evidence. Clin Interv Aging. 2012; 7:55-64. Doi: <https://doi.org/10.2147/CIA.S25215>
6. Villegas VCA; Kokuina E; Breff FM. Determination of Reference Values for Double-Negative T Lymphocytes in Cuban Adults. MEDICC Review. 2020; 22 (4): 48-50. Doi: <https://doi.org/10.37757/MR2020.V22.N4.7>
7. Wang Y, Lu W, LI A, Sun Z, Wang L. Elevated CD3 low double negative T lymphocytes is associated with pneumonia and its severity in pediatric patients. Peer J 2018; 6:e6114. Doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.6114>
8. Han M, Harrison L, Kehn P, Stevenson K, Currier J, and Mary Ann Robinson MA. Invariant or Highly Conserved TCR α Are Expressed on Double-Negative (CD31CD42CD82) and CD81 T Cells. J Immunol. 1999; 163:301-311. <http://www.jimmunol.org/content/163/1/301>
9. Casado HI, Marsán SV, Díaz DG, Macías AC, Machín GS. Diagnóstico por citometría de flujo del Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2017; 36(Suppl):1-8. <http://www.revheatologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/794>

10. Renauera PA, Coita P, Sawalha AH. The DNA methylation signature of human TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-double-negative T cells reveals CG demethylation and a unique epigenetic architecture permissive to a broad stimulatory immune response. *Clin Immunol.* 2015; 156(1): 19-27. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.10.007>
11. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR-alpha+CD4-CD8-double-negative T cells. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41:739-748. Doi: <https://doi.org/10.1002/eji.201040982>
12. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, Du Temple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med.* 2000; 6:782-789. Doi: <https://doi.org/10.1038/77513>
13. Haug T, Aigner M, Peuser MM, Strobl CD, Hildner K, Mougiakakos D, et al. Human Double-Negative Regulatory T-Cells Induce a Metabolic and Functional Switch in Effector T-Cells by Suppressing mTOR Activity. *Front. Immunol.* 2019; 10:883. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.0088>
14. Crosbie MO, Costello JP, O'Farrelly C, Hegarty JE. Changes in Peripheral Blood Double-Negative T-Lymphocyte (CD3+ CD4- CD8-) Populations Associated With Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation. *Liver Transplantation and Surgery.* 1998; 4 (2):141-145. Doi: <https://doi.org/10.1002/lt.500040207>
15. Maccaril ME, Fuchs S, Kury P, Andrieux G, Volk S, Bengsch B et al. A distinct CD38+CD45RA+ population of CD4+, CD8+, and double-negative T cells is controlled by FAS. *J. Exp. Med.* 2020; 218 (2): e20192191. Doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20192191>
16. Villegas VCA, Kokuina E, Breff FM. Estimating Normal Values of Rare T-Lymphocyte Populations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. *MEDICC Review.* 2018; 20 (4): 4:20-26. Doi: <https://doi.org/10.37757/MR2018.V20.N4>
17. Chapiro E, Antony-Debre I, Marchay N. Sex chromosome loss may represent a disease-associated clonal population in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014; 53:240-247. Doi: <https://doi.org/10.1002/gcc.22134>

18. Vanura K. Sex as decisive variable in lymphoidneoplasms-anupdate. *ESMO Open* 2021; 6 (1):100001. Doi: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
19. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *NatRevImmunol.* 2016; 16(10):626-38. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.esmoop2020.100001>
20. Kokuina E, Breff FM, MD, Villegas VCA, Mora DI. Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. *MEDICC Review.* 2019; 21 (2-3):16-21. Doi: <https://doi.org/10.37757/MR2019.V21.N2-3.5>
21. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, et al. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front. Immunol.* 2019; 10:2247. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02247>
22. Stervbo U, Bozzetti C, Baron U, Jürchott K, Meier S, Mälzer NJ. Effects of aging on human leukocytes (part II): immunophenotyping of adaptive immune B and T cell subsets. 2015; 37: 93. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9829-2>
23. Verdecia GB, Saavedra HD, Lorenzo-Luaces P, Badía AJ, Rupalé IL, Mazorra HZ, et al. Immunosenescence and gender: a study in healthy Cubans. *Immunity & Ageing.* 2013; 10,16. Doi: <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-16>
24. Hernández RE, Marsán SV, Casado HI, Puga GR, García RD, Reyes ZMC, et al. Effect of Biomodulina-T® and VA-MENGOC-BC® on lymphocyte subpopulations in older adults. *Exp Gerontol.* 2021; 153: 111497. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111497>
25. Ferraz R, Cunha CF, Pimentel FI, Lyra M, Pereira ST, Schubach OA, et al. CD3+CD4negCD8neg (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a+ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasites & Vectors.* 2017; 10:219. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2152-2>
26. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H, et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front. Immunol.* 2022; 13:816005. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>

27. Strippoli S, Fanizzi A, Negri A, Quaresmini D, Nardone A, Armenio A, et al. Examining the Relationship between Circulating CD4-CD8- Double-Negative T Cells and Outcomes of Immuno-Checkpoint Inhibitor Therapy- Looking for Biomarkers and Therapeutic Targets in Metastatic Melanoma. *Cells* 2021, 10, 406. Doi: <https://doi.org/10.3390/cells10020406>
28. Lee J, Minden MD, Chen WC, Streck E, Chen B, Kang H, et al. Allogeneic Human Double Negative T Cells as a Novel Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia and Its Underlying Mechanisms. *Clin. Cancer Res.* 2018; 24, 370-382. Doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2228>
29. Yao J, Ly D, Dervovic D, Fang L, Lee JB, Kang H, et al. Human double negative T cells target lung cancer via ligand-dependent mechanisms that can be enhanced by IL-15. *J. Immunother. Cancer.* 2019; 22; 7(1):17. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0507-2>
30. Lu Y, Hu P, Zhou H, Yang Z, Sun YU, Hoffman RM, et al. Double-negative T Cells Inhibit Proliferation and Invasion of Human Pancreatic Cancer Cells in Co-culture. *Anticancer Res.* 2019; 39: 5911-5918. Doi: <https://doi.org/10.21873/anticancer.13795>
31. Menga H, Zhaoa, CaoaX, Haof J, Zhanga H, Liu Y. Double-negative T cells remarkably promote neuroinflammation after ischemic stroke. *PNAS.* 2019; 116 (12). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1814394116
32. Xiaojing C, Yanfang L, Yanqing G, Fangfang C. Thymopentin improves cardiac function in older patients with chronic heart failure. *Anatol J Cardiol* 2017; 17: 24-30
Doi: <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2016.6692>
33. Torre GA, García BE, Martínez LR, Rioseras B, Díaz MB, Lambert JL, et al. CMV Infection Is Directly Related to the Inflammatory Status in Chronic Heart Failure Patients. *Front. Immunol.* 2021; 12:687582. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.687582>