

Título: Efecto inmunomodulador de la Biomodulina T en adultos mayores institucionalizados durante la COVID 19 en Cuba.

Immunomodulatory effect of Biomodulin T in institutionalized older adults during COVID 19 in Cuba.

Resumen

Introducción: El envejecimiento provoca cambios que afectan a los componentes del sistema inmune, conocido como inmunosenescencia. La BIOMODULINA T es un inmunomodulador biológico de origen natural, de producción nacional, que puede constituir una alternativa para la restauración inmune en el adulto mayor y una herramienta preventiva para los institucionalizados durante la epidemia de la COVID 19, por lo que la presente investigación tuvo como objetivo demostrar con un nuevo esquema terapéutico (1bb, 2 veces por semana durante 6 semanas) los cambios inducidos en la distribución de los compartimientos linfocitarios de pacientes geriátricos cubanos institucionalizados, como premisa para su uso, en prevenir la infección por el virus SARS-CoV-2.

Métodos: Se estudiaron 30 adultos mayores del hogar de ancianos “Alfredo Gómez Gendra”, de La Habana, de ambos sexos, de 60 a 99 años, con características de fragilidad, multimorbilidad, deterioro cognitivo, alto grado de dependencia, polifarmacia y alteraciones del estado nutricional. El esquema utilizado fue de 1 bulbo de BiomodulinaT, dos veces por semana, durante seis semanas por vía intramuscular. Se les realizó hemograma completo y la determinación del inmunofenotipo linfocitario por citometría de flujo multiparamétrica, antes del inicio del tratamiento, a las 6 semanas y 6 meses después. Para la comparación entre los grupos se hicieron estimaciones puntuales e intervalos de confianza de Odds ratio.

Resultados: Los pacientes mostraron signos de inmunosenescencia como la disminución de los linfocitos B, T y B vírgenes, el aumento de células efectoras terminalmente diferenciadas y el incremento de células B maduras doble positivas CD19+CD20+CD5+ con potencialidad maligna. Se demuestra el efecto inmunorregulador de la Biomodulina que provoca una expansión significativa de las células vírgenes T CD4+ y CD8+, el número de linfocitos B (CD3-/CD19+), las células NK, el incremento del cociente CD4+/CD8+ y la capacidad de activación de la respuesta inmune incrementando las poblaciones de activación CD3+HLA-DR+ y CD3+CD25+, así como la disminución de las células B maduras doble positivas.

Conclusiones: La Biomodulina induce la restauración inmunológica de las poblaciones linfocitarias T y B, modula la respuesta inmune e inflamatoria, constituye una alternativa terapéutica para prevenir la COVID-19 en grupos vulnerables y muestra nuevas potencialidades terapéuticas en los síndromes linfoproliferativos crónicos B en el adulto mayor.

Palabras clave: linfocitos; células vírgenes; activación linfocitaria; adulto mayor; BIOMODULINA T®.

Keywords: lymphocytes; virgin cells; lymphocyte activation; old man; BIOMODULIN T®

Introducción

El envejecimiento se acompaña de numerosos cambios que afectan a los componentes del sistema inmune, que en su conjunto se denomina inmunosenescencia. Estos cambios se atribuyen al impacto nutricional, la desregulación de algunas vías hormonales y a la estimulación antigénica crónica.⁽¹⁾ En la actualidad, se considera como un proceso de adaptación/remodelación inmune, como resultado de la exposición antigénica crónica y el efecto del paso de los años, más que un fenómeno esencialmente deletéreo.⁽²⁻⁴⁾

La inmunosenescencia se consideró durante un tiempo como perjudicial, porque a menudo se acompaña de un proceso inflamatorio subyacente caracterizado por la acumulación de factores pro-inflamatorios. Se sugiere que en su conjunto, la inmunosenescencia y la inflamación, se encuentran asociadas al origen de la mayoría de las enfermedades de la ancianidad, tales como infecciones, el cáncer, desórdenes autoinmunes y enfermedades crónicas inflamatorias. No obstante, un gran número de inmunogerontólogos han cambiado esta interpretación negativa de la inmunosenescencia respecto a su significación en las alteraciones del sistema inmune relacionadas con la edad. Si se consideran estos cambios desde una perspectiva evolucionista, es más acertada la interpretación de que estos cambios son adaptativos o de remodelación. Los cambios inmunes globales pueden conducir a varias enfermedades y también es obvio, que estos cambios son necesarios para una supervivencia extendida o longevidad. Datos recientes sugieren que sin la existencia del dúo inmunosenescencia/inflamación (representan dos caras del mismo fenómeno), la longevidad se haría más corta.⁽⁴⁾

La pertinencia de aplicar intervenciones que potencien el sistema inmune de los ancianos ha sido objeto de discusión, sin embargo, algunas estrategias pudieran contribuir positivamente a la restauración inmunológica en personas de la tercera edad para enfrentar agresiones externas como las infecciones y cambios displásicos que conducen al cáncer, entre ellas se encuentra la práctica de ejercicios físicos, una nutrición saludable, el empleo de factores tímicos y hormonas sexuales, así como el uso de citocinas^(5,6). Lograr que la inmunidad celular mantenga una adecuada diversidad del repertorio de poblaciones y subpoblaciones linfoides y con mejor funcionalidad durante el envejecimiento, favorece la protección y el estado de salud del adulto mayor.

Aunque la literatura especializada se enfoca principalmente en el desbalance del linaje T, debido a que la involución del timo es probablemente la disfunción inmune relacionada con la edad mejor estudiada, la inmunosenescencia también afecta al compartimiento de células B, la inmunidad humoral y contiene cambios en la función de los órganos linfoides primarios y secundarios, que incluye a las células madre hematopoyéticas en la médula ósea.⁽⁷⁻⁹⁾

La comprensión del envejecimiento del sistema inmune ha progresado rápidamente en las últimas décadas, pero aún permanecen desconocidos algunos de los mecanismos que subyacen a él. La relación entre los cambios relacionados con la edad que afectan al sistema inmunológico, no están elucidados completamente.⁽⁹⁾

Así como el envejecimiento *per se* puede ser modificado a través de la nutrición y de intervenciones farmacológicas, la inmunosenescencia es igualmente un proceso flexible que puede ser abordado desde múltiples aristas. La mejora de

la activación del sistema inmune innato y adaptativo, la alteración de la homeostasis mediante la manipulación de citocinas y el rejuvenecimiento del sistema inmune con el objetivo de reiniciar la producción de nuevos linfocitos *naïve* o vírgenes, son algunas de las estrategias abordadas por los especialistas.⁽⁹⁾

La BIOMODULINA T® (BT) es un producto cubano (Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) registrado en 1994 para el tratamiento de estados que presentan una disfunción inmunológica principalmente de tipo celular, como infecciones a repetición en el adulto mayor. Es un inmunomodulador biológico de origen natural, no hemoderivado, compuesto por fracciones específicas de timo bovino de naturaleza polipeptídica.^(10,11) (CECMED, 2015)

Existen varios reportes de los beneficios de este producto en la disminución de las infecciones del tracto respiratorio bajo en los niños ⁽¹²⁾ y también, en los adultos mayores. ⁽¹³⁾ Además, se ha empleado en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en pacientes geriátricos. ⁽¹⁴⁾ y en el tratamiento de un niño con Síndrome DiGeorge. ⁽¹⁵⁾ Ha sido demostrada su habilidad para aumentar el área tímica en niños con hipoplasia tímica. ⁽¹²⁾ Más recientemente, Saavedra y colaboradores encontraron hallazgos que sugieren que la administración de BT es una estrategia promisorio para la restauración inmune de ancianos centenarios y el mejoramiento de la inmunoterapia en pacientes con cáncer. ⁽¹⁶⁾

La BT se usó recientemente en un ensayo clínico fase IV para prevenir la COVID-19. Fue administrada a más de 10 000 adultos mayores durante esta pandemia, principalmente a pacientes positivos a SARS-CoV-2, y a otras personas en los hogares de ancianos -como medida preventiva- teniendo en cuenta que ellos tienen un riesgo mayor de presentar las manifestaciones más serias de la enfermedad. El objetivo del tratamiento fue mejorar la respuesta inmune y la salud en los individuos ancianos, y ayudar a contener la transmisión de la COVID-19 y otras infecciones, en dichas instituciones.⁽¹⁷⁾

El presente estudio, si bien sigue la línea investigativa antes referida, se propuso como objetivo principal determinar los cambios inducidos por la BT en la distribución de los compartimientos linfocitarios de pacientes geriátricos cubanos institucionalizados y con comorbilidades compensadas, no infectados por el SARS COV-2.

Materiales y métodos

Pacientes y tratamiento

La investigación se desarrolló en el marco 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”, aprobado por el Centro para el Control Estatal de Medicamentos (CECMED), cuyo Centro promotor, es el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). <http://registroclinico.sld.cu/ensayos/RPCEC00000319-Sp>⁽¹⁸⁾(RPEC, 2020)

Criterios de inclusión: 1. Pacientes que cumplieran el criterio diagnóstico, 2. Cualquier sexo y color de la piel con edad de 60 años y más, 3. Pacientes que expresaran su consentimiento por escrito, para participar en el estudio y en caso de que estos presentaran deterioro cognitivo mayor, sería firmado por un familiar, tutor o cuidador. El primer paciente fue incluido el 13 de abril de 2020.

Criterios de exclusión: 1. Pacientes que hubieran recibido tratamiento con BT en los dos meses anteriores, 2. Pacientes con hipersensibilidad conocida a

cualquier componente de la formulación, 3. Pacientes con estados alérgicos agudos o historia de reacciones alérgicas severas, 4. Pacientes con enfermedades intercurrentes no controladas que incluyen, pero no se limitan a: infecciones agudas con cuadro febril concomitante, insuficiencia cardíaca congestiva sintomática, angina de pecho inestable.

Los pacientes fueron tratados con dos dosis semanales de BT administradas por vía intramuscular, durante 6 semanas. Las muestras fueron obtenidas por venopuntura, en 30 pacientes del Hogar de Ancianos “Alfredo Gómez Gendra”, de La Habana, antes de comenzar el tratamiento (pre-tratamiento), una semana después de terminado el mismo (6 semanas) y 6 meses después.

Hemograma

En todos los ancianos se realizó el hemograma completo antes de la administración de la BT y al finalizar el tratamiento.

Las muestras de sangre periférica se tomaron de punción venosa, en tubos colectores plásticos de 5 ml con Etilendiaminotetraacético (EDTA K2). Las colectas se leyeron en un Contador hematológico Sysmex de la serie XS 1000I. Se evaluaron diferentes parámetros del hemograma completo, entre ellos: hematocrito, hemoglobina, recuento de eritrocitos, índices eritrocitarios, recuento de glóbulos blancos, plaquetas y el recuento diferencial leucocitario de cinco poblaciones (segmentados, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos).

Citometría de flujo Multiparamétrica (CFM)

La muestra procedente de sangre periférica fue depositada en un tubo con etilendiaminotetraacetato (EDTA). La identificación y cuantificación de los antígenos de interés se desarrolló por la técnica de CFM, con el empleo de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra los antígenos de activación y de diferenciación linfoides B y T. Las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología.

El panel de AcMo que se empleó fue el siguiente:

Anticuerpos monoclonales	Fluorocromos
AntiCD4/CD8/CD3	FITC/RPE/PC5***
Anti-CD3	FITC**/ PerCP***
Anti-CD4	FITC***
Anti-CD5	RPE**
Anti-CD8	FITC***
Anti-CD19	PC5**/APC**
Anti-CD20	FITC**
Anti-CD25	APC**
Anti-CD27	RPE**/APC***
Anti-CD45	PC5**/PerCP***
Anti-CD45RA	APC**/ PerCP***
Anti-IgD	FITC***
Anti-IgM	RPE***
Anti-HLA-DR	RPE**
Anti-TCR $\alpha\beta$	APC***

FITC: isotiocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, APC: alofococianina, PC5: ficoeritrina cianina 5. PerCP: proteína peridín clorofila*: DAKO, **: Milteny, ***: BeckmanCoulter.

La tinción extracelular se realizó siguiendo dos protocolos, uno para linfocitos T y otro para B. En el caso de los linfocitos T, se incubaron 50µL de muestra con los AcMo durante 20 minutos, protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente se lisaron los hematíes usando la solución Red Blood Cell Lysis Solution (10X) de MiltenyiBiotec, según sus recomendaciones, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con solución salina fisiológica a 0,9%, 10 minutos a 1500rpm, para eliminar el lisante y obtener un botón celular limpio. Las células se fijaron con 300 µL de formaldehído al 1% y se guardaron a 4°C.

Para los linfocitos B, 100µL de muestra fueron primero lisados y lavados de la manera descrita anteriormente, con el objetivo de eliminar las inmunoglobulinas presentes en el plasma, que pudieran causar uniones inespecíficas al cuantificar las inmunoglobulinas de membrana (Igm), y se realizó la incubación con los AcMo durante 30 minutos. Tras este tiempo se procedió a realizar un lavado y fijar.

La lectura se realizó en un citómetro de flujo MACSQuant® de MiltenyiBiotec, Alemania. Fueron adquiridas 100 000 células por tubo. El análisis se efectuó con el empleo del programa informático Kaluza, versión 1.2, del citómetro GALLIOS, Beckman Coulter. La estrategia de análisis se muestra en las Figuras 1-4.

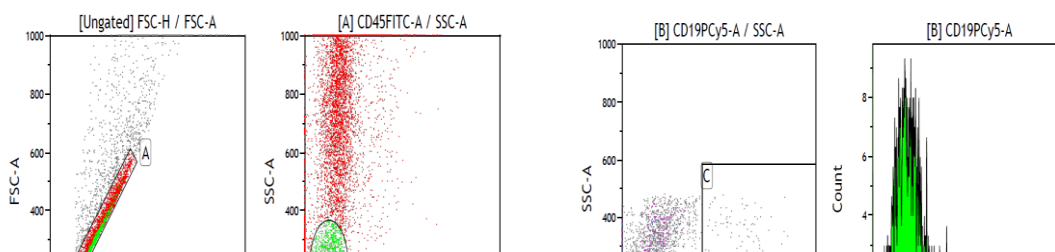
Los resultados fueron expresados en valores relativos (% de células) y en valores absolutos (cells/µL). Estos últimos fueron calculados según la siguiente fórmula: $\text{Conteo absoluto (células/µL)} = \text{Conteo de linfocitos (número de células/µL)} \times \% \text{ de la subpoblación celular de interés} \div 100$.

Análisis estadístico

Para determinar la significación estadística entre los diferentes parámetros del hemograma, antes y después del tratamiento con BT, se utilizó el paquete estadístico *GraphPad Prism* (versión 6.00). Los datos que presentaron distribución normal, se procesaron utilizando el estadístico t-Student. El test de rangos con signo de Wilcoxon se empleó cuando los datos no cumplieron una distribución normal. Se tomó como significativa una $p < 0,05$. Para la detección de anemia se tuvo en cuenta los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Se definió la leucopenia cuando el recuento de leucocitos fue inferior a $4,5 \times 10^9/L$ y la trombocitopenia, cuando los valores del recuento plaquetario fueron inferiores a $150 \times 10^9/L$ según los valores de referencia del equipo.(19)

Para la evaluación de los inmunofenotipos linfocitarios se utilizó el test para normalidad Shapiro-Wilk. La significación estadística entre los tres puntos de estudio establecidos fue evaluada usando la prueba no paramétrica Mann Whitney U para muestras pareadas llamada Frank Test y la prueba t-Student para el análisis antes y después (muestras pareadas). El análisis estadístico fue realizado con el paquete “compare Groups”⁽²⁰⁾ (Subirana et al., n.d) del sistema estadístico R (R Computing., Vienna, Austria). Calculamos los odds ratios (OR) y sus intervalos de confianza asociados (IC). Las variables categóricas se definieron de la siguiente manera: VERDADERO

(porcentaje o valores absolutos dentro del rango de referencia para cada población estudiada) y FALSO (porcentaje o valores absolutos fuera del rango de referencia para cada población estudiada). En todos los análisis, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.



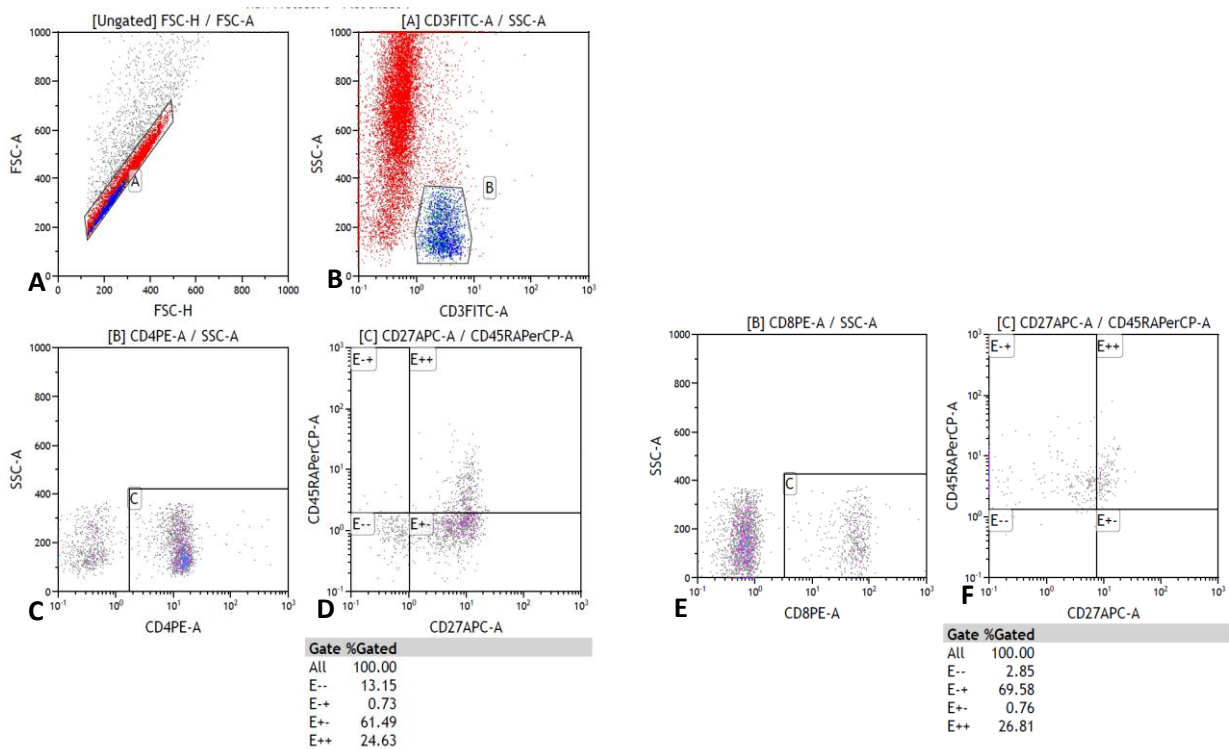


Figura. 2: Secuencia de análisis del inmunofenotipo de células T. A: Diagrama de puntos FSC-H/FSC-A; selección de singletes. B: Diagrama de puntos SSC-A/CD3; selección de células T. C: Diagrama de puntos SSC-A/CD4; selección de linfocitos T CD3+/CD4+. D: Diagrama de puntos CD45RA/CD27; selección de CD3+/CD4+ subpoblaciones del compartimiento T (vírgenes [CD27 + CD45RA +]; memoria central [CD27 + CD45RA-]; memoria efectora [CD27-CD45RA-] y efectoras [CD27-CD45RA +]). E: Diagrama de puntos SSC-A/CD8; selección de linfocitos T CD3+/CD8+. F: Diagrama de puntos CD45RA/CD27; selección de CD3+/CD8+ de compartimientos de subpoblaciones T (vírgenes [CD27 + CD45RA +]; memoria central [CD27+CD45RA-]; memoria efectora [CD27-CD45RA-] y efectoras [CD27-CD45RA +]).

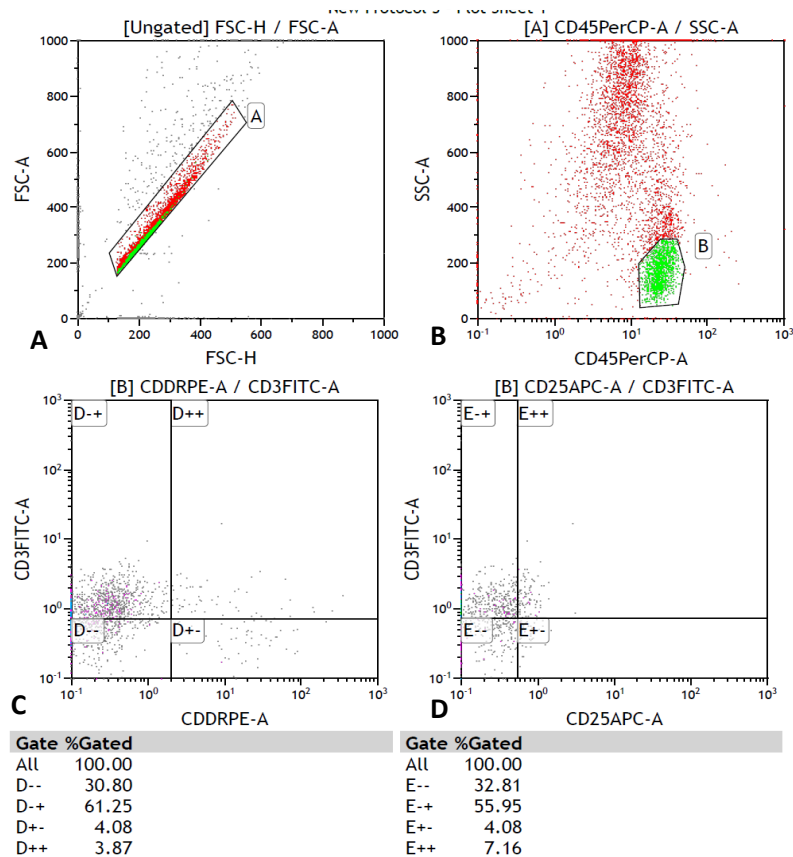


Figura. 3: Secuencia de análisis de activación de linfocitos T. A: Diagrama de puntos FSC-H/FSC-A; selección de singletes. B: Diagrama de puntos SSC-A/CD45; selección de linfocitos. C: Diagrama de puntos CD3/HLA-DR; selección de población T activada. D: Diagrama de puntos CD3/CD25; selección de población T activada.

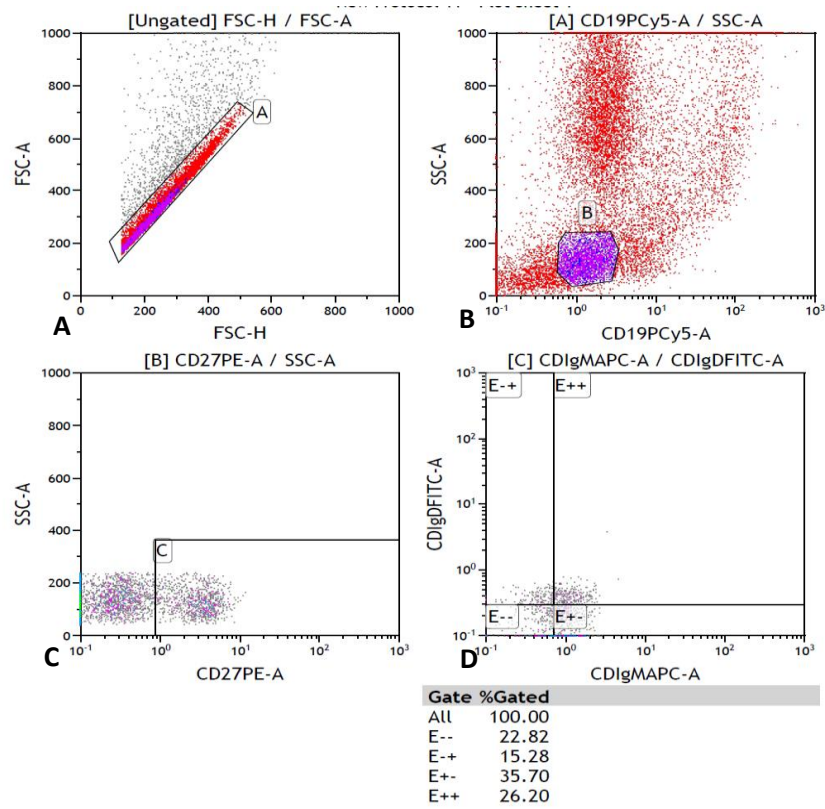


Figura 4: Secuencia de análisis de inmunofenotipo de linfocitos B. A: Diagrama de puntos FSC-H/FSC-A; selección of singletes. B: Diagrama de puntos SSC-A/CD19; selección de linfocitos B. C: Diagrama de puntos SSC-A/CD27; selección de linfocitos B con o sin expresión de antígeno de memoria. D: Diagrama de puntos IgD/IgM; selección de células B vírgenes IgD + IgM + CD27-E: Dotplot IgD / IgM; selección de células B de memoria (memory IgM [IgD-IgM + CD27 +] y postswitched [IgD-IgM-CD27 +])

Consideraciones éticas

Los comités de ética de investigación del Centro de Investigación de Longevidad, Envejecimiento y Salud (CITED) y del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) aprobaron este estudio. En todos los procesos se aplicó la Declaración de Helsinki.

Resultados

La muestra objeto de estudio se caracterizó por la presencia de comorbilidades tales como: enfermedad cardiovascular (83,3%), Diabetes mellitus (30,0%), síndrome demencial (53,3%), neoplasia (13,3%), asma (6,6%), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (26,6%) y enfermedad cerebrovascular (26,6%). Esto refuerza la complejidad de las intervenciones de salud pública en este grupo de edad e influye negativamente en sus evaluaciones.

Del total de ancianos estudiados, 22 (73,3 %) fueron del sexo femenino y 8 (26,7 %) del masculino. La edad promedio fue de 82,5 años. Predominaron los adultos mayores que tuvieron edades comprendidas entre 70 y 80 años, lo que representó 70 % de la muestra estudiada. (Tabla 1)

Tabla 1. Distribución de los adultos mayores estudiados, según edad y sexo
n=30

Edad (años)	Sexo					
	Femenino		Masculino		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
70-75	7	2,1	3	0,9	10	3
76-80	7	2,1	4	1,8	11	3
81-85	6	1,8	1	0,3	7	2,1
>86	2	0,6	0	0	2	0,9
Total	22	6,1	8	3	30	9,1

La anemia estuvo presente en 6 % de los casos, con valores entre 9,0 a 10,9 g/L. Después de aplicar la BT no se encontraron diferencias significativas en los hemogramas de los pacientes estudiados.

El hallazgo más frecuente fue la variación de los resultados de los linfocitos dentro del diferencial leucocitario. Se obtuvo una frecuencia de ancianos con valores de linfocitos disminuidos por debajo de los valores de referencia del 2,3 % y 3,33 % aumentados, por encima del intervalo de referencia. El conteo global de leucocitos se mantuvo dentro de los parámetros normales. En cinco ancianos, disminuyó el conteo de plaquetas por debajo de $150 \times 10^9/L$, después de suministrar la BT por 6 semanas, estos valores no afectaron la salud de los sujetos estudiados. (Tabla 2)

Al evaluar la distribución de los compartimientos celulares T CD4+ y CD8+ ("vírgenes" [CD27+CD45RA+], memoria central [CD27+CD45RA-], memoria efectora [CD27-CD45RA-] y efectoras [CD27-CD45RA+]) un cambio significativo fue notado para estas variables después del tratamiento con BT.

Como era esperado, en los ancianos estudiados, se encontraron valores disminuidos de las células T "vírgenes", tanto para CD4+ como CD8+, con

predominio de memoria central y efectora al inicio del tratamiento (datos no mostrados).

Tabla 2. Comportamiento de los parámetros hematológicos e inmunológicos en adultos mayores antes y después de la administración de la Biomodulina T(n=30)

Parámetros hematológicos e inmunológicos	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	p
Hemoglobina (g/L)	12,12 (9,5-14,2)	12,18 (9,9-14,6)	0,65
Hematocrito (%)	0,38 (0,30 -0,45)	0,38 (0,33-0,44)	0,31
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	241,6 (130-345)	219,5 (59-346)	0,08
Leucocitos global x10 ⁹ /L	6,31 (3,0-13,2)	6,38 (3,1-12,9)	0,68
Segmentados x10 ⁹ /L	58,03 (42,8-68,1)	56,68 (38,9-69,6)	0,31
Linfocitos x10 ⁹ /L	27,78 (17,1-51,6)	28,45 (15,6-47,9)	0,90
Monocitos x10 ⁹ /L	9,27 (6,0-14,4)	9,64 (5,8-15,5)	0,31
Eosinófilos x10 ⁹ /L	5,01 (0,4-26,4)	5,38 (0,1-28,0)	0,86
Basófilos x10 ⁹ /L	0,22 (0,0-0,4)	0,25 (0,0-0,5)	0,37

El análisis mostró un aumento estadísticamente significativo de las células T vírgenes CD4+ a las 6 semanas (OR 1.03 [1.00;1.07], p 0.023) y 6 meses (OR 1.04 [1.00;1.08], p 0.040) pero sólo en los valores porcentuales. (Tablas 3 y 4) Mientras que los linfocitos vírgenes CD8+ mostraron valor p significativo en la evaluación realizada a los 6 meses, tanto para valores porcentuales (OR 1.04 [1.00;1.08], p 0.031) como conteos absolutos (OR 1.00 [1.00;1.00], p 0.091), después del tratamiento con BT. (Tablas 3 y 4)

En el caso de las células de memoria central, tanto para linfocitos CD4+ como CD8+, un incremento significativo fue observado después de los 6 meses del tratamiento; y este efecto fue para los valores porcentuales (CD3+CD4+ OR 1.05 [1.02;1.08], p 0.002; CD3+CD8+ OR 1.04 [1.00;1.07], p 0.02) (Tabla 3) y para los conteos absolutos (CD3+CD4+ OR 1.00 [1.00;1.00], p 0.017; CD3+CD8+ OR 1.00 [1.00;1.00], p 0.024). (Tabla 4)

El resto de los compartimientos no mostró diferencias estadísticamente significativas. Además, el tratamiento con BT no mostró diferencias estadísticamente significativas en los cambios de las subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ cuando se compararon los tiempos de evaluación (pretratamiento, 6 semanas y 6 meses); teniendo en cuenta los valores de referencia (datos no mostrados).

Tablas 3 y 4: Distribución del inmunofenotipo en adultos mayores de acuerdo al tiempo posterior del tratamiento con Biomodulina T.

(3)

Immunopenotipos [%] (RVR [45-47])	Línea de tiempo	Mediana antes del tratamiento $\pm$ DS /Mediana después del tratamiento $\pm$ SD	OR [95 %IC]	p
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD27 ⁺ /CD45RA ⁺ (vírgenes) [34.8 - 70.3]	6 semanas Post-tratamiento	13.22 $\pm$ 15.33 / 21.55 $\pm$ 17.13	1.03 [1.00;1.07]	0.023 *
	6 meses Post-Tratamiento	13.22 $\pm$ 15.33 / 23.15 $\pm$ 13.97	1.04 [1.00;1.08]	0.040 *
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD27 ⁺ /CD45RA ⁻ (Memoria Central) [24.3 - 42.7]	6 semanas Post-Tratamiento	30.77 $\pm$ 21.73 / 39.40 $\pm$ 18.29	1.02 [0.99;1.04]	0.248
	6 meses Post-Tratamiento	30.77 $\pm$ 21.73 / 49.11 $\pm$ 16.64	1.05 [1.02;1.08]	0.002 *
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD27 ⁺ /CD45RA ⁺ (vírgenes) [48.6 - 87.5]	6 semanas Post-Tratamiento	13.85 $\pm$ 12.93 / 8.460 $\pm$ 15.80	1.04 [1.00;1.09]	0.069
	6 meses Post-Tratamiento	13.85 $\pm$ 12.93 / 20.11 $\pm$ 15.15	1.04 [1.00;1.08]	0.031 *
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD27 ⁺ /CD45RA ⁻ (Memoria Central) [9.8 - 37.6]	6 semanas Post-Tratamiento	17.92 $\pm$ 17.77 / 21.99 $\pm$ 17.58	1.02 [0.99;1.05]	0.208
	6 Meses Post-Tratamiento	17.92 $\pm$ 17.77 / 29.52 $\pm$ 15.84	1.04 [1.00;1.07]	0.029 *
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺ [3.7 - 28.0]	6 semanas Post-Tratamiento	11.93 $\pm$ 7.551 / 16.50 $\pm$ 13.63	1.03 [0.98;1.08]	0.473
	6 Meses Post-Tratamiento	11.93 $\pm$ 7.551 / 38.33 $\pm$ 23.05	1.11 [1.05;1.17]	<0.001 *
CD3 ⁺ /HLA ⁻ /DR ⁺ [-]	6 semanas Post-Tratamiento	2.190 $\pm$ 2.737 / 6.610 $\pm$ 5.166	1.61 [1.24;2.09]	<0.001 *
	6 Meses Post-Tratamiento	2.190 $\pm$ 2.737 / 3.430 $\pm$ 7.467	1.12 [0.95;1.32]	0.102
CD3 ⁺ /CD25 ⁺ [-]	6 semanas Post-Tratamiento	1.140 $\pm$ 0.945 / 4.575 $\pm$ 7.765	2.51 [1.46;4.31]	<0.001 *
	6 meses Post-Tratamiento	1.140 $\pm$ 0.9447 / 0.14 $\pm$ 6.158	1.00 [0.89;1.12]	<0.001 *

(4)

Immunofenotipos [cells per μL] (RVR [45-47])	Línea de tiempo	Mediana antes del tratamiento $\pm$ DS /Mediana después del tratamiento $\pm$ DS	OR [95 % IC]	p
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD27 ⁺ /CD 45RA ⁺ (Vírgenes) [335-725]	6 semanas Post- tratamiento	194.0 $\pm$ 293.8 / 340.7 $\pm$ 268.6	0.99 [0.94;1.04]	0.367
	6 meses Post- Tratamiento	194.0 $\pm$ 293.8 / 345.5 $\pm$ 302.3	1.26 [1.02;1.56]	0.940
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD27 ⁺ /CD 45RA ⁻ (Memoria Central) [201-419]	6 semanas Post- tratamiento	431.3 $\pm$ 518.3 / 656.9 $\pm$ 352.4	1.00 [1.00;1.00]	0.147
	6 meses Post- Tratamiento	431.3 $\pm$ 518.3 / 724.3 $\pm$ 539.2	1.00 [1.00;1.00]	0.017 *
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD27 ⁺ /CD 45RA ⁺ (vírgenes) [118-312]	6 semanas Post- tratamiento	180.5 $\pm$ 265.7 / 245.3 $\pm$ 233.3	1.04 [1.00;1.09]	0.069
	6 meses Post- Tratamiento	180.5 $\pm$ 265.7 / 283.1 $\pm$ 398.4	1.04 [1.00;1.08]	0.031 *
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD27 ⁺ /CD 45RA ⁻ (Memoria Central) [30-166]	6 semanas Post- tratamiento	264.8 $\pm$ 289.7 / 319.6 $\pm$ 343.6	1.00 [1.00;1.00]	0.329
	6 meses Post- Tratamiento	264.8 $\pm$ 289.7 / 389.9 $\pm$ 305.0	1.00 [1.00;1.00]	0.024 *
CD3 ⁻ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺ [70-652]	6 semanas Post- tratamiento	195.6 $\pm$ 211.0 / 243.0 $\pm$ 268.3	1.00 [1.00;1.01]	0.469
	6 meses Post- Tratamiento	195.6 $\pm$ 211.0 / 586.7 $\pm$ 653.7	1.00 [1.00;1.01]	0.001 *
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺ [-]	6 semanas Post- tratamiento	36.82 $\pm$ 44.28 / 99.03 $\pm$ 115.1	1.03 [1.01;1.04]	<0.001 *
	6 meses Post- Tratamiento	36.82 $\pm$ 44.28 / 37.67 $\pm$ 85.40	1.01 [1.00;1.01]	0.281
CD3 ⁺ /CD25 ⁺ [-]	6 semanas Post- tratamiento	19.44 $\pm$ 28.08 / 73.88 $\pm$ 155.1	1.03 [1.01;1.05]	<0.001 *
	6 meses Post- Tratamiento	19.44 $\pm$ 28.08 / 2.100 $\pm$ 95.71	1.00 [0.99;1.01]	<0.001 *

(RVR) Rango de valores normales de referencia. (*) Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos antes y después del tratamiento. (DS) Desviación Estándar. (IC) Intervalo de confianza.

Al comienzo del tratamiento, el 43% de los pacientes mostraron valores de células B CD19+ por debajo de la referencia, y al término de los 6 meses sólo 2 pacientes (6%) mostraron valores bajos de esta población linfocítica. (Tabla 5). Un análisis más exhaustivo permitió confirmar que este efecto fue significativo y mantenido en el tiempo. Para los valores porcentuales, la dependencia del aumento de la población CD19+ con el tratamiento de BT medido por el tamaño del efecto a las 6 semanas (OR 1.21 [1.06;1.39], p 0.002) y 6 meses (OR 1.29 [1.11;1.50], p 0.001). Aunque el mismo comportamiento no se observó para los conteos absolutos, los valores significativos de p sugieren que no fue por casualidad. (Tabla 6)

Tabla 5: Linfocitos B CD19+ en adultos mayores de acuerdo al tiempo de administración de la Biomodulina T.

	% de pacientes fuera del RVR/número de pacientes (n=30)		
CD19+	pre tratamiento	6 semanas	6 meses
	43/13	20/6	10/3

RVR: Rango de valores normales de referencia

Tabla 6: Distribución de la población de linfocitos B en el adulto mayor de acuerdo al tiempo posterior del tratamiento con Biomodulina T

Immunofenotipos [RVR] [45-47]	Línea de tiempo	Mediana antes del tratamiento $\pm$ DS /Mediana después del tratamiento $\pm$ DS	OR [95 %IC]	p
CD19 ⁺ [5.4 – 49.5] (%)	6 semanas Post-tratamiento	5.845 $\pm$ 3.438 / 8.845 $\pm$ 7.140	1.21 [1.06;1.39]	0.002 *
	6 meses Post-Tratamiento	5.845 $\pm$ 3.438 / 13.10 $\pm$ 9.054	1.29 [1.11;1.50]	<0.001 *
CD19 ⁺ [114 - 1491] (células per μ L)	6 semanas Post-tratamiento	93.09 $\pm$ 80.52 / 152.1 $\pm$ 125.4	1.01 [1.00;1.01]	0.005 *
	6 meses Post-Tratamiento	93.09 $\pm$ 80.52 / 178.7 $\pm$ 168.2	1.01 [1.00;1.01]	0.003 *

(RVR) Rango de valores normales de referencia. (*) Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos antes y después del tratamiento. (DS) Desviación Estándar. (IC) Intervalo de confianza.

En el compartimiento B se analizaron las poblaciones “*vírgenes*” (IgD+IgM+CD27-), memoria IgM (IgD-IgM+CD27+) y memoria “*postswitched*” (IgD-IgM-CD27+).⁽²¹⁾

El análisis estadístico no evidenció significación cuando se compararon el estado pre tratamiento y los post tratamiento con BT, en cada una de estas poblaciones. Sin embargo, después de 6 semanas de la administración del tratamiento con BT, el 36,6% de los ancianos aumentaron sus células B vírgenes, el 55,1% de estas disminuyeron su población B de memoria IgM y el 30% de las postswitched. (datos no mostrados). Aunque esta observación no se hizo 6 meses después de finalizado el tratamiento, constituye una evidencia muestral para proyecciones futuras en el estudio del adulto mayor relacionado con el efecto del tratamiento con BT sobre este importante compartimiento celular.

Otras poblaciones en las cuales fue evaluado el efecto del tratamiento de BT en adultos mayores fueron las células NK (CD3-CD16+CD56+) y aquellas relacionadas con el proceso de activación linfocitaria T (CD3+HLA-DR+ y CD3+CD25+). El tratamiento con BT mostró significación estadística sobre la población de células asesinas naturales (NK) a los 6 meses, como muestran los valores porcentuales (OR 1.11 [1.05;1.17], p 0.001) (Tabla 3), mientras que los conteos absolutos solo mostraron un aumento significativo como una variable continua (p<0,05) y no para la variable categórica (OR 1,00 [1,00; 1.01], pág. 0.001). Se constató además el efecto directo del fármaco, medido por su OR. Los conteos absolutos sólo mostraron significación para el valor de p (OR 1.00 [1.00;1.01], p 0.001), lo que indica que a pesar de que no hay un efecto significativo, no son azarosos los cambios observados tras el tratamiento. (Tabla 4)

Por su parte, la activación de linfocitos T medida a través de la expresión del antígeno HLA-DR, y expresada en porcentaje, aumentó significativamente en la evaluación realizada a la 6ta semana tras el tratamiento (OR 1.61 [1.24;2.09], p 0.001), mostrando una relación medida a través del tamaño del efecto OR; pero no se observó su persistencia en el tiempo, ya que el efecto no fue significativo a los 6 meses. (Tabla 3). Mientras que los conteos absolutos mostraron significación a este mismo tiempo de evaluación, pero sólo para la variable continua (p<0,001). (Tabla 3)

Esta misma función evaluada a través de la expresión de CD25, mostró un efecto mantenido en el tiempo. El análisis de los valores de referencia porcentuales a las 6 semanas (OR 1.21 [1.06;1.39], p 0.002) y 6 meses (OR 1.29 [1.11;1.50], p 0.001) de realizado el tratamiento con BT, demuestra que además de la significación de la variable continua fue posible verificar una influencia directa del tratamiento con BT sobre dicha población, medida a través de OR. (Tabla 3). Por otra parte, cuando se procesaron los valores de referencia absolutos se observaron valores estadísticamente significativos para ambos tiempos de evaluación (6 semanas p<0,005 y 6 meses p<0,003), descartando la posibilidad de eventos ocurridos al azar en relación al tratamiento propuesto. (Tabla 4)

Además se estudió las poblaciones con coexpresión de CD3+CD4+CD8+ (dobles positivas) y los linfocitos T CD4-CD8- que expresan el TCR $\alpha\beta$ (linfocitos T doble negativos, DNT- TCR $\alpha\beta$). Para ninguna de estas dos poblaciones celulares se constataron diferencias estadísticamente significativas. (datos no mostrados)

Sin embargo, el análisis de la coexpresión CD4+CD8+ evidenció que al comienzo del tratamiento con BT 9 adultos mayores no mostraron valores

normales, de los cuales el 66 % recuperó su conteo a las 6 semanas de tratamiento. (datos no mostrados). Sólo 4 pacientes mostraron conteos no adecuados.

Por otro lado, 25 pacientes tenían valores normales de la población doble negativa de linfocitos T expresando TCR $\alpha\beta$ al comienzo del tratamiento con BT (83,3%) y el 16,7% restante (cinco pacientes) recuperaron sus valores normales tras 6 semanas del mismo. (datos no mostrados).

Los linfocitos B CD19+CD5+ y CD20+CD5+ estuvieron aumentados en 30 % y 6,7% ancianos, respectivamente antes del tratamiento con BT y disminuyeron al finalizar el mismo, sin diferencias significativas. En 21 (70 %) sujetos, los linfocitos B CD19+CD20+ disminuyeron al finalizar el tratamiento. Se encontró diferencia significativa al comparar los valores de los linfocitos B que coexpresaron los antígenos CD19+CD20+ antes y después del tratamiento con BT, $p = 0,02$ (figura 5).

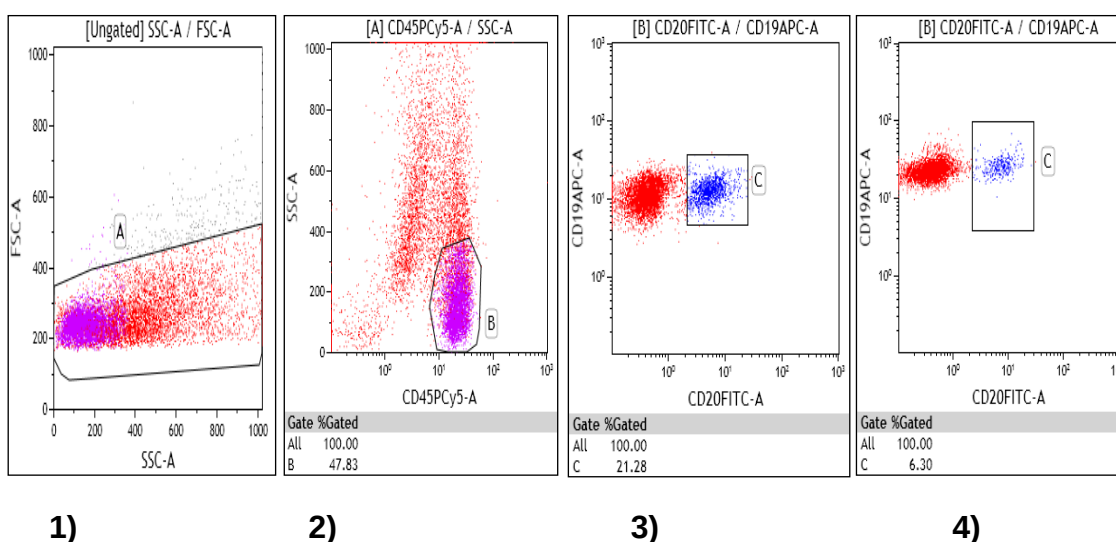


Figura 5. Secuencia de análisis por citometría de flujo de la subpoblación linfocitaria CD19+CD20+. 1) Diagrama de puntos de toda la población celular 1) Sin ventana (A), 2) Ventana de la población linfocitaria (B), 3) Linfocitos B CD19+CD20+ antes del tratamiento con Biomodulina T (C) y 4) Linfocitos B CD19+CD20+ al finalizar tratamiento con BT (C).

Discusión

En este estudio se demostró que la Biomodulina T® no modifica los diferentes parámetros del hemograma completo, herramienta importante para el seguimiento, la orientación y evaluación del estado hematológico en el adulto mayor. Los principales hallazgos encontrados en este estudio se pueden resumir para una mejor comprensión en inmunofenotipo T, B y en otras poblaciones de interés. En cuanto al fenotipo linfocítico T se confirma que ocurre un aumento significativo y dependiente del tratamiento con la BT en las células vírgenes y de memoria central, CD4+ y CD8+.

Se encontraron valores disminuidos de las poblaciones “vírgenes”, tanto para CD4+ como CD8+ en los ancianos estudiados, al comienzo del tratamiento con BT. La reducción de las células “vírgenes” se relaciona fisiológicamente con el envejecimiento, mientras que la composición de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ refleja la situación inmunológica individual. (22, 23) Así como la habilidad

para reconocer diversos antígenos es central para la competencia inmunológica, la reducción del repertorio linfocitario afecta la inmunodeficiencia y crea un desbalance en la homeostasis linfocitaria periférica, con el envejecimiento. Dichos cambios se acompañan de la progresiva involución del timo ⁽²⁴⁾; lo que sumado al reto antigénico y a las infecciones que ocurren durante la vida contribuye a la diferenciación de dichas células “vírgenes” en subtipos T más diferenciados. ⁽²²⁾ Mientras que la producción de nuevas células es dependiente del timo, el mantenimiento del repertorio es independiente del mismo. ⁽²⁴⁾

Aunque el envejecimiento del sistema inmune adaptativo a menudo se describe como un cambio de linfocitos “vírgenes” a memoria, este cambio es sólo relativo. La senectud por sí misma no conduce a una acumulación absoluta de células T y B de memoria. La supervivencia y expansión de las células T de memoria está favorecida por el incremento de las citocinas IL-7 e IL-15, y por la infección por citomegalovirus (CMV)^(9, 23, 25)

Farber y colaboradores ⁽²⁶⁾ dividieron el tiempo de vida humano en tres fases: generación de memoria (0-20 años), homeostasis de memoria (20- 65 años) e inmunosenescencia (> 65 años), basados en los cambios en la frecuencia de las células T de memoria, la susceptibilidad a patógenos y la mortalidad. Teniendo en cuenta esta clasificación, Li y colaboradores estudiaron los cambios en la evolución de las poblaciones T y la inmunosenescencia para la población china. Encontraron que había una acumulación de células de memoria para CD4+ y CD8+, con diferencias estadísticamente significativas para las efectoras o TEMRA CD8+ y para las de memoria efectoras CD4+ y CD8+. ⁽²²⁾

El inmunofenotipo del compartimiento B, aunque no muestran diferencias estadísticamente significativas al comparar el estado de pretratamiento y los tratamientos a las 6 semanas y 6 meses, mostró una tendencia a restaurar la homeostasis, que debe evaluarse con más detalle y utilizando otro diseño experimental. Sin embargo, se demostró un aumento significativo en los linfocitos B CD19+ no descrito anteriormente.

Al reducir el análisis de datos a los rangos de valores normales de referencia para cada subpoblación, el tamaño del efecto puede proporcionar información más útil. En el caso de la población linfocitaria B CD19+ se encontró que el tamaño del efecto del tratamiento con BT fue significativo tanto a las 6 semanas como 6 meses, pero sólo para los valores porcentuales. Es necesario resaltar que, aunque los conteos absolutos no evidenciaron similar efecto, según el valor p, este no debe ser atribuido a la casualidad.

Un reciente estudio que evaluó las subpoblaciones linfocitarias de adultos mayores cubanos bajo tratamiento con BT y la vacuna VA-MENGOC-BC® (solas y en combinación) encontró que sólo la BT indujo un aumento significativo estadísticamente de CD19+ observado a través del tamaño del efecto OR; sin embargo, de acuerdo a los valores p de estos resultados, el efecto pudo ser causado por el azar. ⁽²⁷⁾

El hecho de que la población linfocitaria CD19+ haya mostrado significación estadística bajo la influencia del tratamiento con BT, y no el resto de los compartimientos B estudiados, sugiere que el mecanismo por el cual se logra dicho efecto es independiente. Saavedra y colaboradores encontraron que el tratamiento con BT aumenta el número de células T CD4+ que producen IFN- γ e hipotetizaron que este tratamiento supone la recuperación del patrón Th1 en los ancianos. ⁽¹⁶⁾

El efecto del envejecimiento en el compartimiento de células B es un dramático descenso de los linfocitos B circulantes, el cual es parte de un grupo de parámetros inmunológicos colectivamente conocidos como “Fenotipo de Riesgo Inmune”. En individuos envejecidos ocurren modificaciones en las subpoblaciones “*vírgenes*”/memoria y en la producción de inmunoglobulinas, acompañado por la habilidad deficiente para producir anticuerpos protectores frente a antígenos nuevos, lo que se corresponde en el adulto mayor con un pobre estatus de salud. ^(7,8, 28,29)

Los cambios asociados a la edad en las células asesinas naturales (NK) han sido los más estudiados en la inmunidad innata y se considera que sus alteraciones funcionales pueden contribuir de manera determinante a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y neoplásicas en el envejecimiento. A pesar de que estas células aumentan en la inmunosenescencia, sufren un declive de su capacidad citotóxica tumoral y en la producción de citoquinas. ⁽³⁰⁾ La expansión de esta población tras el tratamiento con BT, con significación demostrada a través de sus valores p y OR, nos sugiere una restauración de sus funciones protectoras. Esto no pudo ser constatado en este trabajo, y deberá ser tema obligado para posteriores investigaciones.

Como parte de sus funciones inmunorreguladoras, la BT debe promover un ambiente regulatorio para el balance entre inflamación y tolerancia, de ahí que, aunque estimula la proliferación celular debe contribuir al control de la proliferación clonal. En este artículo se evaluó el efecto sobre la población T doble positiva CD4CD8 (DP). Las funciones de los linfocitos TDP aún no están completamente esclarecidas. En conjunto, parecen desempeñar un papel importante en los sitios periféricos como potentes inmunosupresores o con alto potencial citotóxico, también se relaciona con la linfoproliferación. ^(31, 32) Además, poseen un papel efector y de memoria, y reaccionan con antígenos específicos de una amplia variedad de patógenos, en particular contra infecciones virales autolimitadas y latentes, como el virus de Epstein Barr (EBV) y el CMV. ^(25,28) Las mismas se incrementan en individuos sanos particularmente, en personas ancianas, neoplasias y enfermedades autoinmunes. ^(28,33) La expansión de esta población celular ocurre en condiciones de inflamación inmune, específicamente en la inflamación relacionada con el envejecimiento. ^(31, 34)

Un reciente artículo publicado, evidenció que la mayor parte de los adultos mayores cubanos evaluados que exhibieron valores porcentuales y absolutos elevados de linfocitos TDP, tenían asociado alguna comorbilidad, entre ellas las infecciones y el cáncer. ⁽³⁵⁾ Esto apoya la idea sobre su papel como inmunosupresor o célula potencialmente citotóxica. Se requieren estudios más profundos de esta población para el esclarecimiento de los eventos que conducen a la inmunosenescencia y, especialmente, para interpretar su papel en ello. ⁽²⁵⁾

La expresión de marcadores que reflejen la función celular es importante para evaluar el grado de activación del compartimiento T; CD25 y HLA-DR han demostrado ser muy útiles en este sentido. En algunos casos pueden interpretarse como un factor no patogénico y en otros como consecuencia fisiológica o patológica de una enfermedad o condición. Por ejemplo, la expresión aumentada de HLA-DR se encuentra en pacientes con daño crónico en la médula espinal, posiblemente contribuyendo a la persistencia de la inflamación crónica o a la resistencia disminuida frente a infecciones. ⁽²⁹⁾

La alterada expansión clonal y la disminución en la producción de citocinas, especialmente IL-2, han mostrado estar afectadas en los eventos tempranos de señalización T y son las principales propiedades afectadas con el envejecimiento.⁽³⁶⁾

La mayoría de las infecciones virales inducen proliferación y activación de células T CD8+. En pacientes con COVID-19 evaluados recientemente se determinó que existe un fenotipo de activación T CD8+ expandido, confirmado por la coexpresión de HLA-DR y CD38, lo que conformó un inmunofenotipo clínico caracterizado por poblaciones de células T no vírgenes, activadas y en proliferación, en un subgrupo de individuos.⁽³⁷⁾

Siguiendo estas evidencias, alcanza mayor relevancia el hecho de que este estudio haya arrojado diferencias significativas en la activación linfocitaria, por cuanto pone al individuo en mejores condiciones de responder frente a la infección. Es conocido que hay un perfil común de desregulación en pacientes críticamente enfermos.⁽³⁷⁾

Por su parte, la disminución de la producción de IL-2 es un rasgo característico de la inmunosenescencia, con la consiguiente implicación en la activación y proliferación celular.^(6, 38, 39) El aumento muy significativo de estas subpoblaciones involucradas en la activación y proliferación T, encontrado en el presente trabajo, se interpreta como la consecuencia fisiológica de la modulación inmune inducida por la BT.

Los linfocitos B CD5+ presentan una mayor vida media que los CD5-. En este contexto, el antígeno CD5 aumenta la capacidad de recirculación de los linfocitos B CD19+CD20+ y modifica su potencial proliferativo. El antígeno CD5 regula negativamente la activación de los linfocitos B1, así como la muerte programada celular mediada por activación. Diferentes investigadores reportan que en el adulto mayor hay una disminución drástica en la diversidad del repertorio linfoide B, que se acompaña de expansiones celulares policlonales o monoclonales CD5- ó CD5+. ^(7,8) En esta investigación un grupo de ancianos presentó en sangre periférica porcentajes elevados de los linfocitos B CD19+CD20+CD5+ en estado basal, los cuales disminuyeron tras la administración de la BT. Estos resultados asociados a la alta incidencia de los síndrome linfoproliferativos B CD19+CD20+CD5+ en el adulto mayor y la existencia de un grupo de enfermos refractarios al tratamiento convencional o con frecuentes recaídas, ⁽⁴⁰⁾ sugiere el empleo de este inmunomodulador como terapia adyuvante de la quimioterapia en ensayos clínicos futuros³⁹.

Finalmente, a los linfocitos TDN se le adjudican roles proinflamatorio y regulatorio, lo que sugiere que se trata de un subtipo celular heterogéneo. Su importancia se ejemplifica en ciertas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES), Síndrome de Sjögren y síndrome linfoproliferativo autoinmune, donde esta población está expandida y se ha sugerido que juegan un rol protagónico. ⁽⁴²⁾

El hecho de que estas células se asocian con la autoinmunidad y se incrementan en condiciones donde hay fallos en los mecanismos de tolerancia y hay un aumento de células T autorreactivas, plantea la posibilidad de que esta población linfocitaria incluya células reactivas contra antígenos propios. ⁽⁴³⁾

Evidencias científicas sugieren el importante papel de la subpoblación T “virgen” en el origen y el mantenimiento de efector autorreactivos en la periferia. Se conoce incluso, que las células T de memoria detenidas del ciclo celular, son

capaces de responder ante epítopes reconocidos previamente por linfocitos vírgenes. ⁽⁴⁴⁾

De tal modo, es esperado que tras la administración del tratamiento con BT sean recuperados los valores de la población TDN en todos los pacientes, en gran medida debido a la recuperación cuantitativa del compartimiento “vírgen”. El hecho de que la mayoría de los ancianos mostraran valores normales de esta población linfocitaria (83,3%), alude a un estado de homeostasis relativa en medio del proceso de inmunosenescencia.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Para evaluaciones más profundas de los compartimientos celulares T y B se deberán incluir nuevos marcadores que nos permitan una mejor caracterización de las poblaciones linfocitarias. También se deberán ensayar nuevos esquemas terapéuticos, que en combinación con el ya ensayado, permitan obtener resultados aplicables a diferentes situaciones clínicas en el adulto mayor.

Conclusiones

Los resultados aquí presentados nos permiten afirmar que la BT tiene un efecto en la restauración inmunológica de las poblaciones linfocitarias T y B de los adultos mayores cubanos. Como principales contribuciones al alcance de la homeostasis en el envejecimiento se constató la expansión significativa de las células T vírgenes CD4+ y CD8+, los linfocitos B (CD19+), las células NK y las poblaciones de activación CD3+HLA-DR+ y CD3+CD25+, así como sobre las poblaciones de linfocitos B maduros CD19+CD20+CD5+, mientras que las tendencias observadas para las restantes poblaciones linfocitarias deberán ser evaluadas con un tamaño muestral mayor.

La BT modula la respuesta inmune y la inflamación, reestablece la inmunidad, y puede convertirse en una estrategia cubana para prevenir y tratar la COVID-19 en grupos vulnerables, así como sugiere constituir una terapia adyuvante a la quimioterapia en los síndromes linfoproliferativos crónicos de células B refractarios o en recaída, en el adulto mayor.

Bibliografía

1. Pawelec G. Immunosenescence: role of cytomegalovirus. *Experimental gerontology*. 2014 Jun;54:1-5.
2. Lang PO, Samaras D. Aging adults and seasonal influenza: does the vitamin d status (h)arm the body? *Journal of aging research*. 2012;2012:806198.
3. Lang PO, Mendes A, Socquet J, Assir N, Govind S, Aspinall R. Effectiveness of influenza vaccine in aging and older adults: comprehensive analysis of the evidence. *Clinical interventions in aging*. 2012;7:55-64.
4. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, Witkowski JM, Franceschi C. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or foes? *Front. Immunol*. 2017; 8:1960. doi: 10.3389/fimmu.2017.01960
5. Fulop T, Larbi A, Hirokawa K, Mocchegiani E, Lesourds B, Castle S, et al. Immunosupportive therapies in aging. *Clinical interventions in aging*. 2007;2(1):33-54.
6. Lang PO, Govind S, Aspinall R. Reversing T cell immunosenescence: why, who, and how. *Age*. 2013 Jun;35(3):609-20.
7. Tabibian-Keissar H, Hazanov L, Schiby G, Rosenthal N, Rakovsky A, Michaeli M, LavyShahaf G et. al. Aging affects B-cell antigen receptor

- repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues. *Eur. J. Immunol.* 2016; 46: 480–492 DOI: 10.1002/eji.201545586
8. Gibson KL, Chang Wu Y, Barnett Y, Duggan O, Vaughan R, Kondeatis E, Nilsson BO et. al. B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status *Aging Cell.* 2009; 8:18–25 DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x
 9. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat. Immunol.* 2018;19:10-19 Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x>
 10. Devesa, E; Garcia, R; Rodriguez, R; et al. La Biomodulina T como inmunomodulador en geriatría. Ensayo clínico controlado, fase II; CENCEC 1994.
 11. Centro para el control estatal de medicamentos, e. y. d. m. C. Biomodulina t®. RESUMEN de Las CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO. 2015
 12. Christian López LdlC, Rodríguez Marín RR, Rabassa Pérez J, Santamaría Lafargue M, Romero del Sol JM, González Ross E. Efecto de la Biomodulina T 1000 sobre el timo en niños con infecciones recurrentes. *Rev Cubana Pediatr.* 2000; 72(1):3-9
 13. García Orihuela M, Capdevila V, Suárez Martínez R, Rodríguez Rivera L, Castro González I. Efecto de la Biomodulina T sobre las infecciones respiratorias altas y la polifarmacia del anciano. *Rev. Habanera de Cienc. Medicas.* 2014;13(3):425-36
 14. Devesa E, García R, Rodríguez R. la Biomodulina T como inmunomodulador en Geriatría. Ensayo clínico controlado, Fase II, la Habana:1994
 15. Jauma AJ, Macías C, Padilla M, González C. Uso de Biomodulina T en el Síndrome DiGeorge. Presentación de un caso. *VacciMonitor.* 2011; 20 (Supplement 1)
 16. Saavedra D, Fuertes SA, Suárez GM, Conzález A, Lorenzo-Luaces P, García B, Aznar E et. al. Biomodulina T partially restores immunosenescent CD4 y CD8 T cell compartments in the elderly. *Experimental Gerontology.* 2019. 124. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110633>
 17. Rodríguez Martín RR, González González O, Rodríguez González RR. Biomodulina T (InmuneVital®) restores T cells and helps contain COVID-19. *Front. Immunol.* 2020. 11:606447. doi: 10.3389/fimmu.2020.606447
 18. Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos. 2020. Disponible en: <http://www.rpcec.sld.cu>
 19. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). 31 January 2020 [citado: 28/02/2020]. Disponible en: [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov))
 20. Subirana, I., Sanz. H., Vila, J. CompareGroups 4.0: Descriptives by Groups. Disponible en: https://cran.r-project.org/web/packages/compareGroups/vignettes/compareGroups_vignette.html.
 21. Warnatz K, Schlesier M. Flow cytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B.* 2008; 74B: 261-271
 22. Li M, Yao D, Zeng X, Kasakovski D, Zhang Y, Chen S, Zha X et al. Age related human T cell subset evolution and senescence.

- Immunity&Ageing. 2019; 16:24. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0165-8>
23. Soares Alves A, Bueno V. Immunosenescence: participation of T lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells in aging-related immune response changes. *einstein (São Paulo)*. 2019; 17(2):1-5 DOI: 10.31744/einstein_journal/2019RB4733
 24. Bektas A, Schurman SH, Sen R, Ferrucci L. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *J. Leukoc Biol*, 2017;102. DOI:10.1189/jlb.3RI0716-335R
 25. Ghia P, Prato G, Stella S, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4+CD8+ double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br. J. Haematol*. 2007; 139:780-90. DOI:10.1111/j.1365-2141.2007.06867
 26. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(1):24-35
 27. Hernández Ramos E, Marsán Suárez V, Casado Hernández I, Puga Gómez R, García Rivera D, Reyes Zamora MC, Chang Monteagudo A et al. Effect of Biomodulina-T® and VA-MENGOC-BC® on lymphocyte subpopulations in older adults. *Experimental Gerontology*. 2021; 153: 111497. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111497>
 28. Tabibian-Keissar H, Hazanov L, Schiby G, Rosenthal N, Rakovsky A, Michaeli M, Lavy Shahaf G et al. Aging affects B-cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues. *Eur. J. Immunol*. 2016; 46: 480–492 DOI: 10.1002/eji.201545586
 29. Bulatti M, Caruso C, Colonma-Romano G. From lymphopoiesis to plasma cell differentiation, the age-related modifications of B cell compartment are influenced by “Inflamm-Ageing”. *Ageing Res. Rev*. 2017; 36:125-36. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2017.04.001> S1568-1637(17)30037-5
 30. Arranz Salas L. Mecanismos de inmunosenescencia y longevidad: posibles estrategias para mejorar la calidad de vida en el envejecimiento. [Doctoral] Universidad Complutense de Madrid; 2015
 31. Villegas Valverde C, Kokuina E, Breff Fonseca M. Estimating normal values of rare T-lymphocyte populations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Review*. 2018; 20(4)
 32. Overgaard NH, Won Jung, Steptoe JR, Wells WJ. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Journal of Leukocyte Biology* 2015; (97): 31-38. DOI: 10.1189/jlb.1RU0814-382
 33. Eljaafari A, Yuruker O, Ferrand C, Farre A, Addey C, Tartelin M-L, et al. Isolation of human CD4/CD8 double-positive, graft-versus-host disease-protective, murine histocompatibility antigen-specific regulatory T cells and of a novel HLA-DR7- restricted HY-CD4 clone. *J Immunol* 2013; 190(1):184-94.
 34. Parel Y, Chizzolini C. CD4+CD8+ double positive (DP) in health and disease. *Autoimmun. Rev*. 3. 2004; 3(3):215-20. Disponible en: www.elsevier.com/locate/autrev
 35. Triana Marrero Y, Marsán Suárez V, Macías Abraham CM, Casado Hernández I, Hernández Ramos E, Díaz Domínguez G, Duarte Pérez Y

- et al. Immunophenotypic characterization of double positive T lymphocytes in Cuban older adults. *Experimental Gerontology*. 2021; 152: 111450. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111450>
36. Le Page A, Dupuis G, Larbi A, Witkowski JM, Fülöp T. Signal transduction changes in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations with aging. *Experimental Gerontology*. 2018; 105:128-39. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.01.005>
 37. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C et al. Deep immunoprofiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 2020; 10.1126/science.abc8511
 38. Villarrubia VG, Navarro SR. Inmunopatogenia del envejecimiento: el deterioro de la inmunidad innata y su repercusión sobre la inmunidad específica. Restauración por AM3. *RevEspGeriatrGerontol*. 2000; 35(1): 30-42
 39. Saavedra Hernández D, García Verdecia B. Immunosenescence: effects of aging process on immune system. *RevCubHemInmunolHemoter*. 2014; 30(4):332-345
 40. Darwiche W, Gubler B, Marolleau J-P and Ghamlouch H. Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues From a Functional Perspective. *Front Immunol* 2018; 9:683. doi: 10.3389/fimu.2018.00683
 41. Marsán V, Casado I, Hernández E, Díaz G, Triana Y, Duarte Y, et al. Immunophenotypic characterization of B1a lymphocytes in Cuban older adults. *Experimental Gerontology* 167 (2022) 111900
 42. Rodríguez Rodríguez N, Apostolidis SA, PenazolaMacMaster P, Martín Villa JM, Barouch DH, Tsokos GC, Crispín JC. Programmed Cell Death 1 and Helios distinguish TCR $\alpha\beta$ ⁺ double negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells. *J Immunol*. 2015; 194(9): 4207-14
 43. Rodríguez Rodríguez N. Origen y caracterización de los linfocitos TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8- doble negativos en relación a su posible naturaleza autorreactiva. [Doctoral] Universidad Complutense de Madrid; 2018
 44. Casado Hernández I, Marsán Suárez I, Díaz Domínguez G, Macías Abraham C. Utilidad diagnóstica de la evaluación de linfocitos T CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ + en el Síndrome linfoproliferativo autoinmune. *RevCubHemInmun*. 2017
 45. Arango Prado MdC, Villegas Valverde CA, Soto Pardeiro P, Torres López G, Morales AM, Faxas García ME, 2020. Caracterización de los inmunofenotipos linfocitarios de sangre periférica en pacientes con cáncer. *Rev. Cub. Hem. Inmunol. Hemoter*. 36(2): 16-21
 46. Kokuina E, Breff-Fonseca MC, Villegas Valverde CA, Mora Díaz I, 2019. Normal values of T, B and NK lymphocyte subpopulations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Rev*. 21(2-3): 16-21. <https://doi.org/10.37757/MR2019>
 47. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, Sanders EAM et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clinical Immunology* (2009) 133: 95-107.