

Linfocitos B1a en adultos mayores cubanos

Vianed Marsán Suárez¹

Imilla Casado Hernández¹

Elizabeth Hernández Ramos¹

Yenisey Triana Marrero¹

Yaneisy Duarte Pérez¹

Consuelo Macías Abraham¹

¹Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

Email: vianedmarsansuarez68@gmail.com

RESUMEN

Introducción: Los linfocitos B1a se caracterizan por tener una alta capacidad de autorrenovación y producción de anticuerpos naturales, de una manera T independiente. Existen diferencias tanto en el número como en la composición de los linfocitos B maduros a lo largo de la vida, debido al fenómeno de inmunosenescencia.

Objetivo: Caracterizar el inmunofenotipo de los linfocitos B1a en adultos mayores.

Métodos: Se realizó un estudio transversal en 30 adultos mayores cubanos institucionalizados. La caracterización de los linfocitos B CD19+CD5+, CD20+CD5+ y CD19+CD20+ de sangre periférica se realizó por citometría de flujo. Para la lectura y análisis de las muestras biológicas se empleó un citómetro de flujo, Beckman Coulter, Gallios. A Microsoft Excel database was created with the information obtained. The sample was divided by sex and age. The data were processed using the statistical program GraphPadPrism version 6.00 using the percentage values and the median for the sample description.

Resultados: Los ancianos con 80 años y más, mostraron una disminución en el conteo absoluto de los linfocitos B CD19+CD20+, así como en el porcentaje y el conteo absoluto de los linfocitos B CD19+CD5+. Por su parte, presentaron mayores conteos absolutos de los linfocitos CD20+CD5+ en relación con los del grupo de < 80 años. Las mujeres mostraron mayores conteos absolutos de las poblaciones de linfocitos B CD19+CD5+, CD20+CD5+ y CD19+CD20+.

Conclusiones: La caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo de los linfocitos B1a en el anciano, permite identificar linfoproliferaciones autorreactivas e implementar intervenciones sanitarias específicas y oportunas.

Palabras clave: linfocitos B1a, citometría de flujo, adultos mayores, inmunosenescencia.

Linfocitos B1a en adultos mayores cubanos

Vianed Marsán Suárez¹

Imilla Casado Hernández¹

Elizabeth Hernández Ramos¹

Yenisey Triana Marrero¹

Yaneisy Duarte Pérez¹

Consuelo Macías Abraham¹

¹Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

Email: vianedmarsansuarez68@gmail.com

INTRODUCCION

Los linfocitos B1 fueron descritos por primera vez en el ratón por Lee Herzenberg. Se diferencian de los B2 o convencionales por su localización anatómica, capacidad de autorrenovación y producción de anticuerpos naturales. Tanto los linfocitos B1 como los B2, se originan a partir de un mismo progenitor Lin-CD34+CD38^{lo}. [1-3]

Los linfocitos B1 se ubican fundamentalmente, en las cavidades peritoneal y pleural y exhiben una morfología de células activadas, por su mayor tamaño y complejidad citoplasmática. Se subdividen en B1a (CD5+), generados durante la vida fetal y B1b (CD5-) que también, pueden originarse a partir de los precursores de la médula ósea del adulto. Dentro de estos, los B1a producen los anticuerpos naturales, de una manera T independiente. [1]

Un nuevo fenotipo de los linfocitos B1 en el humano fue reportado por Griffin y colaboradores, en células procedentes de la sangre de cordón umbilical y periférica adulta. Este consistió en la coexpresión de los antígenos CD20+CD27+CD43+ y la no expresión de CD70. El 75% de las mismas expresaron además, el antígeno CD5+. El 25% de las células B CD5+ se correspondió con células pre-naive, transicionales y células B activadas. [4]

Existen diferencias en el número y la composición de los linfocitos B maduros a lo largo de la vida, siendo menor en el adulto mayor, debido al fenómeno de inmunosenescencia. La población celular B CD20+CD27+CD43+CD70- declina también con la edad, en individuos aparentemente sanos. [4-7].

Cuba exhibe una de las poblaciones más envejecidas de América Latina, con una expectativa de vida de alrededor de 78 años. [8] El envejecimiento conlleva a una mayor frecuencia de enfermedades infecciosas y crónicas no transmisibles, tales como las autoinmunes y el cáncer. [5]

El objetivo de esta investigación fue caracterizar el inmunofenotipo de los linfocitos B1a en adultos mayores cubanos, con un panel simplificado de anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD5.

METODOS

Esta investigación resultó 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, fue el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) y 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. La muestra estuvo constituida por 30 adultos mayores, con edades comprendidas entre 60 y 99 años, procedentes del Hogar de Ancianos “Alfredo Gómez Gendra”, de La Habana, antes de la administración de la Biomodulina T (BT).

Fueron incluidos ancianos con edad de 60 años y más, de cualquier sexo y color de la piel, que expresaron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

Fueron excluidos aquellos que hubieran recibido BT en los dos últimos meses, con hipersensibilidad 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 tratamiento inmunosupresor.

La determinación de las subpoblaciones de linfocitos B1a (CD19+ CD5+, CD20+CD5+ y CD19+CD20+) se realizó por citometría de flujo, en el departamento de Inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

La lectura de las muestras se realizó en un citómetro de flujo Gallios, Beckman Coulter. Fueron adquiridas 100 000 células por tubo. El análisis de los datos se efectuó con el software Kaluza Analysis® versión 1.2.

Las diferentes poblaciones de linfocitos B1a fueron evaluadas y comparadas con el valor de referencia previamente establecido $\leq 12\%$ para los linfocitos B CD19+CD5+ y CD20+CD5+, respectivamente y de 5-15 % para los que coexpresaron CD19+CD20+.

[9] 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) uniformes, y que el citómetro registra como un evento, descartando los agregados celulares (dos o más células). (Fig1A). Posteriormente, se analizó el gráfico de puntos SSC-A vs CD45PerCP-A, para separar la población de linfocitos sobre los singletes seleccionados previamente (Fig 1B). De la población de linfocitos CD45+ se realizaron otros tres gráficos de puntos: Fig 1C CD19APC-A/CD5PE-A, Fig1D CD20FITC-A/CD5PE-A y Fig1E CD19APC-A/CD20FITC-A.

RESULTADOS

La distribución de las diferentes poblaciones de linfocitos B1a en adultos mayores mostró que en el grupo de ≥ 80 años de edad, las medianas de los porcentajes y conteos absolutos de los linfocitos B CD19+CD5+ fueron menores, en relación con los encontrados en el grupo de < 80 años (2.320 vs 7.280, SD 5.647 vs 8.941 y de 40.83 vs 83.38, SD 108.4 vs 238.5, respectivamente).

Por su parte, los porcentajes de los linfocitos B CD20+CD5+ no mostraron diferencias en ambos grupos de edades (1.730 vs 0,820, SD 5.066 vs 6.809) mientras que el conteo absoluto de estos, fue mayor en los ≥ 80 años (33.91 vs 16.40, SD 75.46 vs 85.60).

Los linfocitos B que coexpresaron los antígenos CD19+CD20+ exhibieron porcentajes similares en ambos grupos etarios (4,440 vs 5,290, SD 4,339 vs 5.005) y menores conteos absolutos en los ≥ 80 años (68.90 vs 105.2, SD 68.70 vs 57.82) (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los linfocitos B1a en ancianos, según grupo de edades

Lymphocyte values (Range)	<80years (n=17)			≥80years (n=13)		
	Median	SD	CI	Median	SD	CI
CD19+CD5+ (≤12%)	7.280	8.941	4.514-13.71	2.320	5.647	2.195-9.020
CD19+CD5+ (cells / μL)	83.38	238.5	45.43-290.7	40.83	108.4	31.13-162.1
CD20+CD5+ (≤12%)	0.820	6.809	0.1257-7.127	1.730	5.066	0.4671-6.590
CD20+CD5+ (cells/μL)	16.40	85.60	1.628-89.65	33.91	75.46	7.892-99.09
CD19+CD20+ (5-15%)	5.290	5.005	4.011-9.158	4.440	4.339	2.707-7.951
CD19+CD20+ (cells/μL)	105.2	57.89	71.08-130.6	68.90	68.70	44.03-127.1

La distribución de las subpoblaciones linfocitarias B1a, según el sexo exhibió porcentajes equivalentes de los linfocitos CD19+CD5+ en ambos grupos (5.560 vs 5.400, SD 8.247 vs 6.982), mientras que el conteo absoluto de estos, fue mucho mayor en las mujeres (79.51 vs 48.32, SD 216.1 vs 135.6).

El porcentaje de los linfocitos CD20+CD5+ no mostró diferencias según el sexo (1.450 vs 0.820; SD 6.390 vs 5.393); sin embargo, el conteo absoluto de los mismos, fue superior en las mujeres (18.42 vs 13.92, SD 90.14 vs 52.09).

Los porcentajes de los linfocitos B CD19+CD20+ fueron semejantes en ambos sexos (4.440 vs 5.450, SD 4.361 vs 5.650) pero, el conteo absoluto de estos fue mayor en el sexo femenino en relación con el masculino (89.93 vs 79.03, SD 65.09 vs 57.98) (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de los linfocitos B1a en ancianos, según sexo

Lymphocyte values (Range)	Male (n=9)			Female (n=21)		
	Median	SD	CI	Median	SD	CI
CD19+CD5+ (≤12%)	5.400	6.982	1.866-12.60	5.560	8.247	3.993-11.50
CD19+CD5+ (cells / μL)	48.32	135.6	8.165-216.6	79.51	216.1	49.35-246.0
CD20+CD5+ (≤12%)	0.8200	5.393	-0.776-7.516	1.450	6.390	0.7672-6.584
CD20+CD5+ (cells/μL)	13.92	52.09	-2.93-77.14	18.42	90.14	13.13-95.19
CD19+CD20+ (5-15%)	5.450	5.650	2.148-10.83	4.440	4.361	3.863-7.833
CD19+CD20+ (cells/μL)	79.03	57.98	44.45-133.6	89.93	65.09	66.81-126.1

DISCUSION

El envejecimiento es un proceso complejo caracterizado por la depresión general de las funciones fisiológicas del ser humano, con aumento en la morbilidad y mortalidad. Los cambios relacionados con la edad afectan tanto la estructura como la función del sistema inmune. Esta declinación se define como “*inmunosenescencia*”, la cual se caracteriza clínicamente por un incremento en la susceptibilidad a las infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer, pobre respuesta a nuevos patógenos y reducción en la eficacia a las vacunas. [11]

Diferentes investigadores [12-14] han encontrado cambios en la composición de los linfocitos B relacionados con una mayor edad del individuo, que pueden reflejar la historia personal de la exposición a los diferentes patógenos a lo largo de la vida.

En este estudio, los ancianos con 80 años y más, mostraron una disminución en el conteo absoluto de los linfocitos B CD19+CD20+, tanto en el porcentaje como el conteo absoluto de los linfocitos B CD19+CD5+, así como mayores conteos absolutos de los linfocitos CD20+CD5+, en relación con los del grupo de < 80 años.

El efecto del envejecimiento en el compartimiento de células B se caracteriza por un dramático descenso de los linfocitos B maduros circulantes, el cual es parte de un grupo de parámetros inmunológicos colectivamente conocidos como “*Fenotipo de Riesgo Inmune*”. Los ancianos más longevos son más susceptibles a sufrir de infecciones recurrentes, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y neoplásicas de células B maduras, tales como: linfomas de linfocitos pequeños, difuso de células grandes y del manto. [14-17]

Piasecka y colaboradores [18] encontraron en individuos sanos, que la respuesta inmune frente a los microorganismos varía de acuerdo con el sexo. Por su parte, Fink y su grupo de trabajo [19] reportaron que la producción de anticuerpos en respuesta a determinados antígenos vacunales varió en dependencia del sexo de los individuos.

En general en los adultos, las mujeres muestran una respuesta inmune más potente en relación a los hombres. Sin embargo, esta diferencia se hace menos evidente a medida que avanza la edad. [20]

En esta investigación, las mujeres mostraron mayores conteos absolutos de las poblaciones de linfocitos B CD19+CD5+, CD20+CD5+ y CD19+CD20+. Este aumento fue superior en mujeres menores de 80 años, lo que indica que el número de células B se ve afectado tanto en hombres como en mujeres a mayor edad.

La declinación de las poblaciones de linfocitos B maduras con la edad ocurre de una manera más drástica en hombres que en mujeres, las que exhiben células B con una mayor accesibilidad de la cromatina mientras que los hombres, presentan una regulación negativa de los genes que codifican para las proteínas relacionadas con la ontogenia linfocítica B. Los hombres generalmente, sufren de una mayor frecuencia de infecciones en relación con las mujeres, a medida que avanza la edad.

[21]

En relación con los conteos absolutos de linfocitos B CD19+CD5+ y CD20+CD5+ también, fueron mayores en las mujeres, pero en este caso, sin tener relación con la edad de las mismas. En las mujeres menores de 80 años son más frecuentes las enfermedades autoinmunes y linfoproliferativas crónicas de células B maduras, como la leucemia linfocítica crónica. El aumento encontrado de la población CD20+CD5+ en mayores de 80 años (Tabla 1) pudiera estar determinado mayormente por los hombres, quienes sufren en este periodo de la vida de enfermedades linfoproliferativas CD20+.

Los linfocitos B1a CD19+CD5+ autorreactivos están involucrados en la etiopatogenia de ambas enfermedades. Se ha demostrado una relación directa entre el porcentaje y conteo absoluto de estas células con una mayor actividad de la enfermedad, así como con un pronóstico más reservado de las mismas [22,23].

Nuevos hallazgos en relación con la función de los linfocitos B1a en el ratón fueron mostrados por Krek y colaboradores. Estos autores revelaron que CD5 le ofrece una gran plasticidad a esta población linfocitaria. Los linfocitos B1a promueven la homeostasis tisular y la protección contra infecciones. Frecuentemente, los anticuerpos producidos por estos, reaccionan a los antígenos propios, tales como fosfatidilcolina presente en las membranas plasmáticas de las células eucariotas. El reconocimiento antigénico se lleva a cabo a través del BCR y de los Toll-like receptors. Fueron reconocidas también, otras

especificidades antigénicas, que incluyeron ácidos nucleicos, lipopolisacáridos y carbohidratos. Estos hallazgos pudieran extrapolarse al humano [24].

CONCLUSIONES

La caracterización inmunofenotípica de los linfocitos B1a en adultos mayores cubanos, es similar a la reportada por otros investigadores. Tanto la edad como el sexo influyen en el conteo absoluto de estas células, siendo mayor en mujeres menores de 80 años.

REFERENCIAS

1. Meriño, M., Gruppi, A., 2006. Origen y desarrollo de linfocitos B1. Una población celular involucrada en defensa y autoinmunidad. *Medicina*. 66k, 165-72.
2. Manukyan, G., Papajik, T., Mikulkova, Z., Urbanova, R., Smotkova, V., Savara, J., et al, 2020. High CXCR3 on Leukemic Cells Distinguishes IgHV^{mut} from IgHVun^{mut} in Chronic Lymphocytic Leukemia: Evidence from CD5high and CD5low Clones. *Journal of Immunology Research*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/7084268>
3. Quách, TD., Hopkins TJ., Holodick NE., Vuyyuru R., Manser T., Bayer RL., et al, 2016. Human B-1 and B-2 B Cells Develop from Lin⁻CD34⁺CD38^{lo} Stem Cells. *J Immunol*. 197 (10): 3950-8. doi: 10.4049/jimmunol.1600630.
4. Griffi, DO., Holodick NE., Rothstein TL, 2011. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻. *J Exp Med*. 208 (1): 67-80. doi: 10.1084/jem.20101499
5. Bischof, J., Gartneer, F., Zeiser, K., Kunz, R., Schreiner, C., Hoffer, E., et al, 2019. Immune Cells and Immunosenescence. *Folia Biologica* 65, 53-63.
6. Cepeda, S., Cantu, C., Orozco, S., Xiao, Y., Brown, Z., Semwal, M., et al, 2018. Age-associated decline in thymic B cell expression of Aire and Aire-dependent self-antigens. *Cell Rep* 22, 1276-87.
7. Nikolich-Zugich, J., 2018. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat Immunol* 19, 10-9.
8. Acosta, L.F., 2017. Mejoran los indicadores de salud y crece la esperanza de vida. In: Granma ndp, revisado en: <http://www.granma.cu/todo-salud/2017-12-29/mejoran-los-indicadores-de-salud-y-crece-laesperanza-de-vida-29-12-2017-00-12-01>, editor. La Habana: Granma.
9. Kokuina, E., Breff, C., Villegas, C.A., Mora-Díaz, I., 2019. Normal values of T, B and NK lymphocytes subpopulations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Review* 21(2-3), 16-21.
10. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 64^a Asamblea General. [Internet]. Fortaleza, Brasil; 2013. [citado 19 sep-dic 2019]. Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>
11. Avery, P., Barzilai, N., Benetos, A., Biliannou, H., Capri, M., Caruso, C., et al, 2014. Ageing, longevity, exceptional longevity and related genetic and non genetic markers: panel statement. *Curr Vasc Pharmacol* 12(5), 659-61.
12. Tabibian-Keissar, H., Hazanov, L., Schiby, G., Rosenthal, N., Rakovsky A., Michaeli, M., 2016. Aging affects B-cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues. *Eur. J. Immunol.*;46:480-92. DOI: 10.1002/eji.201545586

13. Gibson, KL., Chang, WY., Barnett, Y., Duggan, O., Vaughan, R., Kondeatis, E., Nilsson, BO., et. al., 2009. B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status *Aging Cell.*; 8:18–25 DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x
14. Bulatti, M., Caruso, C., Colonma-Romano, G., 2017. Fromlymphopoiesis to plasma cells differentiation, the age-related modifications of B cell compartment are influenced by “Inflamm-Ageing”. *Ageing Res. Rev.*; 36:125-36. Diponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2017.04.001> S1568-1637(17)30037-5
15. Garcíam B., Saavedra, D., Lorenzo, P., Badía, T., Leonard, I., Mazorra, Z., et al, 2013. Immunosenescence and gender: a study in healthy Cubans. *Immunity & Ageing*, 10:16 <http://www.immunityageing.com/content/10/1/16>
16. Sarmiento, M., Gabiño, N., 2012. Entendiendo el inmunofenotipo de las neoplasias de células B maduras. *Rev Invest Med Sur Mex*;19(4):212-21.
17. Leng, S., Margolick, J, 2020. Aging, sex, inflammation, frailty, and CMV and HIV Infections. *Cell Immunol*;348:104024. doi:10.1016/j.cellimm.2019.104024.
18. Piasecka, B., Duffy, D., Urrutia, A., Quach, H., Patin, E., Posseme, C, et al, 2018. Distinctive roles of age, sex, and genetics in shaping transcriptional variation of human immune responses to microbial challenges. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116;115(3):E488–E497. [PubMed: 29282317]
19. Fink, AL., Englem K., Ursin, RL., Tang, WY., Klein SL, 2018. Biological sex affects vaccine efficacy and protection against influenza in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 124;115(49):12477–12482.
20. Taneja, V, 2018. Sex hormones determine immune response. *Front. Immunol*;9: 1931.
21. Ligotti, ME., Pojero, F., Accardi, G, Aiello A, Caruso C, Duro G, et al, 2020. Immunopathology and Immunosenescence, the Immunological Key Words of Severe COVID-19. Is There a Role for Stem Cell Transplantation? *Front Cell Dev Biol*;9:725606. doi: 10.3389/fcell.2021.725606
22. Hassan, A., Abdul, A., Albeltagy, E., Amin, D., Elnaser, A, 2019. Frequency of CD19+ CD5+ B lymphocytes among Egyptian Patients with Rheumatoid Arthritis and Their Correlation with Disease Activity and Bone Resorption. *Clinical Medicine and Diagnostics* 2019;9(4):79-88. DOI: 10.5923/j.cmd.20190904.04
23. Manukyan, G., Papajik, T., Mikulkova, Z., Urbanova, R., Smotkov, V., Savara, J, et al, 2020. High CXCR3 on Leukemic Cells Distiguishes IgHVmut from IgHVunmut in Chronic Lymphocytic Leukemia: Evidence from CD5high and CD5low Clones. *Journal of Immunology Research*: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/7084268>
24. Kreuk, L., Koch, M., Slayden, L., Lind, N., Chu1, S., Savage, H., 2019. B cell receptor and Toll-like receptor signaling coordinate to control distinct B-1 responses to both self and the microbiota. *Immunology and Inflammation eLife* 2019;8:e47015. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47015>