



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

DEPARTAMENT DE GENÈTICA

Genètica Molecular i Evolutiva (194 B)

TESIS DOCTORAL

Apoptosis linfocitaria según receptor

TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ en sujetos sanos

Memoria presentada por

D. Carlos García Ballesteros

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Directores:

Dr. D. Juan Carlos Andreu Ballester

Profesor Dr. D. José Enrique O'Connor Blasco

Valencia, 2015

Dr. Juan Carlos Andreu Ballester,

Jefe de la Unidad de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia,

Y

Profesor Dr. José Enrique O'Connor Blasco,

Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, "Apoptosis linfocitaria según receptor TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ en sujetos sanos" ha sido realizada bajo su dirección, por Carlos García Ballesteros, y que constituye su tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que quede constancia y tenga los efectos que corresponda, firma el presente certificado en Valencia, a 28 de octubre de 2015.

Firmado:

Dr. Juan Carlos Andreu Ballester

Dr. José Enrique O'Connor Blasco

A Elena

A mis hijos Carlos, Pau y Laia

A mi Madre y a la memoria de mi Padre

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de un modo u otro, han hecho posible la realización de esta tesis:

A José Mayans, Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia, muchas gracias por los 11 años que hemos trabajado juntos, y porque gracias a ti he aprendido todo lo necesario para llevar a cabo este trabajo.

A Juan Carlos Andreu, director de Tesis, gracias por tu perseverancia diaria y tus lúcidas ideas que han sido la base de este trabajo. Sin desfallecer, has conseguido que día a día, dediquemos tiempo para la investigación. Tú, mejor que nadie, sabes lo que nos ha costado.

A Enrique O'Connor, codirector de Tesis, muchísimas gracias por todo el tiempo y el trabajo que le has dedicado a dirigir mi trabajo. Sin ti, el resultado final no habría sido el adecuado.

A Victoria Amigo, que, aunque nunca entendiste que hacía allí un biólogo, me "arrastraste" a un camino que empezaste junto a Juan Carlos y terminó convertido en la presente Tesis. Muchas gracias por tu amistad (de las que no se tienen por interés), por todo lo que me has enseñado (ciencia y vida), por tus consejos cuando había que darlos, por apoyarme cuando había que hacerlo y por hacer más divertido cada día en nuestro "Beniferrí Cancer Center".

A todo el personal del Servicio de Hematología del Hospital y, en especial, a Adriana, Ana, Pedro, Álvaro, Maribel, Yolanda, M^ª José y Miguel. Habéis ayudado siempre que lo he necesitado, llegando a dar incluso hasta vuestra sangre. Una mención especial se merece mi compañero de fatigas en el laboratorio Alejandro. Once años compartiendo espacio. Siempre has estado cuando te he necesitado. Espero seguir disfrutando de tu amistad muchos años. Muchas gracias a todos.

A Marta Parra, porque con tu profesionalidad y amistad has logrado que poco a poco el trabajo de laboratorio tomara forma, implicándote más allá de lo esperado.

Por último, un cariñoso agradecimiento a toda mi familia, en especial a mi mujer Elena, inductora y cómplice de esta Tesis. Sin tu apoyo y esfuerzo no habría podido nacer este trabajo y por supuesto, no habría podido acabarse. Muchas gracias por apoyarme en los momentos de desánimo, cuando no entendía el sentido de este trabajo. Muchas gracias por regalarme tu amor cada día, incondicional, y por creer que juntos alcanzaremos todo lo que nos proponíamos (y así es).

A mis hijos, que han tenido que quedarse sin padre durante horas. Carlos, espero que cuando seas mayor lo entiendas.

A mi Madre, que siempre me has apoyado en todos mis proyectos, dándome ánimo, fuerza y buenos consejos. Por último, a mi Padre. Sé que te habrías sentido muy orgulloso de este trabajo. Siempre has querido que

me esforzara en la vida para lograr todos mis objetivos. Espero que allá donde estés puedas sentir mi cariño. Te echo de menos.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ABREVIATURAS

ADC: convertidor analógico digital

ADN: ácido desoxirribonucleico

APC: célula presentadora de antígeno

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

BAK: del inglés “Bcl-2 homologous antagonist/Killer”

BCL-2: del inglés “B-cell Leukemia-Lymphoma 2”

BCR: receptor de la célula B

BH: dominio de homología

CD: “cluster” de diferenciación

CMF: citometría de Flujo

COL: colaboradores

CXC: quimiocina

CXCR5: receptor 5 de la quimiocina

DD: dominio de muerte

DED: dominio efector de muerte

DN: doble negativo

FADD: Proteína con dominio de muerte asociada a FAS

FC: fluorocromo

FS: dispersión frontal

IL: interleucina

IGF: factor de crecimiento insulina-*like*

IGH: inmunoglobulina pesada

IMC: inmunidad antígeno-específica mediada por célula

IP: yoduro de propidio

KGF: factor de crecimiento de los queratinocitos

LIE: linfocitos intraepiteliales

LT: linfocito T

LTc: linfocitos T citotóxicos

LTh: linfocitos T colaboradores

MCIA: muerte celular inducida por activación

MCL-1: gen de la leucemia mieloide-1

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

PMT: fotomultiplicadores

PS: fosfatidil serina

SS: dispersión lateral

TCR: receptor de célula T

TGF: factor de crecimiento tumoral

TNFR: receptor del factor de crecimiento de necrosis tumoral

ORF: pauta abierta de lectura

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El linfocito T	3
1.1.1 Organización genética de los TCR	4
1.1.2 Origen de los $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$	7
1.1.3 Distribución anatómica	9
1.1.4 El Linfocito $T\alpha\beta$	10
1.2 La inmunosenescencia	16
1.3 La apoptosis	21
1.3.1 Regulación de la Apoptosis	23
1.3.2 Las caspasas.....	25
1.3.3 Genes de la familia Bcl-2.....	26
1.4 La citometría de flujo	29
1.4.1 Componentes de un Citómetro de flujo	30
1.5 Apoptosis y citometría de flujo	38
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
2.1 Justificación del Estudio	43
2.2 Hipótesis.....	44
2.3.1 Objetivo principal	45

2.3.2	Objetivos secundarios	45
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1	Voluntarios	49
3.2	Aparatos utilizados.....	50
3.2.1	Contador celular.....	50
3.2.2	Citómetros de flujo	51
3.2.3	Otros aparatos y materiales utilizados	51
3.3	Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias.....	52
3.4	Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de los estados funcionales de los linfocitos.....	56
3.5	Protocolos de CMF empleados	57
3.5.1	Protocolos de verificación del citómetro de flujo	57
3.5.2	Compensación de las fluorescencias.....	59
3.5.3	Controles isotópicos (negativos).....	60
3.5.4	Protocolos de marcaje.....	61
3.5.5	Determinación de la positividad para la anexina-V mediante peróxido de hidrógeno.	66
3.6	Separación por gradiente de densidad.....	69
3.7	Análisis estadísticos	70
3.8	Variables del estudio	70
3.8.1	Variables hematológicas	70

3.8.2 Variables inmunofenotípicas	71
4. RESULTADOS	79
4.1 Valores demográficos.....	79
4.2 Subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y su apoptosis.....	81
4.3 Estados funcionales de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y su apoptosis.....	90
4.4 Subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y su apoptosis en relación a sexo y edad.....	102
4.4.1 Sexo	102
4.4.2 Edad	105
5. DISCUSIÓN.....	113
6. CONCLUSIONES.....	121
7. BIBLIOGRAFIA	125
8. ANEXOS	147
8.1 HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO.....	147
8.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO	151

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El control del Sistema Inmunitario permite distinguir lo propio de lo extraño y obrar en consecuencia, actuando mediante una gran variedad de células y tejidos. Su hito principal es reconocer específicamente los elementos extraños que pueden penetrar o surgir en el organismo, como microorganismos o células cancerosas.

La inmunidad adaptativa confiere a los mamíferos y otros vertebrados mandibulados de células T (derivadas del timo) y B (derivados de la médula ósea) capaces de generar un complejo conjunto de receptores de antígenos clonotípicos de una variedad inmensa a través de reordenamientos somáticos de los segmentos génicos variables (1) correspondientes a los genes IgH y TCR. Una diferenciación controlada en el espacio y en el tiempo y los procesos de selección celular positiva y negativa dan lugar a dos estirpes celulares complementarias del Sistema Inmunitario, capaces de ofrecer, mediante una actuación conjunta y sincronizada de una protección perfecta, específica, de alta sensibilidad y permitiendo, además, presentar memoria celular a largo plazo.

Los linfocitos T (LT) pueden regular las funciones de las células B, las propias células T y algunos otros tipos celulares participantes del Sistema Inmunitario. Actúan ayudando a la producción de anticuerpos generados por parte de los linfocitos B (2,3) y son las células que van a llevar a cabo la inmunidad antígeno-específica mediada por célula (IMC). La IMC va a jugar un papel indispensable en la destrucción de células infectadas por patógenos

que se replican intracelularmente, así como aquellas células que presentan cambios que les permitan escapar a los controles regulatorios, como las células cancerígenas. La IMC también es responsable de la enfermedad injerto contra huésped tras un trasplante, de las reacciones autoinmunitarias y de las reacciones alérgicas de tipo IV a fármacos, así como de la dermatitis de contacto.

Los TCR aparecen, únicamente, como complejos multiméricos asociados a la membrana de las células, no secretándose de forma soluble. Son capaces de reconocer péptidos procesados y glicoproteínas sintetizadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), expresadas en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC o células accesorias).

Aunque la organización estructural de los genes del MHC es algo diferente para las distintas especies, en la mayoría de ellas, podemos encontrar tres grandes zonas, que determinan tres tipos de moléculas:

1. Genes de clase I (MHC-I): Están presentes en la mayoría de las células nucleadas, y determinan glicoproteínas de membrana que se utilizan para presentar antígenos peptídicos de células propias alteradas a los LT citotóxicos (Tc).
2. Genes de clase II (MHC-II): Sólo se encuentran en las APC (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B) y determinan glicoproteínas de membrana que sirven para presentar antígenos peptídicos a LT helper (Th).
3. Genes de clase III (MHC-III): determinan proteínas relacionadas con el Sistema Inmunitario, como proteínas del complemento o

del factor de necrosis tumoral (TNF), así como otras proteínas no relacionadas con la respuesta inmunitaria.

1.1 El linfocito T

El LT es la célula principal en la respuesta inmunitaria adaptativa. En la sangre periférica de los humanos, podemos encontrar dos subpoblaciones de LT que se diferencian en la glicoproteína de superficie celular encargada de reconocer antígenos (receptor de antígeno de células T o TCR): una mayoría de LT que expresan el receptor $\alpha\beta$ o TCR2 (LT $\alpha\beta$), que reconocen péptidos antigénicos unidos al MHC en la membrana de una APC y una minoría que expresa el TCR $\gamma\delta$ o TCR1 (LT $\gamma\delta$), con mayor variedad desde el punto de vista del reconocimiento antigénico, de forma que puede unirse a glicoproteínas y fosfoantígenos sin procesar derivados de patógenos o bien a moléculas MHC no clásicas (4–6) (Fig. 1.1).

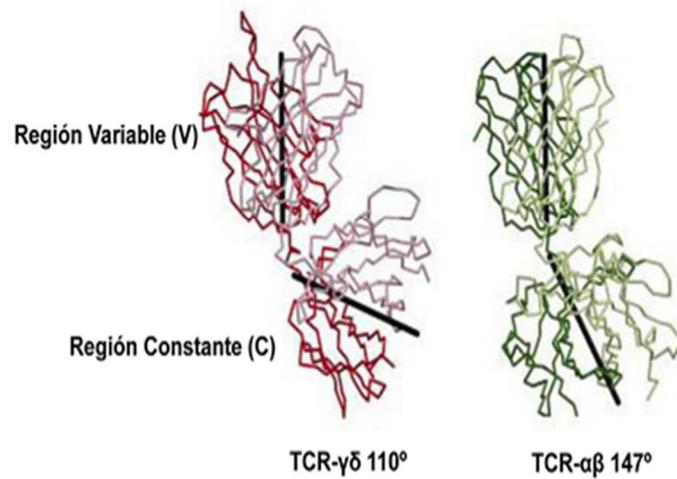


Fig. 1.1. Imagen comparativa de la estructura del TCR- $\alpha\beta$ y el TCR- $\gamma\delta$.(7).

1.1.1 Organización genética de los TCR

Las cadenas peptídicas del TCR, $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, están formadas por dímeros unidos covalentemente por puentes disulfuro, y son responsables del reconocimiento antigénico. Las regiones variables de las cadenas de los receptores de antígeno vienen determinadas por distintas combinaciones génicas de los segmentos V (variable), D (diversidad) y J (joining) que componen cada uno de los genes que las codifican (TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ), y se encuentran organizadas en diferentes dominios estructurales, siendo el dominio extracelular el responsable de la especificidad del TCR (7). Los segmentos génicos V, D y J se encuentran en las regiones 5' de cada gen

con una distribución de segmentos muy conservada, mientras que los exones que dan lugar a las regiones constantes se encuentran en las regiones 3'.

La cadena alfa contiene tres *clusters* de genes, $V\alpha$, $J\alpha$ y $C\alpha$, formados por 49 genes α , (7 de los cuales son pseudogenes). Un fragmento del locus δ dentro de la región $V\alpha$, confirma la existencia de un precursor común para ambas poblaciones linfocitarias. 61 genes componen la región $J\alpha$, con tres pseudogenes y 8 genes no utilizados, aunque contienen secuencias ORF (pauta abierta de lectura). Por último, sólo hay un gen en la región conservada $C\alpha$ (8).

Fig. 1.2



Fig. 1.2. Configuración genética del TCR alfa. Adaptado a partir de Leiden JM (9).

La cadena TCR beta está codificada por cuatro segmentos: $V\beta$, $J\beta$, $C\beta$ y $D\beta$ (10). Hay aproximadamente 75 genes en el segmento $V\beta$, dos genes de diversidad $D\beta$, 6 $J\beta 1$ y 7 $J\beta 2$ y dos genes $C\beta$. La fig. 1.3 muestra la organización de los genes β .

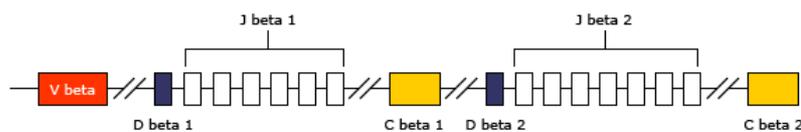


Fig. 1.3. Configuración genética del TCR beta. Adaptado de: Leiden JM (9).

La región TCR gamma, al igual que la TCR alfa están compuesto por tres segmentos de reordenamiento: $V\gamma$, $J\gamma$, $C\gamma$. Hay 6 genes $V\gamma$ funcionales, 5 pseudogenes y tres genes con ORF que no se utilizan. Finalmente hay tres genes $J\gamma$ y dos genes $C\gamma$ (11) (fig. 1.4).

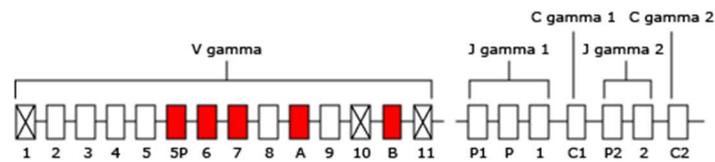


Fig. 1.4. Configuración genética del TCR gamma. Adaptado de: Leiden JM (9).

Por último, al igual que las cadenas beta, las cadenas delta están formadas por cuatro segmentos de genes: $V\delta$, $J\delta$, $C\delta$ y $D\delta$. Hay un gen $V\delta$ que incluye una región variable alfa. A continuación encontramos tres $D\delta$, 4 $J\delta$ y un solo que gen en el dominio conservado $C\delta$ (12) (fig. 1.5).

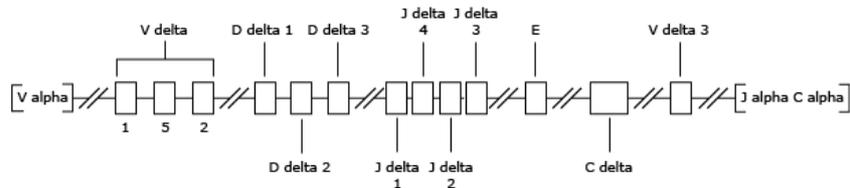


Fig. 1.5. Configuración genética del TCR delta (13).

Los reordenamientos clonales que se producen entre los segmentos V, J y D, junto a las hipermutaciones somáticas de la región hipervariable del segmento V durante su ontogenia, permiten un reconocimiento casi infinito de antígenos (14). Estas cadenas variables están asociadas a unas cadenas invariables responsables de la transducción de las señales intracelulares tras el reconocimiento antigénico. Éstas, son miembros de la familia CD3, formando homodímeros (fig. 1.6).

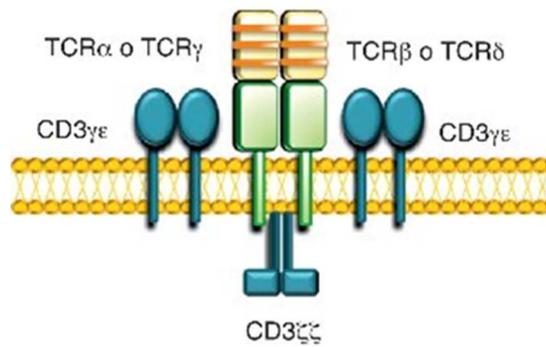


Fig. 1.6. Estructura del complejo TCR/CD3 (15)

La existencia de este mecanismo de generación de los distintos TCR y BCR en linfocitos es la base de la inmunidad específica o adaptativa.

1.1.2 Origen de los $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$

La diferenciación de los $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$ se diferencia desde los estadios tempranos del desarrollo en el timo. Tanto los $LT\alpha\beta$ como los $LT\gamma\delta$ derivan de un mismo precursor común que procede de las células madre

hematopoyéticas que se encuentran en la médula ósea o en el hígado fetal. La llegada de este precursor a la corteza del timo, desencadena una señalización mediada por receptores de tipo Notch, iniciando la diferenciación de los LT (16). En el primer estadio de maduración, las células T no tienen expresión en su membrana de los receptores CD4 y CD8 (estadio conocido como doble negativo, DN). Las siguientes etapas de maduración de DN1 a DN4 se clasificarán en función de la expresión en superficie de los receptores CD44 y CD25: DN1 (CD25-CD44+), DN2 (CD25+CD44+), DN3 (CD25+CD44-) y DN4 (CD25-CD44-) (17,18).

Los timocitos DN1 son las células que acaban de migrar al timo desde la médula ósea y, por tanto, portan los reordenamientos DH-JH del gen IGH que ocurrieron anteriormente. Durante los estadios DN2 y DN3 se producen los reordenamientos de los genes β , γ y δ , permitiendo la formación de las cadenas TCR funcionales que dan lugar, en la fase final de DN3 a dos programas de desarrollo diferenciados que permitirán la generación de dos subgrupos de LT con características y funciones diferenciadas: un LT $\gamma\delta$ maduro y un linfocito pre-TCR portador de la cadena β (19). El pre-TCR consiste en una cadena TCR β y una cadena invariable denominada pre-T α , asociadas a los dímeros de las cadenas invariables CD3(20).

Aquellas células incapaces de expresar una cadena β , γ o δ funcional serán desechadas.

La señalización pre-TCR en DN3 desencadena una maduración de timocitos dobles negativos a timocitos dobles positivos (CD4+CD8+). Ya en el estadio DN4 se detecta reordenamiento de la cadena α permitiendo la formación de T $\alpha\beta$ CD4 o T $\alpha\beta$ CD8 que migran fuera del timo como LT $\alpha\beta$

maduros, que serán clasificados como LT helper ($T\alpha\beta$ CD4) o linfocitos citotóxicos ($T\alpha\beta$ CD8) (21) (fig. 1.7).

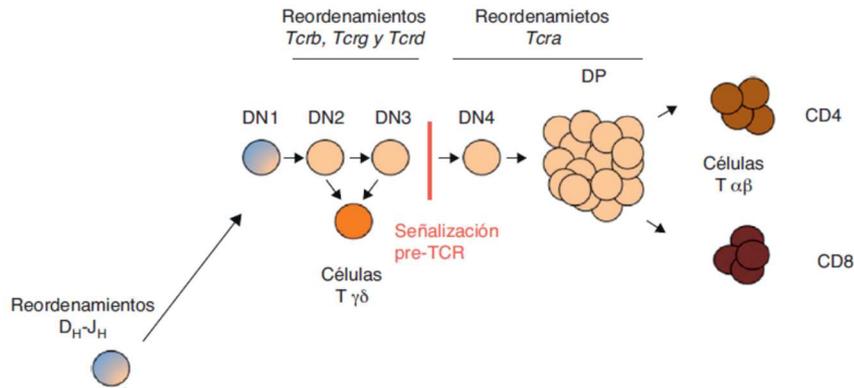


Fig. 1.7 Maduración de los LT. Adaptado de Alberto García-Mariscal (22)

1.1.3 Distribución anatómica

Los $LT\alpha\beta$ son más frecuentes en sangre periférica (90-95%), bazo y nódulos linfoides. Sin embargo, los $LT\gamma\delta$ constituyen sólo una pequeña proporción (1-5%) de los linfocitos circulantes y en los órganos linfoides secundarios, encontrándose fundamentalmente en los epitelios, donde pueden constituir hasta el 50% de los linfocitos intraepiteliales (LIE) en la mucosa (10-20% en el epitelio genitourinario, 40-50% en el intestinal y hasta el 60% de las células T en la dermis) (23-25).

1.1.4 El Linfocito $T\alpha\beta$

Todos los $LT\alpha\beta$ en sangre periférica llevan en su superficie celular los complejos receptores CD2 y CD3 y los antígenos de superficie CD5 y CD28. Los antígenos de superficie CD4 y CD8, así como citoquinas o quimioquinas sirven para diferenciar las diferentes poblaciones funcionales, que difieren en cómo interactúan con las proteínas del MHC. Una célula madura normal, expresa una de estas moléculas, pero nunca ambas. El antígeno CD8 es requerido para la interacción de la célula T con las moléculas expresadas por los genes del MHC clase I, mientras que el antígeno CD4 es necesario para la interacción con células que expresan moléculas del MHC clase II.

El CD4 es una glicoproteína transmembrana de 55 KDa codificada por un gen situado en el cromosoma 12. Es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y presenta cuatro dominios extracelulares similares al de las inmunoglobulinas.

El antígeno de superficie CD8 se compone de dos polipéptidos designados alfa y beta. Ambas cadenas tienen un peso molecular de 32 KDa y están codificadas por genes situados en el cromosoma 2. La mayoría de las ocasiones, el antígeno CD8 está formado por un heterodímero entre las cadenas alfa y beta, aunque también podemos encontrar homodímeros alfa-alfa. Ambas formas son funcionales, aunque difieren en su papel en el desarrollo del LT.

Existen dos clases principales de LT: los LT colaboradores (LTh, del inglés helper) y los LT citotóxicos (LTc). Los LTh aumentan la respuesta de

otras células inmunitarias, como los linfocitos B que producen los anticuerpos. Por su parte, los LTc se encargan de destruir células infectadas, y debido a que, a diferencia de los LTh, participan directamente en la defensa contra infecciones, los LTc reciben el nombre de células efectoras. Los LTh se dividen en dos categorías generales, Th1 y Th2, definidas por el tipo de citosinas que secretan (26,27). Las citosinas particulares producidas durante una respuesta inmune determinan otras células inmunes reclutadas. Aunque existen excepciones, la separación de las funciones de los LTh y LTc viene dada por el origen de los antígenos que reconocen.

1.1.5 El Linfocito T $\gamma\delta$

Los LT $\gamma\delta$ pueden clasificarse en dos poblaciones principales según la expresión del TCR: V δ 1 y V δ 2 (también conocidos como V γ 9V δ 2 por ser su fenotipo predominante). Los V δ 1 predominan en la piel, el intestino y el aparato genitourinario, mientras que los V γ 9V δ 2, son las células predominantes en sangre periférica (28).

La mayoría de los LT $\gamma\delta$ periféricos son dobles negativos para CD4 y CD8 (CD4-CD8-); sin embargo, los LT $\gamma\delta$ intestinales (LIEi $\gamma\delta$) expresan con frecuencia CD8 (50 % de LIEi $\gamma\delta$), siendo común la expresión del homodímero CD8 $\alpha\alpha$, un marcador de diferenciación extratímica (29).

Un porcentaje variable de LT $\gamma\delta$ periféricos expresan CD28 (coestimulador de los LT $\alpha\beta$) (30), CD40L (lo que implica su capacidad para

interaccionar con linfocitos B) (31) o receptores de células NK como el NKG2D (que es un mediador de actividad citolítica) (32).

Funciones específicas de los $LT\gamma\delta$ (fig.1.8):

- Capacidad de respuesta rápida contra agentes microbianos en la primera línea de defensa mediante el reconocimiento de fosfoantígenos, lípidos y proteínas no procesadas por el MHC (33,34).
- Acción citotóxica directa ante células infectadas o tumorales mediante la secreción de perforinas y granzima B (35) independiente de anticuerpos (36). Incluso pueden opsonizar y fagocitar directamente células infectadas (37).
- Secreción de citosinas proinflamatorias, sobre todo TH1, fundamentales para el control de virus y bacterias intracelulares (como el $IFN-\gamma$, el $TNF-\alpha$), o bacterias extracelulares y hongos (como la IL-17) (38,39).
- Activación de la respuesta inmune a nivel local promoviendo la maduración de las células dendríticas y la respuesta anti-infecciosa de los macrófagos y las células NK (40,41) y aumentando la capacidad de resistencia a la invasión de las células epiteliales (42).
- Estimulación y regulación de la inmunidad innata. Los $LT\gamma\delta$ pueden regular a otras células implicadas en la respuesta inmunitaria innata mediante la producción de citoquinas

inmunosupresoras como el TGF- β , o la IL-10 (43). Además pueden migrar a los órganos linfoides secundarios y colaborar con los linfocitos B en la producción de anticuerpos mediante la producción de CXCR5 (CXC chemokine receptor 5) (44,45); regular la actividad de los LT $\alpha\beta$ (46) (de hecho los ratones deficientes en LT $\gamma\delta$, presentan una respuesta exagerada de LT $\alpha\beta$) o eliminar LT reguladores (47).

- Presentación de antígenos. Los LT $\gamma\delta$ pueden procesar y presentar antígenos de patógenos (células infectadas, virus) a otras células inmunitarias, como los LT $\alpha\beta$ (48,49).
- Regeneración epitelial y curación de heridas, estimulando la producción de hialurónico por las células epiteliales (que se deposita en la matriz extracelular y atrae a los monocitos y macrófagos) (50) o mediante la producción de factores de crecimiento epitelial -como el insulin-like growth factor (IGF-1), o el keratinocyte growth factor 1 y 2 (KGF-1, KGF-2) (51).

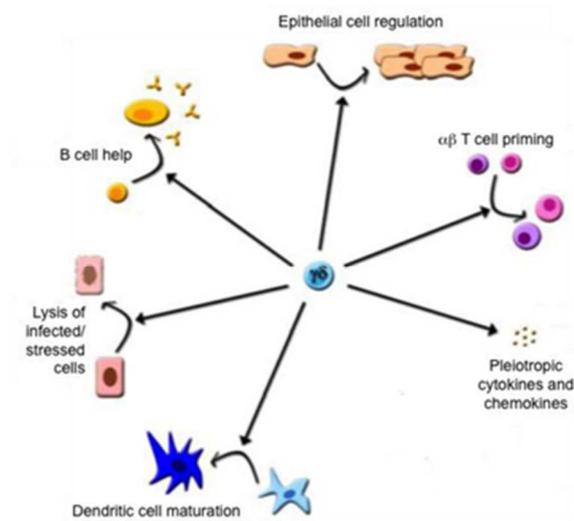


Fig. 1.8. Esquema de las funciones específicas de los LT $\gamma\delta$ (52).

Las características principales de los $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$ se resumen en la siguiente tabla:

Característica	$LT\alpha\beta$	$LT\gamma\delta$
Frecuencia en SP	Aprox. 75%	<10%
MHC	CD4+: MHC clase II CD8+: MHC clase I	No MHC
Expresión CD4/CD8	≈60% CD4+ / ≈30% CD8+ <1% DP / <1% DN	>70% DN / <1% CD4+≈30% CD8+
Reconocimiento antigénico	Péptidos procesados	Péptidos no procesados / no péptidos
Variabilidad en el repertorio TCR V	Alta	Moderada
Diversidad TCR	Muy diverso	Relativamente restringido a pesar de su alto potencial de variabilidad
Función	Inmunidad adaptativa	Regulación de la inmunidad, supervivencia y homeostasis.

1.2 La inmunosenescencia

Al igual que otros órganos y sistemas, el Sistema Inmunitario es susceptible a los cambios relacionados con la edad. En general, resulta en una competencia inmune deteriorada y un cambio entre la respuesta inmunitaria y el ataque de los patógenos (53–55). El proceso de inmunosenescencia tiene consecuencias dramáticas para el individuo: infecciones de repetición, imposibilidad para responder a las vacunas (56) y una disminución para luchar contra enfermedades como el cáncer. El avance de la edad es un factor de riesgo para la autoinmunidad. Los cambios que ocurren durante la inmunosenescencia en el compartimento celular T son particularmente importantes con una progresiva linfopenia T a expensas de los LT CD4+ y LT CD8+ (57,58).

El acervo de células T se ve alterado por los cambios morfológicos del timo. La involución del timo es un proceso complejo que permite la reestructuración de la glándula, permaneciendo de igual tamaño en el transcurso de la vida, pero con alteraciones en su composición. El epitelio tímico (lugar de generación de nuevos LT) involuciona rápidamente, mientras el espacio tímico perivascular, colmado de LT maduros, crece en la infancia, adolescencia y en la etapa adulta temprana. Posteriormente el espacio perivascular es reemplazado por tejido adiposo, de manera que a los 60 años el espacio del epitelio tímico es mínimo (59). La producción de hormonas tímicas, como timulina, continúa durante toda la vida, aunque sus niveles plasmáticos se encuentren disminuidos. Aún más, se ha demostrado que los

individuos añosos pueden generar LT funcionales y que el timo podría ayudar a la diferenciación de LT vírgenes (59,60).

Se podría pensar que a causa de la involución tímica temprana en el transcurso de la vida (a partir del primer año de vida), la diferenciación de los LT se afectaría con la edad, pero no es así. Se ha demostrado en humanos que el reemplazo de parénquima tímico por tejido adiposo no se produce más allá de los 50 años, es decir, después de los 50 años el timo contiene menos del 20% de tejido tímico original y la cantidad de tejido no adiposo en el timo no disminuye después de los 30 a 35 años (59,60).

Se han descrito cambios importantes tanto a nivel funcional como en el fenotipo de los LT asociados al envejecimiento (61,62). Los primeros estudios describieron la disminución sustancial en la proporción de LT vírgenes, con un aumento en la población de LT de memoria, así como la falta de respuesta de esta última subpoblación. Uno de los principales hallazgos es la disminución importante de los LT CD4⁺ productores de IL-2 y la disminución en la expresión del receptor de la IL-2 (CD25). También se han descrito disminución de las señales de transducción y disminución de la respuesta proliferativa del LT independiente de la ayuda de coestimulación (61). Los mecanismos por los cuales se produce un cambio en las poblaciones linfocitarias de un fenotipo virgen CD45RA⁺, CD62L⁺, a un fenotipo de memoria CD45RO⁺ aún no están establecidos con claridad (61,63). Se cree que es debido a la acumulación de linfocitos de memoria funcionales o a la presencia de linfocitos anérgicos que comparten el mismo fenotipo.

En un trabajo reciente, en nuestro laboratorio estudiamos un grupo de individuos sanos estratificados por edad (con sujetos en un rango de edad de 18 a 95 años, n=157) con el objetivo de examinar los cambios relacionados con la edad en las diferentes subpoblaciones de linfocitos (64). Observamos un descenso significativo en los valores absolutos de linfocitos CD3+ a partir de la década de los 60 años, este descenso depende, en nuestro estudio, de las células CD4+. En este descenso están relacionados tanto los LT $\alpha\beta$ como los LT $\gamma\delta$. Sin embargo, los LTCD8+ tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ mantienen unas cifras parecidas a lo largo de la edad. Esto puede reflejar un envejecimiento del Sistema Inmunitario probablemente debido a involución tímica. La razón por la que descienden los LT colaboradores y se mantienen los citotóxicos convendría estudiarla. Otros estudios encontraron disminución de todos los subtipos de LT tanto CD4+ como CD8+ con la edad (65,66) o disminución de CD3+ y CD8+ pero no CD4+ (67) o incluso ningún cambio significativo (68–70). Aunque es probable que las edades de los sujetos en los estudios en que no se encontró diferencias por edad fuera mucho menor, o que la población de mayores de 60 años fuera muy pequeña.

Otra alteración relacionada con el envejecimiento del Sistema Inmunitario podría ser el aumento significativo de los valores absolutos de LT CD3+CD56+ a partir de los 50 años que alcanza un aumento muy intenso de los 70 a los 95 años. Estos cambios en LT capaces de mediar citotoxicidad no restringida al MHC, también fueron descritos previamente por Sansoni et col. (66) y junto con el aumento de células natural killer podrían ser cambios encaminados a compensar la disminución de LT en los ancianos.

Ensayos inmunológicos que estudian los cambios según el sexo, tanto en humanos como en ratones, sugieren que las hembras producen títulos más altos de anticuerpos que los machos. En general las hembras tienden a presentar reacciones inmunitarias más intensas (71).

Referente a diferencias en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias respecto al sexo, nuestro equipo de investigación encontró un aumento estadísticamente significativo de linfocitos CD3+ a expensas de LT CD4+ en las mujeres. No hubo diferencias en los valores de LT CD8+. De forma paralela observamos un aumento de LT CD3+ $\alpha\beta$ y CD4+ $\alpha\beta$. Con respecto a las poblaciones de linfocitos $\gamma\delta$ no encontramos diferencias estadísticamente significativas en función del sexo para ninguna de las subpoblaciones CD3+ $\gamma\delta$, CD3+CD4-CD8- $\gamma\delta$, CD3+CD4+CD8+ $\gamma\delta$ ni CD3+CD56+ $\gamma\delta$ (64).

Llama la atención un aumento significativo de LT natural-killer like, CD3+CD56+, en los hombres, que parece depender de los LT CD3+CD56+ $\alpha\beta$ ya que no hay diferencias con respecto a los LT CD3+CD56+ $\gamma\delta$, así como que la proporción de LT $\gamma\delta$ de sangre periférica sea inferior a otras publicaciones que lo cifran en el 5-10%. Nuestra media es del 3% (64).

Los LT $\gamma\delta$ tienden a disminuir hacia la década de los 70 años, este descenso depende de los CD3+CD4-CD8- $\gamma\delta$, que son los más frecuente en sangre periférica, no existiendo diferencias en los CD3+CD8+ $\gamma\delta$ con la edad (64). La disminución de LT $\gamma\delta$ con la edad ya se describió por Argentati et al. (72) que también demostró un patrón de producción de citoquinas alterado en estos pacientes ancianos con una proporción aumentada de TNF- α . Estas

alteraciones podrían estar relacionadas con el mal pronóstico de las infecciones y la predisposición a tumores en los pacientes ancianos en el proceso de inmunosenescencia.

Los $LT\alpha\beta$ también disminuyen con la edad a expensas de los linfocitos $CD3+\alpha\beta$ y $CD3+CD8+\alpha\beta$ sin encontrar diferencias con la edad en los $CD3+CD4+\alpha\beta$ (64).

Existen dos hipótesis que explicarían el proceso de envejecimiento celular. La primera hipótesis propone que el envejecimiento es un proceso activo, un evento genéticamente programado, en el cual los LT atraviesan por una serie de procesos programados genéticamente durante su desarrollo; estos procesos son necesarios para producir células maduras funcional y fenotípicamente distinguibles, para después envejecer y morir. La segunda hipótesis plantea que el envejecimiento celular es el resultado de la acumulación de una serie de errores asociados con mecanismos de reparación imperfectos del ADN que llevan a alteraciones tanto del mismo como de los telómeros y que se potencian en el transcurso de nuestras vidas, ya que nuestro Sistema Inmunitario se enfrenta a una serie de noxas tanto intrínsecas como extrínsecas (por ejemplo, patógenos o carcinógenos) que inevitablemente resultan en la acumulación de errores cuando el individuo envejece (61).

La apoptosis de los LT va aumentando con el envejecimiento (73). Phelouzat *et al* (74,75) y Lechner *et al* (76) demostraron que los LT de individuos ancianos presentaban un incremento en la muerte celular inducida por activación (MCIA) comparado con individuos jóvenes. La MCIA ocurre en el momento en que el TCR es activado por la unión de su antígeno

específico. El incremento de la apoptosis se acompañó de un incremento en la expresión de CD95 (receptor de muerte).

1.3 La apoptosis

La apoptosis hace referencia a la muerte celular que ocurre de una manera programada y que está caracterizada por una condensación celular, siendo un fenómeno no inflamatorio, a diferencia de la necrosis. El término apoptosis aparece por primera vez referenciado en 1972, cuando los investigadores Kerr, Wyllie y Currie (77) diferencian la muerte celular en dos grandes grupos: la muerte por necrosis, producida por una gran daño tisular y la muerte por apoptosis, que engloba un proceso de muerte celular más controlada, activo y con gran gasto de energía.

Generalmente la necrosis es un proceso que viene inducido por un daño tisular severo que provoca cambios fisiológicos que incrementan el volumen celular, la desorganización de los orgánulos internos, la contracción de la membrana mitocondrial, la dispersión de la cromatina y finalmente la liberación del contenido celular y moléculas proinflamatorias por fragmentación de la membrana celular, desencadenando una respuesta inmune capaz de afectar al tejido que rodea a la célula necrótica. Barros *et al* sugieren que los responsables del aumento del volumen celular y la desorganización interna de los orgánulos es la apertura de los canales catiónicos no selectivos (NSCC) originando un incremento de la concentración citosólica de Na⁺. Este incremento activaría posteriormente la ATPasa Na⁺/K⁺ de la membrana

citoplasmática generando un desequilibrio osmótico y una mayor entrada de agua al interior celular, generando un aumento del volumen celular y la lisis de algunos orgánulos internos (78,79).

El proceso de apoptosis posee unas características propias que lo hacen fácilmente distinguible de la necrosis. La apoptosis tiene un papel crucial en los organismos pluricelulares, tanto en el desarrollo (morfogénesis, formación y maduración del sistema nervioso e inmunitario) como posteriormente en mantener la homeostasis tisular, eliminando células dañadas, en la defensa contra las infecciones o en la inmunosenescencia (como ya hemos visto). Durante la apoptosis, las células disminuyen su tamaño, originando una pérdida de adherencia y de los contactos célula-célula (80) debido a la inhibición del sistema de transporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, pero manteniendo íntegra en todo momento la funcionalidad de la membrana plasmática, evitando de este modo la salida al exterior del contenido intracelular. A medida que avanza el proceso, la membrana plasmática comienza a tener circunvoluciones (ondulaciones en la superficie), con una apariencia vesicular característica. La fosfatidilserina (fosfolípido originariamente enclavado en la membrana interna de la célula) pasa al exterior de la membrana plasmática, facilitando el reconocimiento de la célula por los macrófagos. Posteriormente se produce una fragmentación del ADN por endonucleasas, impidiendo ya la replicación celular. Una vez finalizado el proceso, aparecen los cuerpos apoptóticos que mantienen sus membranas intactas y que son reconocidos por los macrófagos o las células dendríticas procediendo a su fagocitación, impidiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria.

1.3.1 Regulación de la Apoptosis

En eucariotas superiores, la apoptosis puede ser iniciada desde el exterior (vía extrínseca) o desde el interior (vía intrínseca):

Vía extrínseca: la apoptosis se inicia por la unión de los ligando a sus receptores de muerte (81).

Vía intrínseca: la apoptosis se inicia como respuesta a un estrés ambiental (calor, rayos x, radiación ultravioleta,), a daño en el ADN (lesiones genéticas) o a la presencia de proteínas mal plegadas (estrés endoplásmico). Estos acontecimientos alteran la función de la mitocondria, un orgánulo que es esencial no sólo para la supervivencia celular, sino también para la regulación de la entrada de la célula en la apoptosis (82).

Dos familias de proteínas se consideran el centro de la maquinaria apoptótica, las caspasas (83) y las proteínas de la familia BCL-2, que son las ejecutoras y las reguladoras de la apoptosis (84).

La apoptosis iniciada por los receptores de muerte (vía extrínseca), es responsable de la eliminación de células durante el desarrollo, la maduración del Sistema Inmunitario y la eliminación de tumores mediada por éste. Un ejemplo de estos receptores es el receptor Fas (CD95 o APO1) y su ligando FasL (CD178), pertenecientes a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La unión del ligando a Fas provoca la agregación de tres o más moléculas Fas y el reclutamiento de un gran complejo de proteínas adaptadoras que contienen un dominio de muerte citosólico FADD

(proteína con dominio de muerte asociado a Fas). FADD contiene dos dominios importantes, que son el dominio DD (dominio de muerte), con el cual interacciona Fas, y el dominio efector de muerte (dominio DED), que es el encargado de transmitir la señal apoptótica a los efectores, es decir a las caspasas, especialmente caspasa 8 y caspasa 3 ya que tienen también un dominio DED. (Fig. 1.9).

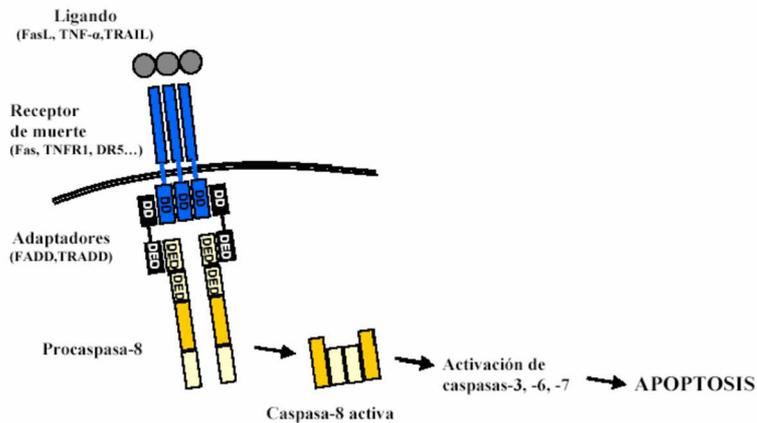


Fig. 1.9. Activación de caspasas por medio de receptores de muerte.

La vía intrínseca se realiza a través de la mitocondria, con la activación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa permitiendo la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol, el cual se asocia a la región C-terminal del factor de activación de apoptosis (Apaf-1). Esta interacción facilita la unión de dATP con Apaf-1 y la exposición de su motivo CARD N-terminal, el cual puede ahora oligomerizar y formar un complejo capaz de reclutar varias moléculas de procaspasa 9 inactivas a través de interacciones heterotípicas CARD-CARD para formar el apoptosoma, que activará las caspasas iniciadoras (85,86). La caspasa 9 activa, rompe y activa

sucesivamente, las pro-caspasas 3 y 7 que son las responsables de la rotura de varias proteínas que lideran las características químicas y morfológicas de la apoptosis (87).

La conexión de la vía extrínseca con la intrínseca la realiza P53, mediante la regulación transcripcional de Bid. Este miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 es activado por caspasa 8, y una vez activado Bid es capaz de translocarse a la mitocondria y activar a Bak, desencadenando la activación de la ruta intrínseca(88).

1.3.2 Las caspasas

Las caspasas (cisteín aspartato proteasas) constituyen una familia de proteasas altamente conservadas en la evolución que únicamente cortan después de un residuo de aspártico, y tienen un sitio activo muy conservado QACxG (89). En mamíferos se conocen 14 tipos de caspasas, que se pueden dividir entre caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Las caspasas actúan en cascada y como substrato final tienen a proteínas que van a producir los cambios morfológicos de la muerte celular. Las caspasas se sintetizan como proenzimas que contienen un predominio unido a las subunidades enzimáticas. Cuando se produce la activación proteolítica, se libera el predominio y las subunidades enzimáticas sufren un cambio conformacional para constituir la enzima activa. Según el pre-dominio se clasifican en caspasas efectoras, las cuales no tienen pre-dominio o bien lo tienen muy corto como caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7, caspasa-14 y caspasas iniciadoras las

cuales poseen un predominio largo como caspasa-1, caspasa-2, caspasa-4, caspasa-5, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10, caspasa-12 y caspasa-13.

Dentro del pre-dominio se encuentran los dos dominios de interacción proteína-proteína que son el dominio DED unidos mediante asociaciones hidrofóbicas y CARD unidos mediante interacciones electroestáticas, como vimos más atrás.

Entre las acciones de las caspasas, hay que destacar:

- Inactivación de proteínas del citoesqueleto.
- Activación por proteólisis de Bid.
- Caspasa-3 es capaz de cortar a Bcl-2, quitando su dominio intermembrana y convirtiéndola en una molécula proapoptótica.
- Inactivación de NF-KB, lo que bloquea la transcripción de genes de supervivencia.
- Estabilización de P53.
- Inactivación de Rb.

1.3.3 Genes de la familia Bcl-2

La familia BCL-2 (del inglés B-cell lymphoma/Leucemia 2 gene) se compone de proteínas con funciones proapoptóticas y antiapoptóticas, que

comparten secuencias homólogas pertenecientes a un dominio conservado conocido como dominio de homología BCL-2 (dominio BH), que se corresponde con secuencias alfa-hélice altamente conservadas. Podemos clasificar a la familia de miembros BCL-2 en función del número de dominios BH presente en su estructura. Así, todos los miembros antiapoptóticos, como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1, Bcl-W, y un grupo de la familia de miembros proapoptóticos, Bak, Bax, Bok y Mtd, poseen tres o cuatro dominio BH, de BH1 a BH3 o BH4. La familia "BH3-only", formada por los miembros proapoptóticos BAD, BID, BIM, NOXA, BIK, HRK, y PUMA, se caracterizan por presentar un único dominio BH, BH3, también conocido como el dominio mínimo de muerte para su unión a los miembros de la familia BCL-2 multidominio (90).

Bax: Bcl-2-associated protein X, se asocia a bcl-2. Se trata de una proteína de 21 kD con la capacidad de suprimir la función de bcl-2 de bloquear la apoptosis. En algunos tejidos, los patrones de expresión de bax y bcl-2 están regulados de forma paralela, lo que sugiere que existe un antagonismo activo (91).

Bcl-x: Aparece en modo corto y largo. La proteína producida por la forma larga, Bcl-x l, tiene un 47 % de homología con bcl-2 y una distribución celular semejante a este, lo que sugiere que ambas proteínas funcionan de una manera similar. Por el contrario, el producto derivado de la forma corta, Bcl-x s, antagoniza con la inhibición de la muerte celular programada por las dos anteriores (92).

Bak: La proteína Bak (Bcl-2 homologous antagonist/Killer) aumenta la tasa de apoptosis, expresándose ampliamente en epitelios complejos incluyendo nasofaringe, esófagos, colón y vejiga, en los cuales tiene un papel proapoptótico (92).

Mcl-1: El gen Mcl-1 (Mieloid cell leukemia-1), descubierto en células de la leucemia mieloblástica, funciona bloqueando la apoptosis en células hematopoyéticas más diferenciadas (93).

Mecanismos de acción

Los miembros de la familia pro y anti-apoptótica pueden formar dímeros; Algunos de los miembros de la familia forman homodímeros (bcl-2, bax, bcl-x L y bcl-x S), y otros, como el bcl-2, pueden formar heterodímeros con bax, bcl-x S, A1 y bad. A su vez, bax puede heterodimerizar con bcl-2, bcl-xL, Mcl-1 y A1 y bcl-xL puede heterodimerizar con bax, bad y bcl-xL. A pesar de que algunas células usan preferentemente uno de los miembros de la familia como factor de supervivencia, la mayoría de las células eucariotas presentan una tremenda redundancia en la expresión de los miembros de la familia de bcl-2. Por ejemplo, cuando bax aparece como un homodímero aumenta la sensibilidad de las células ante el estímulo apoptótico, sin embargo, si forma heterodímeros con proteínas antiapoptóticas, actúa protegiendo a la célula de la apoptosis. Por otro lado, bad puede formar heterodímeros con las moléculas antiapoptóticas, permitiendo a bax aumentar su función proapoptótica. Se ha establecido que los dominios BH1, BH2, y BH3 ejercen una fuerte influencia en la formación de homo o heterodímeros. Para la actividad proapoptótica, la formación de heterodímeros es esencial en el grupo de dominio BH3 que actúan a través de ligandos, pero no para el

grupo Mtd ya que esas tienen un impacto citotóxico independiente dañando las organelas directamente. Incluso ante la presencia de inhibidores de caspasas, las proteínas bax o bax-like conducen a la muerte celular, por permeabilidad mitocondrial formando canales iónicos en su membrana (94).

1.4 La citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF) es una técnica multiparamétrica que basa su principio en la medida de la dispersión de la luz que producen las células (o elementos de estudio) alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar cuando son presentadas, de una en una, frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada. Tiene sus orígenes en los contadores de partículas ideados por Moldavan en 1934 (95) y por Gucker y O'Konski en 1947 (96) con fines de investigación. La capacidad de medir las características de las partículas junto con el recuento fue incorporada en los modelos de citómetro ideados, entre otros, por Wallace Coulter en 1956 (fig. 1.10).

En 1965 se establece un gran avance cuando Kametsky y cols (97) utilizando un espectrofotómetro diseñaron un analizador de flujo con capacidad para medir simultáneamente varios parámetros en una célula, logrando llegar a velocidades de 500 células por segundo. Posteriormente, gracias al desarrollo de citómetros más pequeños y a la masificación de la tecnología de los anticuerpos monoclonales, se trasladó el citómetro de flujo desde las grandes instituciones de investigación a los laboratorios más pequeños.



Fig. 1.10: Modelo de contador celular de Coulter (Beckman Coulter, Inc).

A través de la citometría se pueden detectar proteínas de superficie y citoplasmática de células, potenciales de membrana, composición de lípidos de membrana, ADN, proteínas solubles en plasma o líquidos biológicos.

1.4.1 Componentes de un Citómetro de flujo

Un citómetro de flujo se compone de las siguientes partes: sistema de fluidos cerrado con una solución tamponada, una fuente de luz, un sistema óptico, un sistema electrónico, un sistema informático y un depósito de residuos.

1.4.1.1 Sistema de Fluidos

Transporta la muestra hasta el punto de interrogación (momento en que coinciden con el láser) alineando las células de una en una para que pasen por delante del láser, inyectando solución tamponada que genera un flujo central laminar por donde las células pasan rodeadas de un fluido envolvente, lo que se conoce como enfoque hidrodinámico.

1.4.1.2 Sistema óptico

Las células o partículas a estudiar pasan frente a un haz de luz que suele ser un láser. Al atravesar la muestra, el haz de luz que no se dispersa y sigue en dirección longitudinal es percibido por el detector de Forward Scatter (FS), que emitirá una señal proporcional al tamaño celular. La luz que se dispersa en forma lateral es mayor mientras más membranas o estructuras celulares deba atravesar, por lo cual una señal aumentada es interpretada por el detector de Side Scatter (SS) como una mayor complejidad interna o granularidad de la célula.

Además de medir el FS y el SS, se pueden usar anticuerpos conjugados con un fluorocromo que nos darán una señal positiva frente al detector cuando se hayan unido a la célula.

1.4.1.3 Sistema electrónico

La señal que generan las moléculas fluorescentes es muy débil, por lo cual se requiere para su amplificación de fotomultiplicadores (PMT), que son una serie de láminas eléctricas con una diferencia de potencial entre la entrada y la salida del tubo. La señal electrónica que sale es mayor que la que entra, de modo que se amplifica la señal. De este modo, los PTM son los que transforman la señal luminosa en electrónica.

El sistema electrónico también consta de un conversor analógico digital (ADC) que transforma la señal en un código informático de 0 y 1 que puede leer el ordenador. Además, clasifica la señal en canales de fluorescencia, es decir, transforma una variable continua, que va desde 0 mv hasta infinito, a intervalos que van de 0 a 1024 en los aparatos más antiguos hasta 262000 en los más modernos.

1.4.1.4 Sistema informático

El sistema informático está constituido por el ordenador que está asociado al citómetro. Una de sus funciones principales es proporcionar facilidades para la visualización de las señales y su interpretación. Para ello, el ordenador recibe del ADC la información con los resultados de la fluorescencia o del *scatter* para cada célula en cada uno de los detectores. Esta información se visualiza gráficamente como un punto, lo que conforma una gráfica de nube de puntos (*dot plot*) que es el fichero de citometría que almacena el ordenador. En estas nubes están contenidas las poblaciones de

células que deben ser separadas de acuerdo a los criterios de análisis e interpretación.

1.4.1.5 Escalas de visualización

Las gráficas pueden expresarse en diferentes tipos de escala, como la lógica, la logarítmica y la lineal. La escala logarítmica se puede usar en casos de que se desee amplificar diferencias entre intensidades más bajas de expresión de un determinado marcador, perdiendo resolución para las intensidades mayores. La escala lógica fue diseñada para los citómetros modernos basada en el principio de la biexponencialidad, que asume la existencia de valores lineales en torno al cero, evitando así amplificar demasiado las diferencias en intensidades menores y se transforma en logarítmica, que dimensiona bien las diferencias mayores de expresión de un marcador.

1.4.2 Generalidades sobre los Fluorocromos

Un fluorocromo (FC) es una molécula que al excitarse con luz emite una fluorescencia en una longitud de onda diferente a la original que es igual a la sumatoria de la excitada más la emitida. Cada FC tiene su propio espectro de emisión y de absorción, el cual debe ser capaz de excitarse a la longitud de onda del láser del citómetro.

1.4.2.1 Tipos de Fluorocromos.

1. FC que se unen no covalentemente a estructuras celulares: Son FC que debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares. Ejemplos de ello son los marcadores de contenido de ADN y ARN (Ej.: yoduro de propidio); marcadores del potencial de membrana (Ej.: cianinas y la rodamina 123), marcadores de membrana y lípidos, etc.

2. FC que son sensibles al microambiente que les rodea: Cambian sus características de acuerdo al microambiente (ej.: pH, Calcio, redox, actividad enzimática, polaridad, fluidez, etc.)

3. FC conjugados con anticuerpos: Reconocen los epítomos de los marcadores celulares de superficie o intracitoplasmáticos. Pueden usarse solos o combinados (en tándem). En los FC combinados, un FC se excita con la luz y a su vez esta luz es absorbida por un segundo FC que emite luz a una longitud de onda diferente, que es la que se mide. El prototipo de FC es la fluoresceína que al ser estimulada con luz ultravioleta (no visible) emite luz de color verde (visible). Ejemplos de FC combinados son la PE-Cy7 y el PerCP-Cy5.5.

1.4.2.2 Selección de Fluorocromos

Para seleccionar un FC de forma adecuada, deben considerarse sus características. El espectro de absorción debe ser cercano al espectro de emisión de la fuente de luz. El coeficiente de extinción (probabilidad de

absorber la luz) debe ser alto ($PE \gg FITC$), y puede modificarse al unir el FC al anticuerpo. El rendimiento cuántico se refiere a la probabilidad que tiene un FC de emitir la luz, o sea la proporción entre los fotones absorbidos y los emitidos y también es mayor en la PE que en la FITC. Otras características deseables en un FC son una adecuada estabilidad frente a la luz (fotoestabilidad) y al ambiente (por ej. frente a cambios de pH), así como un breve periodo de excitación.

El tamaño del conjugado puede ser un problema, como ocurre con la PE que al unirse a un Ac puede volverse insoluble. La concentración que se administra del conjugado también es importante, dado que debe ser suficiente para saturar los sitios de unión al marcador. De este modo, se puede asumir que la cantidad de fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad del complejo FC-Ac que se une al marcador.

La luz que es emitida por el FC pasa a través de diferentes espejos dicróicos que son aquéllos que reflejan luz por debajo de cierta longitud de onda, dejando pasar el resto que está por encima de su límite de detección. El citómetro utilizado para realizar el presente trabajo puede medir hasta 10 fluorescencias simultáneas.

En la fig. 1.11 podemos ver un esquema general del funcionamiento de un citómetro de 4 colores. La luz láser incide sobre las células en suspensión que pasan frente a ella y así se refleja la luz en forma frontal (FS) y lateral (SS). La luz reflejada pasa a través de los espejos dicróicos que van reflejando las longitudes de onda para las cuales están diseñados desviándola hacia el detector de fluorescencia. Las otras ondas se dejan pasar y son filtradas en el siguiente detector.

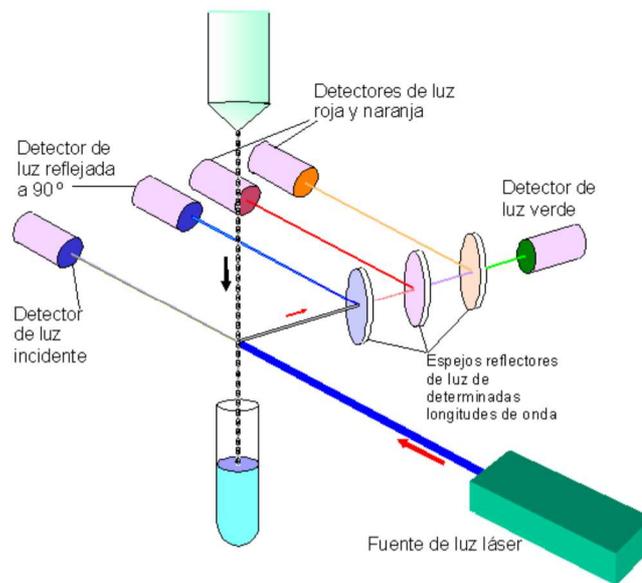


Fig. 1.11. Esquema óptico de un citómetro (Beckman Coulter, Inc).

En la Tabla 1.1, podemos ver un resumen de las características principales de los FC utilizados en el trabajo.

Fluorocromo	FC tipo Tándem	Pico de Longitud de onda de excitación (nm)	Pico de Longitud de onda de emisión (nm)	Láser que excita	Color de emisión aproximado
Fluoresceína (FITC)	No	495	519	Azul	Verde
R-Phycoerythrin (PE)	No	480;565	578	Azul	Amarillo
PE/Dazzle594 ECD (Texas red Phycoerythrin)	Si	486	660	Azul	Rojo
Peridinin chlorophyll protein-Cy5.5 TruRed (PerCP- Cy5.5)	Si	482 / 564	690	Azul	Rojo
PE-Cy7	Si	480;565;743	767	Azul	Rojo
Allophycocyanin (APC)	No	650	660	Rojo	Rojo
Alexa Fluor 700		633	719	Rojo	Rojo
APC/Cy7	Si	650	785	Rojo	Rojo
Pacific Blue	No	403	455	Violeta	Azul
Brilliant Violet 570	No	405	570	Violeta	Azul

Tabla 1.1. Fluorocromos utilizados en el presente trabajo.

1.4.2.3 Calibración y compensación del equipo

La calibración consiste en ajustar la amplificación del sistema de fotomultiplicadores para que las células no queden fuera de escala y exista una distancia suficiente entre positivas y negativas. La compensación consiste en restar a cada detector el espectro de emisión de un fluorocromo que se solapa con la de otro, la que es constante, por lo cual se puede calcular matemáticamente. Cada tipo de muestra debería tener una compensación diferente.

La posibilidad de medir miles de células de forma individualizada que ofrece la citometría de flujo nos permite identificar y cuantificar las células apoptóticas, así como estudiar los mecanismos asociados a este modo de muerte celular (99–101). El cambio en la dispersión de la luz fue uno de las primeras características que observamos en las células que mueren por apoptosis, y es el primer marcador que podemos utilizar para identificar células en apoptosis.

Mientras que la dispersión de luz hacia adelante informa del tamaño celular, la dispersión lateral de la luz hace referencia a las propiedades de reflexión y refracción de la célula. Los cambios en la dispersión de la luz hacia adelante son el resultado de la contracción celular, mientras que los cambios en la dispersión lateral reflejan la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. En las etapas posteriores de la apoptosis, cuando las células presentan ya los cuerpos apoptóticos y reducen aún más su tamaño, la dispersión de la luz hacia adelante y hacia el lateral está marcadamente disminuida. La virtud del ensayo basado en la medición de la dispersión de la luz es su simplicidad y la posibilidad de combinarlo con otros marcadores celulares. Cabe destacar, sin embargo, que la disminución de la señal de la dispersión de la luz hacia adelante no es un marcador específico de apoptosis ya que las células rotas, los núcleos celulares aisladas y las células necróticas también presentan los mismos cambios en la dispersión de luz. Este enfoque, por lo tanto, debe ir acompañado de otros ensayos más específicos de la apoptosis (102).

Un paso crítico en el proceso de apoptosis es la adquisición de cambios en la membrana celular. En las primeras etapas se produce una

translocación de los restos de fosfatidilserina (PS) de la membrana interna a la membrana externa, exponiendo de esta manera los restos PS al exterior. Basándose en el fenómeno de que la PS es expuesta durante la apoptosis y en la capacidad de la anexina V de unirse a PS con alta afinidad, Koopman et al (103) fueron los primeros en describir un método utilizando anexina V marcada con un hapteno extrínseco (FITC o biotina). La anexina V marcada con el hapteno en presencia de Ca^{2+} milimolar se une a los residuos de PS que están expuestos en la cara externa de la membrana plasmática de células apoptóticas tempranas. La anexina V no se une a células viables pues la molécula no es capaz de penetrar la bicapa lipídica. Para discriminar entre células apoptóticas tempranas, tardías y células necróticas, podemos marcar simultáneamente con una sonda vital que se una al DNA como Yoduro de Propidio (PI) o 7AAD. De esta forma, podemos diferenciar células viables (anexina V-7AAD-), apoptóticas tempranas (anexina V+7AAD-), apoptóticas tardías (anexina V+7AAD+) y células necróticas (anexina V-7AAD+) (104). La exposición de PS durante la apoptosis parece ser un fenómeno universal durante la apoptosis, no limitado a células de mamíferos, pues también ocurre en células de plantas e insectos. Por tanto, la exposición de PS parece ser tan ubicua como la apoptosis en sí misma y, probablemente, constituye una parte integral de este proceso de suicidio celular. Martín et al (105) han demostrado que la exposición de PS durante la apoptosis sucede en casi, si no todas las células bajo la acción de casi, si no todos, los estímulos desencadenantes de apoptosis.

2.JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Justificación del Estudio

Hasta hace tres décadas se creía que todas las respuestas inmunes específicas eran efectuadas por LT que expresaban el receptor de superficie TCR- $\alpha\beta$. En 1984 se descubrió un nuevo cDNA específico del LT que también codificaba una proteína similar a las inmunoglobulinas y cuyos genes se reordenaban en algunos de estos LT. Este cDNA codifica un polipéptido denominado γ , que se encuentra asociado a un segundo polipéptido denominado δ , conformando el TCR- $\gamma\delta$. Así pues, actualmente se conocen dos poblaciones distintas de LT dependiendo del tipo de receptor para antígeno que expresan en su membrana, los LT $\alpha\beta$ que expresan el receptor para antígeno TCR- $\alpha\beta$, y los LT $\gamma\delta$ que expresan el receptor para antígeno TCR- $\gamma\delta$. Los LT $\gamma\delta$ son mucho menos conocidos que los LT $\alpha\beta$, debido en parte a que su descubrimiento es relativamente reciente.

A partir de entonces, numerosos trabajos inmunológicos relacionados con los linfocitos, han tratado de diferenciar entre ambas subpoblaciones, con especial interés en los LT $\gamma\delta$ por sus funciones.

La mayoría de estos estudios han sido realizados en animales de experimentación, y algunos en humanos, en diferentes patologías, pero casi siempre con un número de sujetos reducido, tanto en pacientes enfermos como en sus respectivos controles sanos.

Hay dos motivos fundamentales que justifican el presente estudio. El primero es el conocimiento inmunológico básico de una posible diferencia en la apoptosis entre ambas subpoblaciones de $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$. El segundo, el hecho de que los estudios clínicos que involucran a los linfocitos según sus receptores TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ son escasos, pero van en aumento. Entre ellos la inmunodeficiencia congénita o adquirida es un objetivo del estudio, involucrando la apoptosis como mecanismo de aquella. Hasta el momento actual no se ha estudiado la apoptosis en sujetos sanos en número extenso de pacientes. Sería muy conveniente el conocimiento de la apoptosis en personas sanas como medio de control en las diferentes patologías estudiadas en un futuro.

2.2 Hipótesis

Debido a la diferencia descrita en cuanto a la acción inmunitaria de ambas subpoblaciones $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$ podríamos esperar una diferencia en cuanto a la apoptosis en particular.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo principal

Valorar la apoptosis de los $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$ en sujetos sanos, así como todas sus subpoblaciones: $LT\alpha\beta$, $LT\ CD4+\alpha\beta$, $LT\ CD3+CD8+\alpha\beta$, $LT\ CD56+\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$, $LT\ CD4+\gamma\delta$, $LT\ CD8+\gamma\delta$, $LT\ CD56+\gamma\delta$.

2.3.2 Objetivos secundarios

Analizar la apoptosis de estas subpoblaciones en relación a la edad y sexo.

Analizar la posible relación de la apoptosis con los estados funcionales de LT: naive, memoria central, memoria efectora y memoria efectora terminal que re-expresa CD45RA (TEMRA).

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Voluntarios

Los sujetos que han participado en el presente estudio se han seleccionado a partir de voluntarios del laboratorio y de acompañantes de enfermos ingresados en el hospital. Todos los donantes han firmado un Consentimiento Informado (ver anexo) en el que se explicaba de manera somera las características del estudio.

Para el objetivo secundario del trabajo, se obtuvieron muestras de diferentes voluntarios seleccionados del mismo modo, y que también firmaron el Consentimiento Informado.

El trabajo ha sido aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos e Investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, donde se ha llevado a cabo el trabajo experimental.

Durante el periodo de selección, todos los participantes tuvieron que rellenar una encuesta en la que se les interrogó por su estado de salud. De este modo, se excluyeron del estudio cualquier voluntario que presentara alguna de las siguientes características: inmunodeficiencia conocida, enfermedad autoinmune, predisposición genética conocida para alguna patología, proceso infeccioso actual, vacunas en los seis meses previos, tratamiento inmunosupresor actual, hábitos alcohólicos o tabaquismo y exposición a agentes tóxicos en el trabajo.

En la muestra analizada no hemos encontrado desviaciones respecto a sexo o edad.

Una vez seleccionado para el estudio, se obtuvo una muestra de sangre periférica por venopunción, en tubo con anticoagulante EDTA-K3. La muestra fue procesada lo más rápido posible, siempre dentro de las dos horas posteriores a su toma.

3.2 Aparatos utilizados

3.2.1 Contador celular

Tras la obtención de la muestra, y previo a cualquier procesado se realizó una hematimetría básica en un contador celular (LH750 Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA) para obtener los valores de hemoglobina, leucocitos y diferencial leucocitario y plaquetas. El autoanalizador LH750 se basa en el principio de impedancia: El principio de impedancia en el conteo de células sanguíneas se basa en el aumento de la resistencia producida cuando una célula sanguínea con baja conductividad pasa a través de un campo eléctrico. El número de intermitencias indica la cifra de células sanguíneas y la amplitud de cada intermitencia es proporcional al volumen de la célula.

3.2.2 Citómetros de flujo

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron dos citómetros de flujo:

- FC-500 (Beckman Coulter, Inc) que puede medir simultáneamente 5 fluorescencias usando un láser azul de 488nm, con filtros de paso de banda de 525nm, 575nm, 620nm, 695nm y 755nm: FITC, PE, ECD, PC5 y PECy7.

- Navios (Beckman Coulter, Inc) que puede medir simultáneamente 10 fluorescencias usando tres láseres: azul de 488nm, rojo de 638nm y violeta de 405nm, con filtros de paso de banda de 525nm, 575nm, 620nm, 695nm y 755nm para el láser azul (FITC, PE, ECD, PC5 y PECy7), 660nm, 725nm y 755nm para el láser rojo (APC o Alexa Fluor, APC Alexa Fluor700, APCCy7 y APC Alexa Fluor750) y filtros de 450nm y 550nm para el láser violeta (Pacific Blue, Pacific Orange y Krome Orange).

3.2.3 Otros aparatos y materiales utilizados

- Centrífuga refrigerada
- Micropipetas Gilson
- Tubos de polietileno (12x75mm) para preparación de muestras.

3.3 Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, anti-TCR $\alpha\beta$ y anti-TCR $\gamma\delta$.

CD45

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD45 (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: J33]). Las moléculas de CD45 son proteínas de la membrana de cadena simple y existen al menos 5 isoformas que varían entre 180 y 220 kDa. El CD45 no restringido, denominado antígeno leucocitario común consiste en una secuencia extracelular, proximal a la membrana que es común a todas las isoformas de CD45. El epítipo no restringido de CD45 está presente en la superficie de todos los leucocitos humanos: linfocitos, eosinófilos, monocitos, basófilos y neutrófilos en orden de expresión decreciente. CD45 es un componente principal en la membrana de los linfocitos. Está ausente en plaquetas y hematíes ya que se pierde en el proceso de maduración de la serie roja en la médula ósea.

CD3

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD3 (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: UCHT1]). El antígeno CD3 es un complejo de 5 cadenas polipeptídicas invariables, con pesos moleculares que oscilan entre 16 y 28 kDa. CD3 es parte de un complejo mayor que incluye al receptor de célula T (TCR). Este complejo se expresa en células T maduras y timocitos. La

activación de las células T se puede inducir cuando un antígeno extraño se presenta al TCR a través de las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

CD4

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD4 (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: SFCI12T4D11]). El antígeno CD4 es una glicoproteína transmembrana de cadena simple de peso molecular 59 kDa. CD4 se une a moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II y es correceptor en la activación inducida por antígenos con restricción MHC tipo II. CD4 se expresa en los LT colaboradores. También está presente en la mayoría de timocitos que frecuentemente coexpresan CD8. CD4 también se expresa en monocitos, aunque con una intensidad de expresión algo menor que la de los linfocitos. Los LT CD4⁺ inducen y ayudan activamente en la síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos B.

CD8

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD8 (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: B9.11]). El antígeno CD8 es un dímero disulfuro que existe como un homodímero CD8 α o bien como un heterodímero CD8 $\alpha\beta$. CD8 α se requiere para que exista expresión de superficie de CD8 β . El peso molecular de cada monómero α o β es entre 32 y 34 kDa. CD8 se une a un dominio no polimórfico de las moléculas de histocompatibilidad de tipo I. CD8 se expresa en un subgrupo de LT de sangre periférica, también se expresa en un grupo de linfocitos *Natural Killer* (NK) pero con una intensidad de expresión más débil que la de los LT. El homodímero CD8 α se expresa en

células NK y LT $\gamma\delta$. CD8 también está presente en la mayoría de timocitos que frecuentemente coexpresan CD4. La molécula CD8 actúa junto con el receptor de célula T (TCR) como un correceptor para el reconocimiento de antígenos por moléculas de histocompatibilidad tipo I. CD8 se emplea de forma habitual para el reconocimiento de LT citotóxicos.

CD56

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD56 (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: N901 (NKH-1)]). El antígeno CD56 es una isoforma de 140 kDa de la molécula de adhesión de célula Neural (N-CAM). Las diferentes isoformas de N-CAM tienen pesos moleculares entre 135 y 220 kDa. El antígeno CD56 se expresa moderadamente en una subpoblación de linfocitos grandes granulares de sangre periférica y en todas las células con actividad NK. También se expresa en un subgrupo de LT. CD 56 no se expresa en granulocitos, monocitos o células B.

CD19

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD19 (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: J3-119]). El antígeno CD19, también llamado B4, es una glicoproteína de membrana tipo I con un peso molecular de 95 kDa. CD 19 está implicado en el desarrollo, activación y diferenciación de los linfocitos B. Esta molécula se expresa en todos los linfocitos B normales incluyendo linfocitos pro-B, pero se pierde en la maduración a célula plasmática. También se encuentra en la superficie de células dendríticas foliculares. No se encuentra en LT normales, células NK, monocitos y granulocitos.

Receptor de la célula T pan $\gamma\delta$

Las subpoblaciones linfocitarias $\gamma\delta$ se analizaron con un anticuerpo monoclonal IgG1 murino anti-TCR $\gamma\delta$ humano conjugado con ficoeritrinacianina 5.1 (PC5) (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: IMMU 510]). Este anticuerpo permite la identificación y numeración de poblaciones celulares que expresan el antígeno TCR $\gamma\delta$ en muestras humanas mediante citometría de flujo. IMMU 510 reconoce todas las subpoblaciones $\gamma\delta$ independientemente de las regiones variables que expresen. Tiñe entre el 1,6% y el 8,9% de los LT de sangre periférica de muestras de donantes sanos.

Receptor de la célula T pan $\alpha\beta$

Las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ se analizaron mediante un anticuerpo monoclonal anti-TCR $\alpha\beta$ humano (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA [clon: IP26A]) conjugado con PC5. El anticuerpo IP26A reconoce un determinante monomórfico de la cadena $\alpha\beta$ del complejo TCR. Tiñe del 89,4% a 98,4% de las células CD3+ en sangre normal.

3.4 Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de los estados funcionales de los linfocitos.

La CMF permite realizar un análisis de los marcadores de superficie expresados diferencialmente durante la maduración, la activación y la diferenciación de los LT. Estos marcadores pueden ser considerados como un reflejo de la diferenciación celular, la activación y el estatus funcional. Los marcadores clásicos dividen a las células en LT CD4+ y CD8+. Actualmente, podemos clasificar a las células T en cuatro grupos principales usando a un número reducido de marcadores de superficie, que incluyen el motivo C-C de receptor de quimocinas (CCR-7) y el antígeno de superficie CD45. Los LT naïve inicialmente son CD45RA+, CCR7+, CD28+, CD62L+, CD27- y CD45RO- fenotipo que permite distinguirlos tanto de las células T de memoria central: CD45RA-, CCR7+, CD45RO+, CD62L+, CD27+ (CM), como de los LT de memoria periférica: CD45RA-, CCR7-, CD45RO+, CD27-/+ , CD62L- (EM). A su vez, los LT efectores, generalmente tienen un fenotipo CD45RA+, CD45RO- o + débil, CCR7-, CD28-, CD27- y CD62L- (TEMRA) (106).

Esta combinación de marcadores permite realizar un perfecto seguimiento de la renovación de las células naïve, así como la pérdida de ésta subpoblación durante el envejecimiento y las enfermedades infecciosas (107).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, anti-TCR $\alpha\beta$, anti-TCR $\gamma\delta$, CD62L y CD45RA.

CD45RA

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD45RA (Biolegend, San Diego, USA [clon: MPC-11]). Isoforma de 205 a 220 KDa de la glicoproteína tipo I CD45. Expresada en LT naïve, timocitos medulares, células B, monocitos y células TEMRA.

CD62L

Se empleó el anticuerpo monoclonal CD62L (Biolegend, San Diego, USA [clon: MOPC-21]). Glicoproteína tipo I de 74 a 95 KDa de cadena simple. Se trata de la L-Selectina, molécula de adhesión celular. Expresada en la mayoría de células B de sangre periférica. Subtipos celulares T y NK, monocitos y granulocitos.

3.5 Protocolos de CMF empleados

Para la correcta estandarización de los protocolos de citometría, debemos previamente tener en cuenta una serie de variables que serán fundamentales en el resultado final.

3.5.1 Protocolos de verificación del citómetro de flujo

A diario se realizó una verificación de los citómetros de flujo con una suspensión de microesferas fluorescentes que permiten una estandarización

del SS, FS y los láseres (Flow-check Pro Fluorospheres, Beckman Coulter, Inc.). Esta calibración se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante: dispensar aproximadamente 0,5 mL de reactivo de calibración en un tubo de polietileno (12x75mm). Agitar vigorosamente y adquirir por el protocolo de ajuste adecuado (fig. 3.1). Verificar en las curvas de Levey-Jennings generada que los coeficientes de variación entran en el rango adecuado (fig. 3.2).

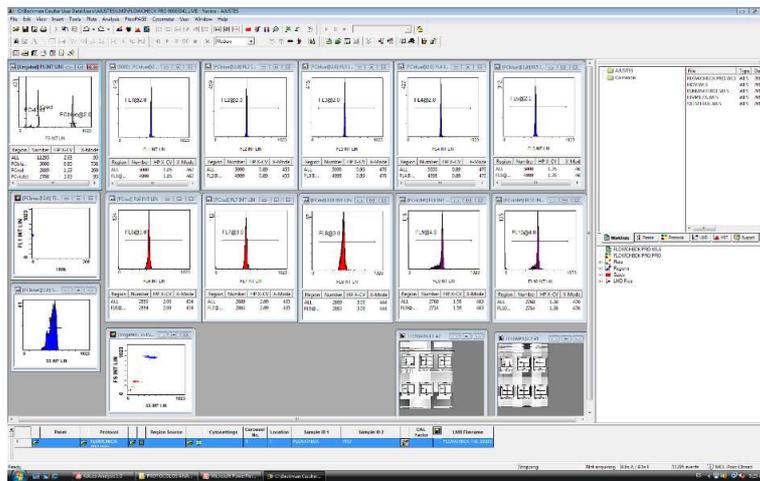


Fig. 3.1 Protocolo de adquisición de esferas de validación mostrando los picos de fluorescencia media.

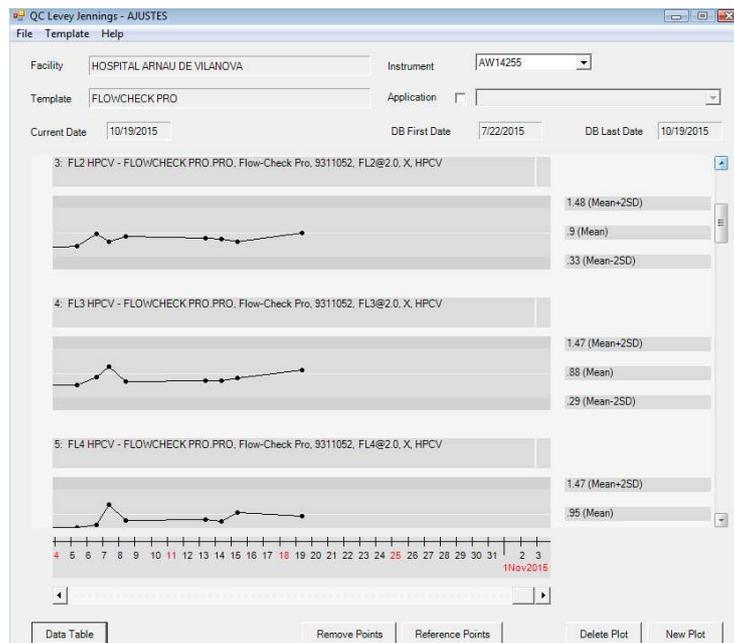


Fig. 3.2 Curvas de Levey-Jennings

3.5.2 Compensación de las fluorescencias.

Para realizar la compensación de las fluorescencias, empezamos realizando un ajuste de los parámetros FS y SS con una muestra de sangre periférica sin marcar. Esta muestra nos permite ajustar los voltajes, dejando las poblaciones negativas en la primera década logarítmica con una intensidad media de fluorescencia de 0,2 (ajustada de manera arbitraria). A continuación, realizamos un marcaje de la sangre periférica con los anticuerpos conjugados con los fluorocromos por separado. Como todos los marcadores utilizados tienen expresión en una sangre periférica de un donante sano, pudimos utilizar

esta sangre en lugar de células de captura. Adquirimos 20.000 eventos totales a velocidad media, con los voltajes establecidos previamente. Con los datos recogidos por cada adquisición se realizó una compensación automática por el software de análisis Kaluza (Beckman Coulter, Inc). Por último, trasladamos la matriz de compensación obtenida al protocolo de adquisición que tenía guardados los voltajes iniciales. En la tabla 3.1 podemos observar la matriz de compensación obtenida para el análisis a 10 colores.

Spillover (%)										
	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
FL1		1.30	0.20	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
FL2	36.81		13.82	0.00	1.20	0.00	0.00	0.00	0.00	5.60
FL3	10.40	32.00		0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	8.30
FL4	2.40	26.60	43.95		0.10	0.10	0.30	0.00	0.00	3.70
FL5	0.50	0.00	4.80	32.50		0.00	0.20	1.80	0.00	0.90
FL6	0.70	0.30	0.40	17.40	0.20		0.80	15.74	0.00	0.00
FL7	0.50	0.00	0.10	46.30	0.70	25.90		15.75	0.00	0.00
FL8	0.20	0.00	0.60	8.80	8.00	2.80	13.40		0.10	0.00
FL9	1.00	0.20	0.00	0.20	0.50	0.00	0.10	0.20		25.80
FL10	1.00	1.00	0.00	0.30	1.10	0.00	0.10	0.30	13.70	

Tabla 3.1. Matriz de compensación.

3.5.3 Controles isotópicos (negativos).

Las adquisiciones de los 20 primeros casos analizados, se realizaron marcando la muestra de sangre periférica con controles isotópicos, que nos permitió comprobar que carecíamos de marcajes inespecíficos para cada una de las poblaciones de interés.

3.5.4 Protocolos de marcaje.

El marcaje tiene su principio en la capacidad de los anticuerpos monoclonales específicos de unirse a células leucocitarias mediante los determinantes antigénicos que éstas expresan en la membrana celular (o incluso intracitoplasmáticamente).

Se realiza incubando la muestra con el anticuerpo monoclonal. Los eritrocitos son eliminados a continuación por lisis, y los leucocitos son analizados por CMF. Seleccionamos la población de interés dentro de una ventana electrónica, definida en un histograma que correlaciona los parámetros que deseamos estudiar.

A continuación, se detallan los protocolos de marcaje en los diferentes paneles empleados en el estudio.

3.5.4.1 Protocolo para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias y linfocitos $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

1. Por cada muestra a analizar, rotulamos 5 tubos de polietileno (12x75mm). Añadimos el volumen de anticuerpo de interés a cada tubo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En nuestro caso, 20 μL de los anticuerpos conjugados con FITC y PE y 10 μL de los anticuerpos conjugados con ECD, PC5 y PE-Cy7. Dispensamos 10 μL de los controles isotípicos a los tubos control.

2. Añadimos 100 μ L de la muestra de análisis a todos los tubos. Agitamos suavemente los tubos con *vórtex*.
3. Incubamos de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente (18 – 25°C) y en un lugar protegido de la luz.
4. A continuación, realizamos la lisis de los hematíes según las recomendaciones del reactivo de lisis utilizado. Para nuestro trabajo hemos utilizado el agente lisante VersaLyse (Beckman Coulter, Inc), que consiste en una amina que es convertida en un agente lítico por la anhidrasa carbónica de la membrana de los glóbulos rojos. Al agente lisante, se le adicionaron 25 μ L de un agente fijador (IOT3 Fixative solution, Beckman Coulter, Inc) que proporciona estabilidad. La mezcla “Fix-and-Lyse” preparada en el momento, es adicionada a la sangre. Mezclamos seguidamente en el agitador automático durante un segundo e incubamos 15 minutos a temperatura ambiente y en un lugar protegido de la luz.
5. Centrifugamos 5 minutos a 150 x g y a temperatura ambiente.
6. Eliminamos el sobrenadante por aspiración.
7. Resuspendemos el botón celular en 3 mL de PBS.
8. Repetimos los pasos 5 y 6.
9. Eliminamos el sobrenadante por aspiración y resuspendemos el botón celular en 0,5 mL de PBS. Analizamos en el citómetro de flujo. En todos los casos se adquirieron 100.000 eventos.

La combinación de anticuerpos monoclonales con sus respectivos fluorocromos conjugados fue desarrollada en el Laboratorio de Hematología

del Hospital Arnau de Vilanova durante la puesta a punto de la determinación de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en individuos sanos (64). En la tabla 3.2 podemos ver el panel de anticuerpos utilizado en el presente trabajo.

	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
Tubo 1	CD8	Anti TCR- $\alpha\beta$	CD45	CD3	CD4
Tubo 2	CD8	Anti TCR- $\gamma\delta$	CD45	CD3	CD4
Tubo 3	CD5	CD56	CD45	CD3	CD19
Tubo 4	Anti TCR- $\gamma\delta$	Anti TCR- $\alpha\beta$	CD45	CD3	CD56

Tabla 3.2 Monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones.

3.5.4.2 Protocolo para la determinación de la apoptosis en las subpoblaciones linfocitarias y linfocitos $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

La cuantificación de la apoptosis se ha realizado con el kit comercial ANNEXIN V-FITC / 7-AAD Kit (Beckman Coulter, Inc), en el cual la anexina-V está conjugada con FITC. Se llevó a cabo cuantificando los residuos de fosfatidilserina expuestos en la parte exterior de la membrana

celular mediante el marcaje con anexina V- FITC siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras el enriquecimiento de la muestra en linfocitos mediante separación de células por gradiente de densidad (ver apartado 3.6) se resuspendieron las células obtenidas en tampón de unión (con presencia de Ca^{+2}) a 4°C. Se mantuvieron las muestras en hielo hasta el momento de su uso.

A continuación, se realizó el marcaje de las muestras:

1. Por cada muestra a analizar, rotulamos 7 tubos de polietileno (12x75mm). Añadimos el volumen de anticuerpo de interés a cada tubo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En nuestro caso, 10 μL de la Anexina-V y 20 μL del marcador de viabilidad 7-AAD y 10 μL del resto de anticuerpos.
2. Añadimos 100 μL de la muestra de análisis a todos los tubos. Agitamos suavemente los tubos con vórtex.
3. Incubamos de 30 minutos a 4°C protegiendo de la luz.
4. Añadimos 400 μL del tampón de unión y adquirimos inmediatamente por el citómetro de flujo. En todos los tubos se adquirieron un total de 100.000 eventos.

La combinación de anticuerpos monoclonales con sus respectivos fluorocromos conjugados fue desarrollada en el Laboratorio de Hematología del Hospital Arnau de Vilanova, siguiendo las pautas que habían marcado los estudios anteriores, adicionando los marcadores para estudiar la apoptosis.

El panel de estudio para el análisis de la apoptosis de las subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$ se recoge en la tabla 3.3.

	FITC	PE	ECD	PCy5	PECy7
Tubo 1	Anexina-V	Anti TCR- $\alpha\beta$	CD3	7AAD	CD4
Tubo 2	Anexina-V	Anti TCR- $\alpha\beta$	CD3	7AAD	CD8
Tubo 3	Anexina-V	Anti TCR- $\gamma\delta$	CD3	7AAD	CD4
Tubo 4	Anexina-V	Anti TCR- $\gamma\delta$	CD3	7AAD	CD8
Tubo 5	Anexina-V	Anti TCR- $\gamma\delta$	CD3	7AAD	CD4+8
Tubo 6	Anexina-V	Anti TCR- $\alpha\beta$	CD3	7AAD	CD56
Tubo 7	Anexina-V	Anti TCR- $\gamma\delta$	CD3	7AAD	CD56

Tabla 3.3 Monoclonales empleados en el análisis de la apoptosis.

3.5.4.3 Protocolo para la determinación de los estados funcionales de las subpoblaciones linfocitarias y linfocitos $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

El panel de estudio para el análisis de los estados funcionales de los linfocitos fue diseñado intentando minimizar al máximo las interferencias entre las diferentes poblaciones, para evitar enmascarar las poblaciones menos representadas. De este modo, se seleccionaron dos marcadores excluyentes y el “padre” de ambos para el láser rojo. El marcador CD45 que presenta una fuerte intensidad de señal se alejó lo máximo del resto de marcadores. Para el marcaje de $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ se utilizó la fluorescencia PE que conocíamos que presentaba una intensidad de señal adecuada. El panel de marcaje final lo podemos ver en la tabla 3.4.

	FITC	PE	PE/Dz594	PC5.5	PC7	APC	Alexa Fluor 700	APC Cy7	Pacific Blue	Brilliant Violet 570
1	An.V	$\alpha\beta$	CD45 RA	7AA D	CD 56	CD8	CD4	CD3	CD62L	CD45
2	An.V	$\gamma\delta$	CD45 RA	7AA D	CD 56	CD8	CD4	CD3	CD62L	CD45

Tabla 3.4: Monoclonales utilizados en el análisis de los estados funcionales.

3.5.5 Determinación de la positividad para la anexina-V mediante peróxido de hidrógeno.

Para determinar el punto de corte donde comienza la positividad de la anexina V, se realizó una inducción de la apoptosis a una muestra de sangre periférica que se había enriquecido en linfocitos por el proceso de separación por gradiente de densidad. Se indujo la apoptosis tratando a los linfocitos con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (25 mM, 50mM y 500 mM) durante 15 minutos. Las figuras 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7 muestran el aumento en el porcentaje de células positivas para anexina V (células que expresan en la membrana residuos de fosfatidilserina, por estar en apoptosis) según aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno en el experimento.

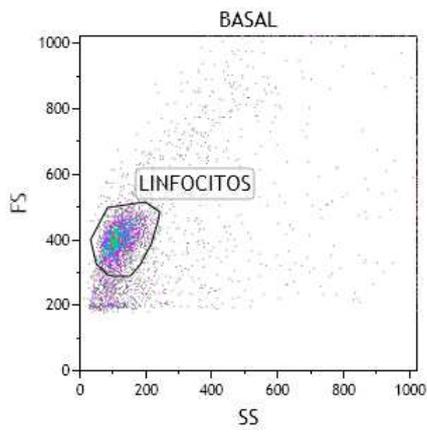


Fig. 3.3 FS/SS de la muestra.

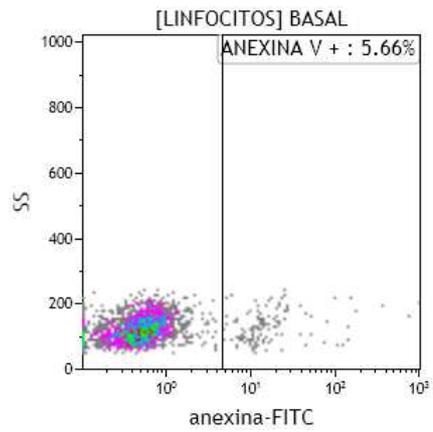


Fig. 3.4 % de células anex.V + basal

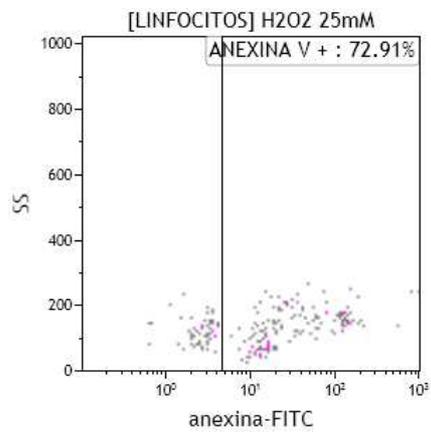
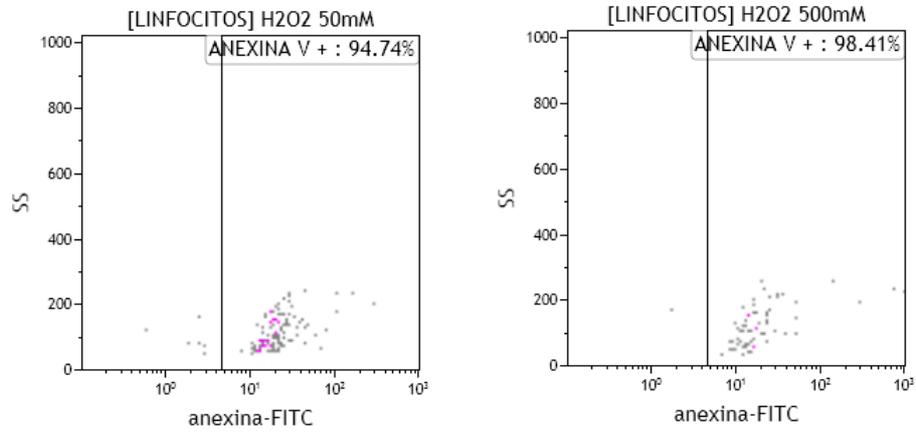


Fig.3.5. % de células anex. V positivas a una concentración 25 mM de peróxido de hidrógeno.



Figs. 3.6 (izda.) y 3.7 (dcha.) % de células anex. V positivas a una concentración 50 mM y 500 mM de peróxido de hidrógeno respectivamente.

3.6 Separación por gradiente de densidad

La separación por gradiente de densidad es una técnica para separar células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de otras células de la sangre.

Para el proceso hemos utilizado el reactivo Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Durante la centrifugación (400 g durante 25 minutos) se forman capas, donde el sedimento está formado por células polimorfonucleares y glóbulos rojos que han migrado a través de la gradiente de densidad. Por encima estaría otra capa correspondiente al Ficoll-Paque que es menos denso, y encima estaría otra capa fina opalescente que serían las CMSP, finalmente sobre esa capa estaría las plaquetas y el plasma que se pueden eliminar en los siguientes lavados (fig. 3.8).

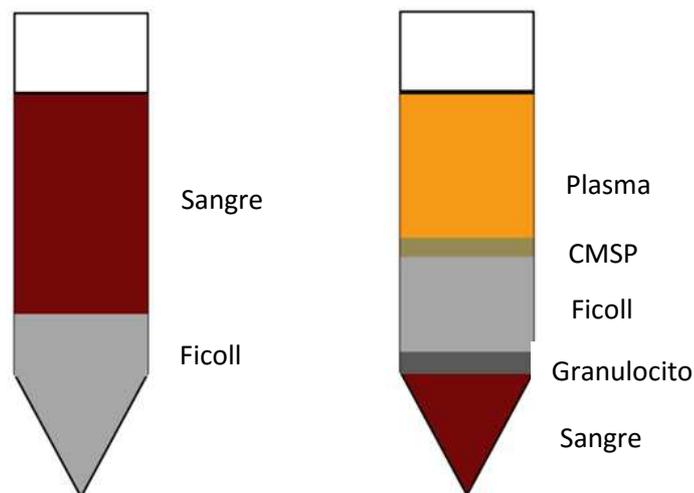


Fig. 3.8. Representación de un gradiente de ficoll-paque. Adaptado de Zhonghua Lin y col (108).

3.7 Análisis estadísticos

Para la realización del mismo se emplea el programa SPSS versión 17. Los estadísticos descriptivos se expresan como frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas y como medias, mediana, desviación típica, mínimo y máximo las variables continuas.

Se comprueba la asunción de distribución normal para las variables continuas mediante pruebas gráficas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors. Cuando se asume normalidad se utiliza la prueba t de Student para comparar las medias de las variables cuantitativas. En caso de no aceptarse la hipótesis de normalidad de la variable cuantitativa se utiliza la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

3.8 Variables del estudio

3.8.1 Variables hematológicas

Se ha determinado la cifra de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, hemoglobina y plaquetas.

3.8.2 Variables inmunofenotípicas

A continuación, se detallan las variables fenotípicas estudiadas para cada población celular.

- CD45+ (%): Antígeno panleucocitario que permite cuantificar el porcentaje de linfocitos presentes en la muestra.
- CD3+ (%): Esta variable cuantifica el porcentaje de células CD3 positivas (LT) sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+CD8- (%): Porcentaje de LT CD4 positivos, y negativos para el CD8 sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4-CD8+ (%): Porcentaje de LT CD8 positivos y negativos para el CD4 sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\alpha\beta$ (%): Porcentaje de LT $\alpha\beta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\gamma\delta$ (%): Porcentaje de LT $\gamma\delta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\alpha\beta$ (%): Porcentaje de LT positivos para el CD4 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\alpha\beta$ (%): Porcentaje de LT positivos para el CD8 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\gamma\delta$ (%): Porcentaje de LT positivos para el CD4 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\gamma\delta$ (%): Porcentaje de LT positivos para el CD8 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.

- CD3+CD56+ $\alpha\beta$ (%): Porcentaje de LT positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\gamma\delta$ (%): Porcentaje de LT positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve $\alpha\beta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve $\gamma\delta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3/CD4+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve positivos para el CD4 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve positivos para el CD8 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve positivos para el CD4 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve positivos para el CD8 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.

- CD3+CD56+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L+ (%): Porcentaje de LT naïve positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central $\alpha\beta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central $\gamma\delta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central positivos para el CD4 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central positivos para el CD8 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central positivos para el CD4 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central positivos para el CD8 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L+ (%): Porcentaje de LT de memoria central positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.

- CD3+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica $\alpha\beta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica $\gamma\delta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica positivos para el CD4 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica positivos para el CD8 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica positivos para el CD4 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica positivos para el CD8 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\gamma\delta$ +CD45RA-CD62L- (%): Porcentaje de LT de memoria periférica positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA $\alpha\beta$ positivos sobre la población linfoide total.

- CD3+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA $\gamma\delta$ positivos sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA positivos para el CD4 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA positivos para el CD8 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD4+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA positivos para el CD4 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD8+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA positivos para el CD8 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
- CD3+CD56+ $\gamma\delta$ +CD45RA+CD62L- (%): Porcentaje de LT TEMRA positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Valores demográficos

Para el análisis de la apoptosis en las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ se incluyeron un total de 74 voluntarios adultos sanos entre los años 2014 y 2015. La edad media de los participantes fue de $50,34 \pm 17,5$ años, con un mínimo de 16 y un máximo de 90 y la distribución por sexos fue de 44 (59,5%) mujeres y 30 (40,5%) varones. Se distribuyeron a los voluntarios en tres grupos de edad, jóvenes (<30, n=11), adultos (31-60, n=41) y adultos mayores (>61, n=22) (Fig. 4.1 y 4.2).

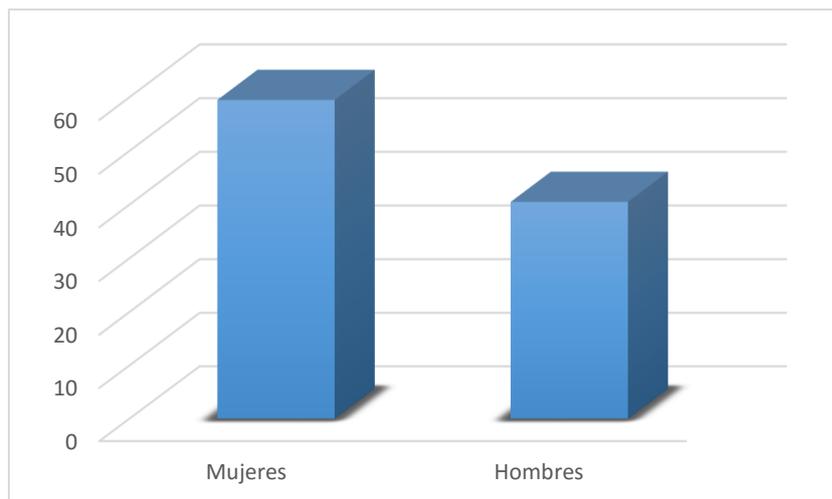


Fig. 4.1 Distribución por sexos de los voluntarios.

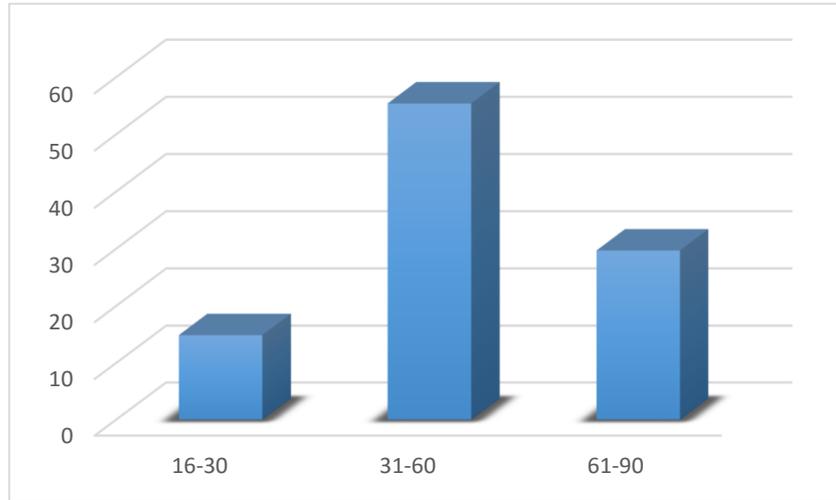


Fig. 4.2 Distribución por edades de los voluntarios.

Los valores medios obtenidos en el hemograma se recogen en la tabla

4.1:

Tabla 4.1. Hematimetría media		
	Media	D.E.
Leucocitos	6,8	1,9
Neutrófilos	4,2	1,7
Linfocitos	1,9	0,6
Monocitos	0,5	0,2
Eosinófilos	0,2	0,1
Basófilos	0,0	0,0
Plaquetas	224	51

4.2 Subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y su apoptosis

Para determinar las poblaciones de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ se siguió un modelo de selección secuencial a partir de la población linfoide adquirida en el histograma CD45/SS, habiendo eliminado previamente los posibles dobletes a partir del histograma TOF/FS, que relaciona el tiempo que tarda en pasar una célula por el punto de interrogación del citómetro con el tamaño celular, de modo que podemos discriminar las células que pasan unidas y serían falsos positivos. La secuencia de figuras que sigue, muestra la estrategia seguida para calcular los porcentajes de cada subpoblación analizada.

La fig. 4.3 muestra el histograma TOF/FS y la región seleccionada que sirvió para el análisis, eliminando la posibilidad de dobletes.

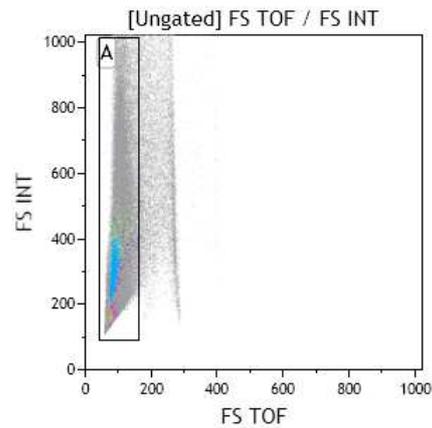


Fig. 4.3. Representación de la región seleccionada que elimina la presencia de dobletes.

La fig. 4.4 muestra el histograma SS/FS, para comprobar que la población ha sido lisada correctamente.

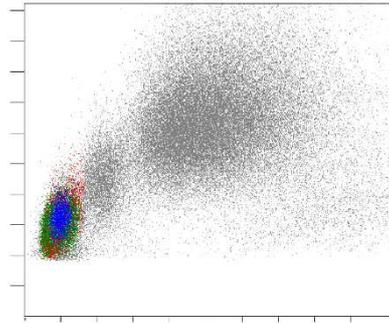


Fig. 4.4 FS/SS

La fig. 4.5 muestra el histograma CD45 frente al SS a partir de las células seleccionadas en el histograma anterior (TOF/SS). La región marcada con menor SS y mayor intensidad de fluorescencia se corresponde con los linfocitos. El resto de poblaciones linfocitarias analizadas, las definimos a partir de esta región. La fig. 4.6 muestra el histograma CD3/anti-TCR $\alpha\beta$, donde pudimos seleccionar la primera variable de nuestro análisis: CD3+/ $\alpha\beta$ +, mientras que la fig. 4.7 muestra el histograma CD3/anti-TCR $\gamma\delta$, de donde seleccionamos la población CD3+/ $\gamma\delta$ +

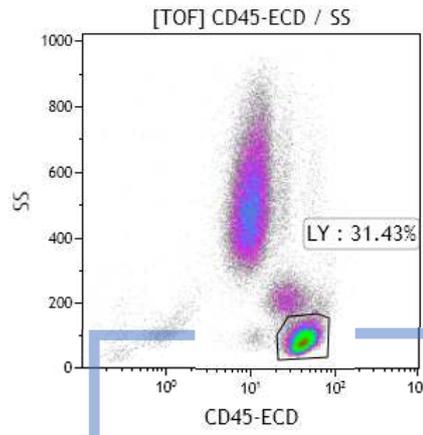


Fig. 4.5 CD45+/SS

Fig. 4.6 LT TCR- $\alpha\beta$ +

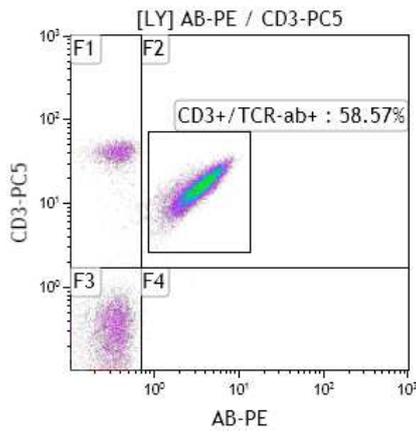
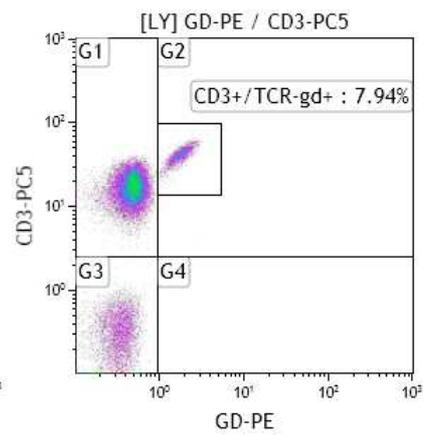


Fig. 4.7 LT TCR- $\gamma\delta$ +



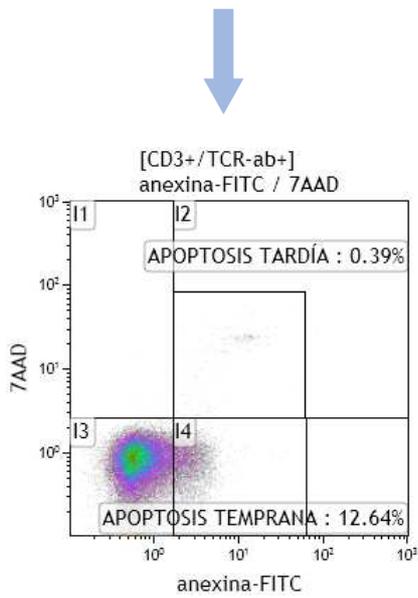


Fig. 4.8 Apoptosis LT $\alpha\beta$

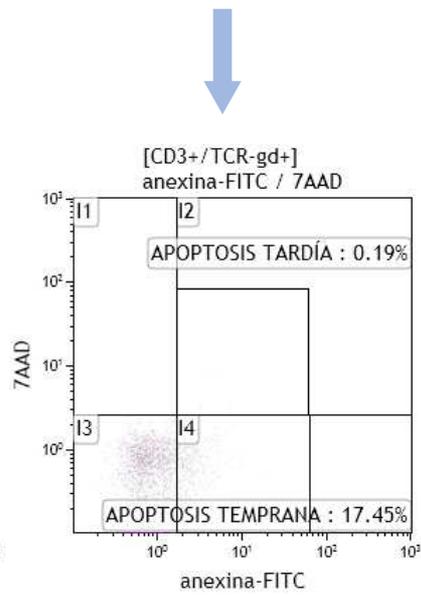


Fig. 4.9 Apoptosis LT $\gamma\delta$

La fig. 4.8 y 4.9 muestran el histograma Anexina V/ IP, reflejando el porcentaje de células en apoptosis de la población CD3+ $\alpha\beta$ y CD3+ $\gamma\delta$ obtenidas en las selecciones anteriores.

El análisis de los porcentajes obtenidos para las poblaciones CD3+ $\alpha\beta$ y CD3+ $\gamma\delta$ muestra un aumento de los linfocitos $\alpha\beta$ respecto a $\gamma\delta$ (en azul) en sangre periférica como se demuestra en otros estudios ya mencionados (Fig. 4.10). En rojo, se representa el porcentaje de células que se encuentran en apoptosis para las poblaciones de LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$. Como podemos observar,

existe un aumento del porcentaje de apoptosis en las poblaciones menos representadas en sangre periférica (LT $\gamma\delta$).

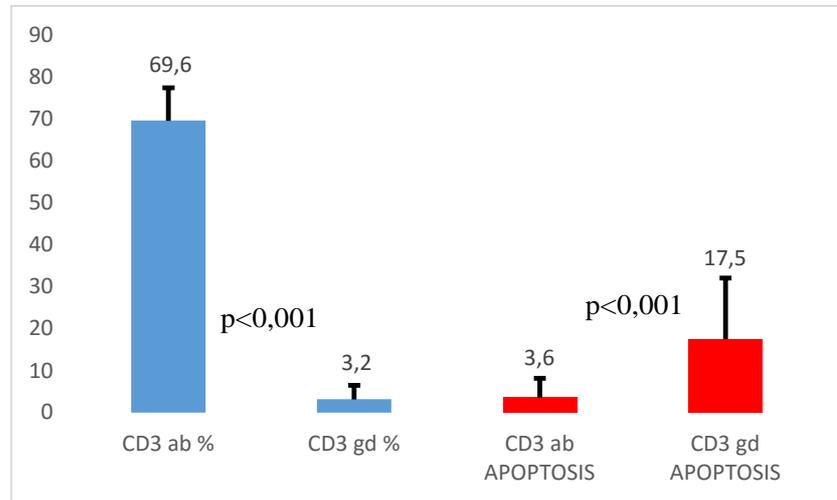


Fig. 4.10 CD3+ $\alpha\beta$ vs CD3+ $\gamma\delta$

Este aumento, en mayor o menor medida ocurre en todas las subpoblaciones estudiadas: CD3+ $\alpha\beta$, CD3+CD4+ $\alpha\beta$, CD3+CD8+ $\alpha\beta$ y CD3+CD56+ $\alpha\beta$.

La fig. 4.11 muestra el histograma CD4/CD8 con la distribución de los LT $\alpha\beta$ seleccionados en los histogramas anteriores, y marcadas las regiones donde se seleccionaron las nuevas poblaciones de análisis. La fig. 4.12 muestra los histogramas Anexina V/ IP, reflejando el porcentaje de células en apoptosis de cada población.

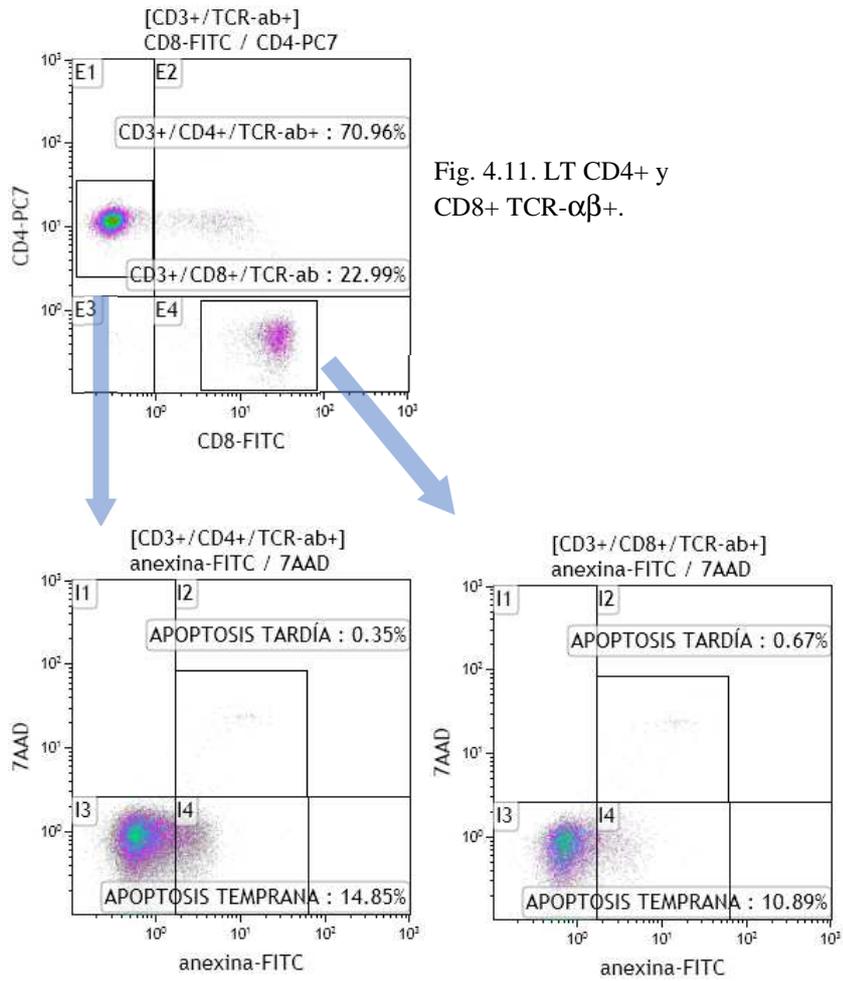


Fig. 4.11. LT CD4+ y CD8+ TCR- $\alpha\beta$ +

Fig. 4.12. Apoptosis LT CD4+ $\alpha\beta$ (izda.) y LT CD8+ $\alpha\beta$ (dcha.)

La fig. 4.13 muestra el histograma CD4/CD8 con la distribución de los LT $\gamma\delta$ seleccionados en los histogramas anteriores, y marcadas las regiones donde se seleccionaron las nuevas poblaciones de análisis. También se muestran los histogramas Anexina V/ IP, reflejando el porcentaje de células en apoptosis de cada población.

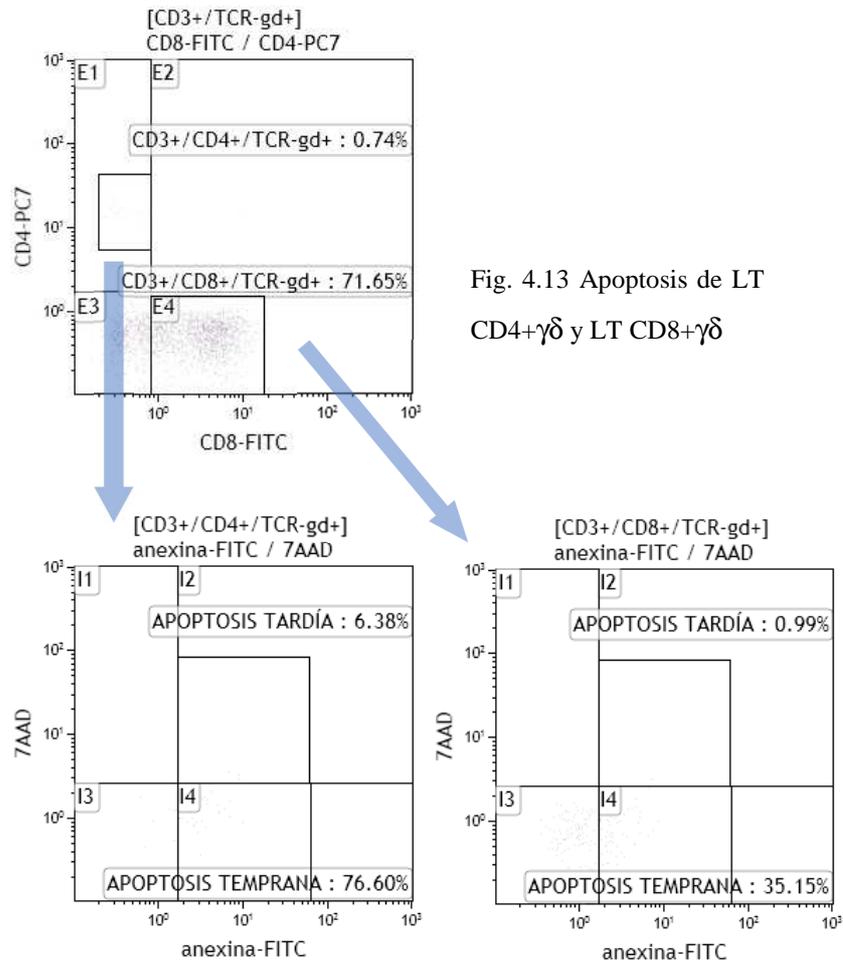


Fig. 4.13 Apoptosis de LT CD4+ $\gamma\delta$ y LT CD8+ $\gamma\delta$

La fig. 4.14 muestra los porcentajes de LT CD4+ $\alpha\beta$ y CD4+ $\gamma\delta$ y LT CD8+ $\alpha\beta$ y CD8+ $\gamma\delta$.

Por el contrario, al igual que veíamos en la población CD3+ $\alpha\beta$ y CD3+ $\gamma\delta$, la apoptosis en sangre periférica es significativamente mayor en los $\gamma\delta$ respecto a los $\alpha\beta$ (en rojo).

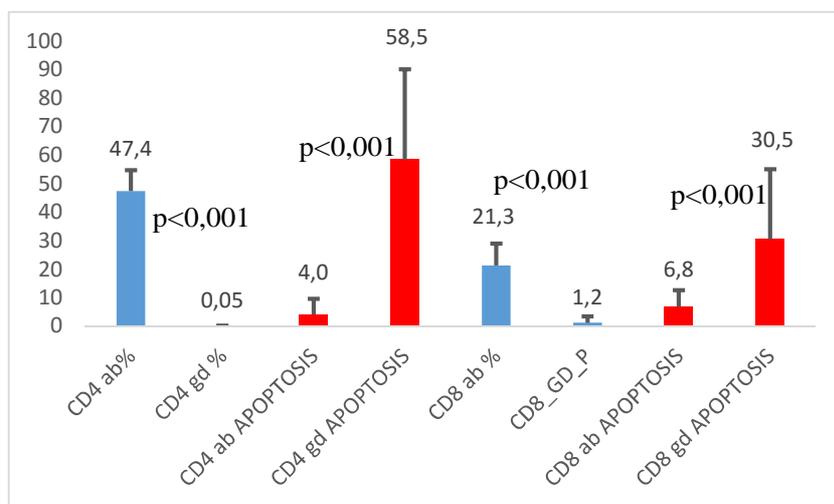


Fig. 4.14 CD3+CD4+ $\alpha\beta$ vs CD3+CD4+ $\gamma\delta$ y CD3+CD8+ $\alpha\beta$ vs CD3+CD8+ $\gamma\delta$

Por último, ocurre un fenómeno similar si analizamos las poblaciones CD3+CD56 $\alpha\beta$ y CD3+CD56+ $\gamma\delta$. La fig. 4.15 muestra los histogramas de LT CD56+ $\alpha\beta$ y LT CD56+ $\gamma\delta$ y marcadas las regiones donde se seleccionaron estas poblaciones. Las fig. 4.16 y 4.17 muestran los histogramas Anexina V/IP, reflejando el porcentaje de células en apoptosis de cada población.

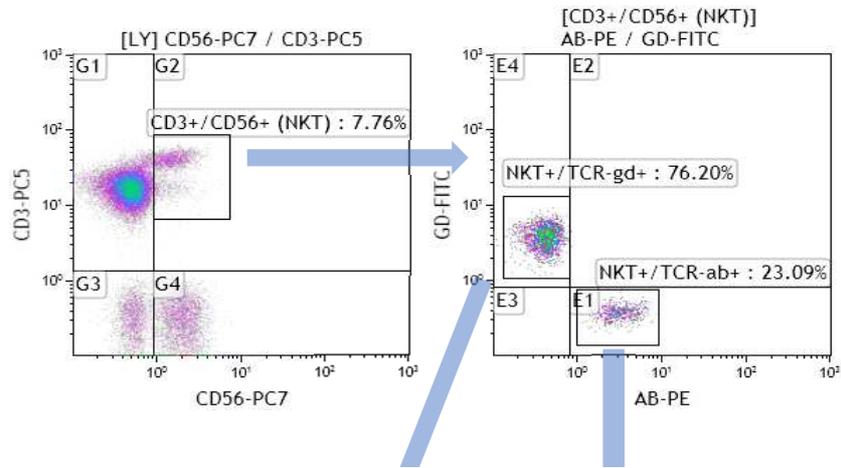


Fig. 4.15 LT CD56+ (Izquierda) y LT CD56+ $\alpha\beta$ + y LT CD56+ $\gamma\delta$ + (Derecha).

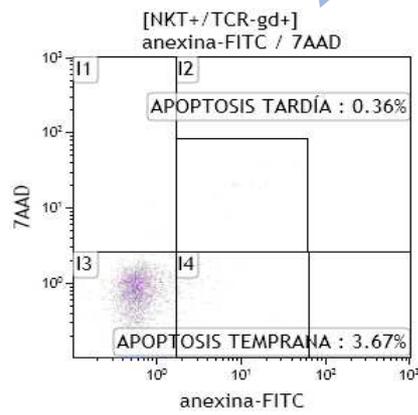


Fig. 4.16 Apoptosis LT CD56+ $\gamma\delta$

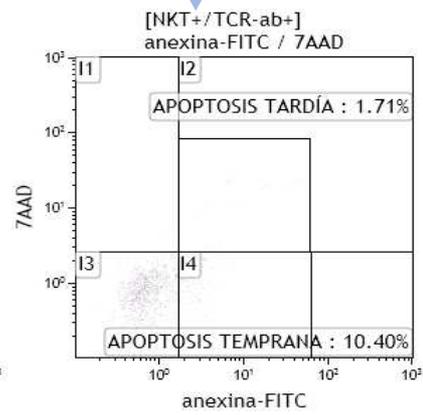


Fig. 4.17 Apoptosis LT CD56+ $\alpha\beta$

La fig. 4.18 muestra los porcentajes de LT CD56+ $\alpha\beta$ y CD56+ $\gamma\delta$ y el porcentaje de apoptosis correspondiente.

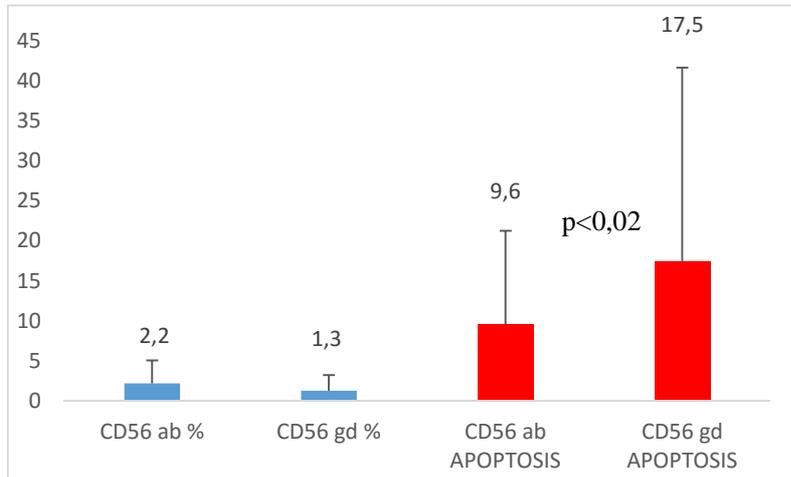


Fig. 4.18 CD3+CD56+ $\alpha\beta$ vs CD3+CD56+ $\gamma\delta$

4.3 Estados funcionales de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y su apoptosis

Para realizar el estudio del porcentaje de los estados funcionales de cada subpoblación y su respectiva apoptosis, la estrategia de análisis seguida fue la misma descrita hasta el momento.

Partiendo del histograma TOF/FS se seleccionan aquellas células que no son dobletes, y se aplica esta región al histograma CD45/SS. Partiendo de la región delimitada para los linfocitos, se obtienen todo el resto de

poblaciones. Las fig. siguientes muestran ejemplos de la estrategia de gateo secuencial aplicada para obtener los estados funcionales.

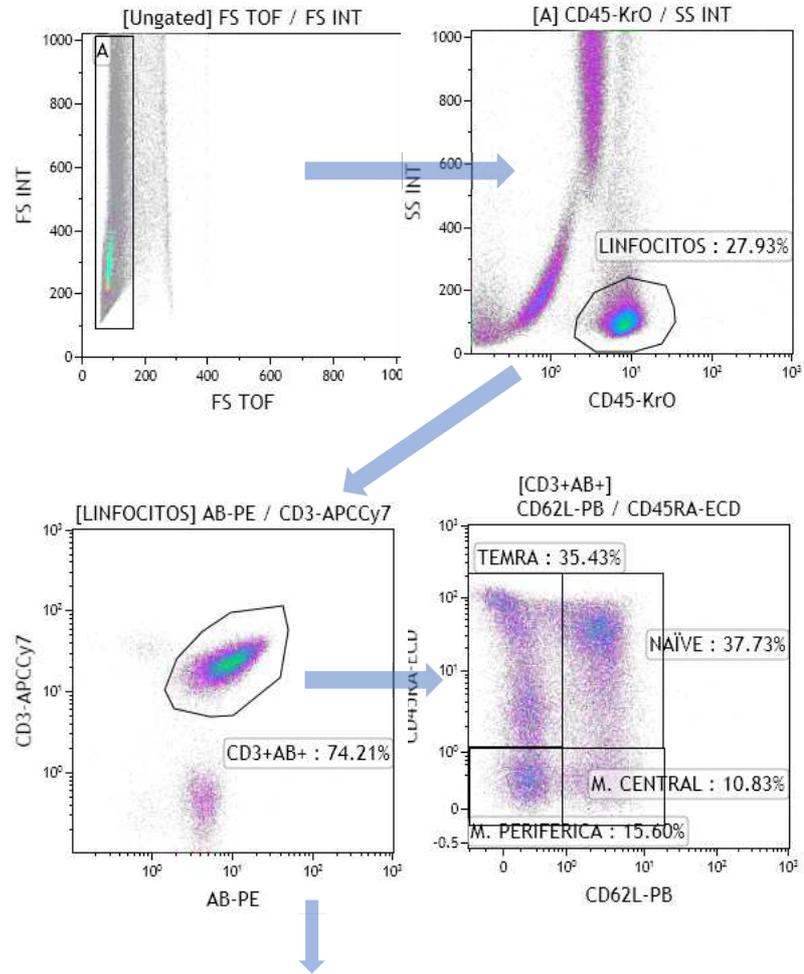


Fig. 4.19. Secuencia de gateo para la población CD3+αβ

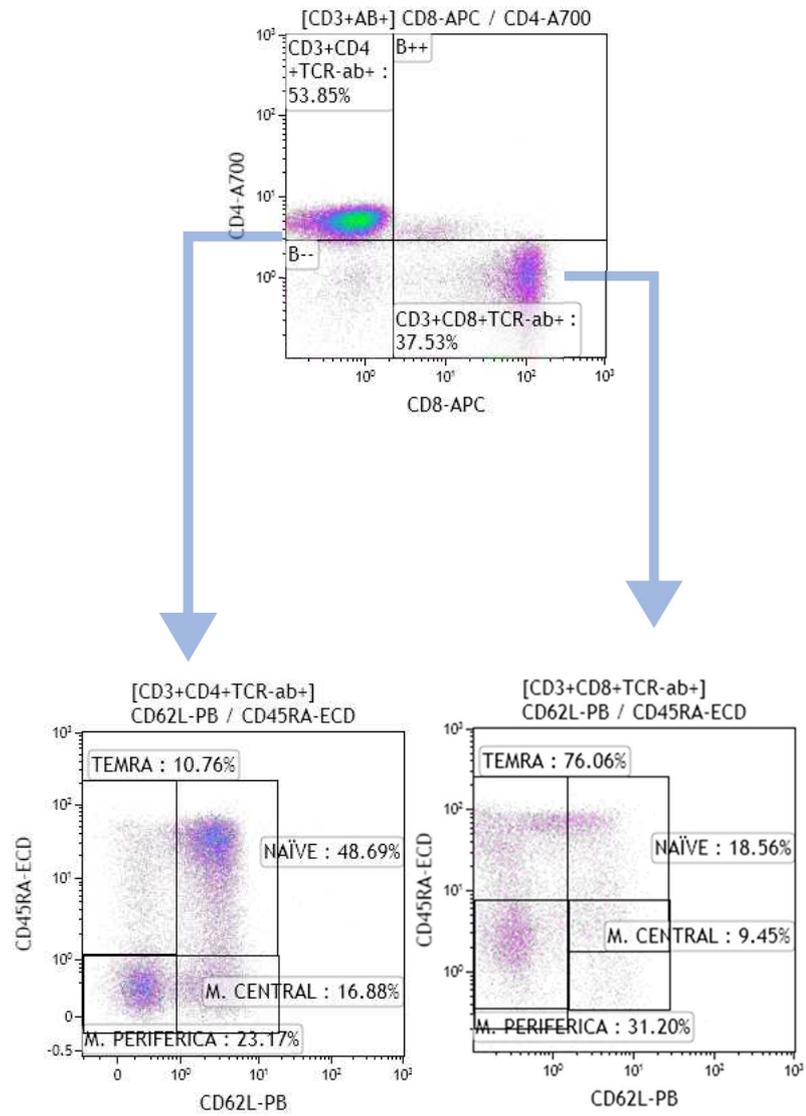
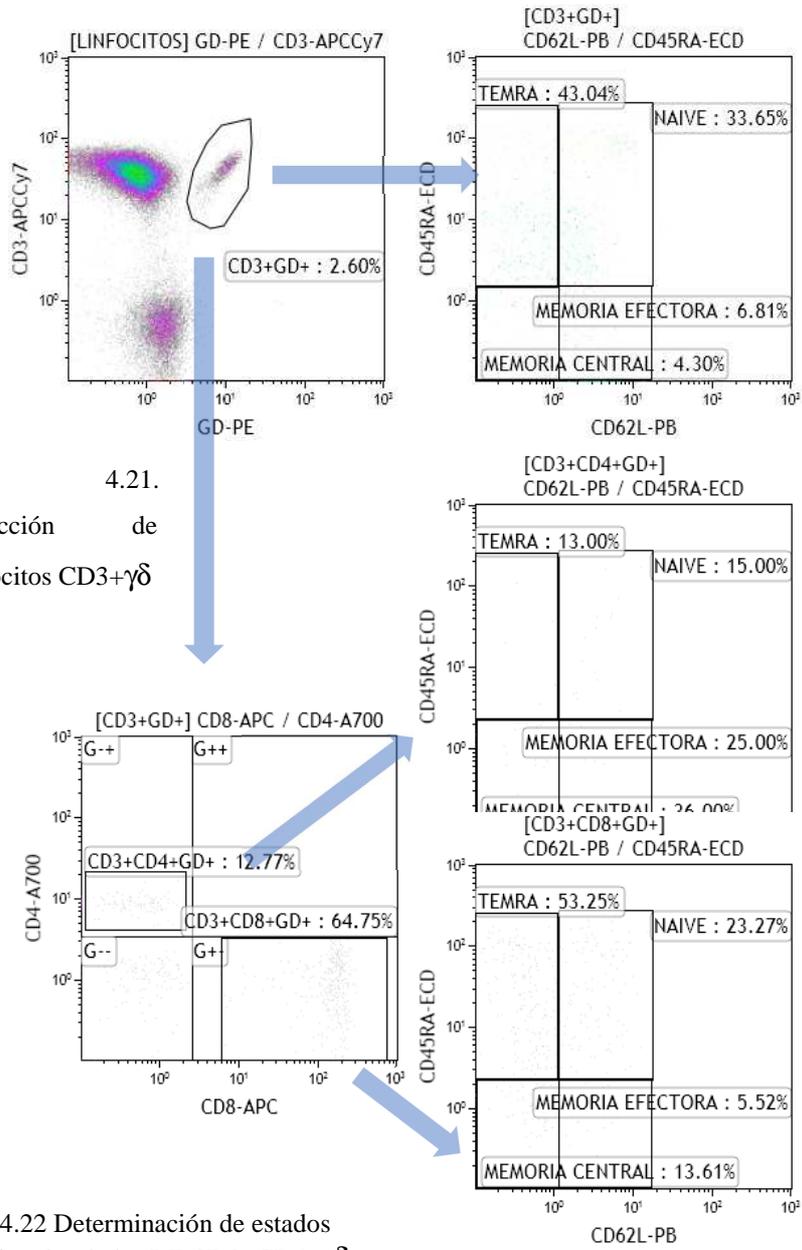


Fig. 4.20. Secuencia de gateo para la población CD3+CD4+ $\alpha\beta$ y CD3+CD8+ $\alpha\beta$



LT CD3+ $\alpha\beta$ y LT CD3+ $\gamma\delta$

Observamos un aumento de los linfocitos CD3+ $\alpha\beta$ en estado naïve respecto de los $\gamma\delta$, que por el contrario presentan un aumento respecto de los $\alpha\beta$ en estado efector terminal (TEMRA).

Respecto al porcentaje de apoptosis, podemos ver como en los diferentes estados funcionales, la apoptosis está elevada en los linfocitos CD3+ $\gamma\delta$ respecto de los $\alpha\beta$ (fig. 4.23).

Estas diferencias han sido estadísticamente significativas para todas las parejas de poblaciones analizadas.

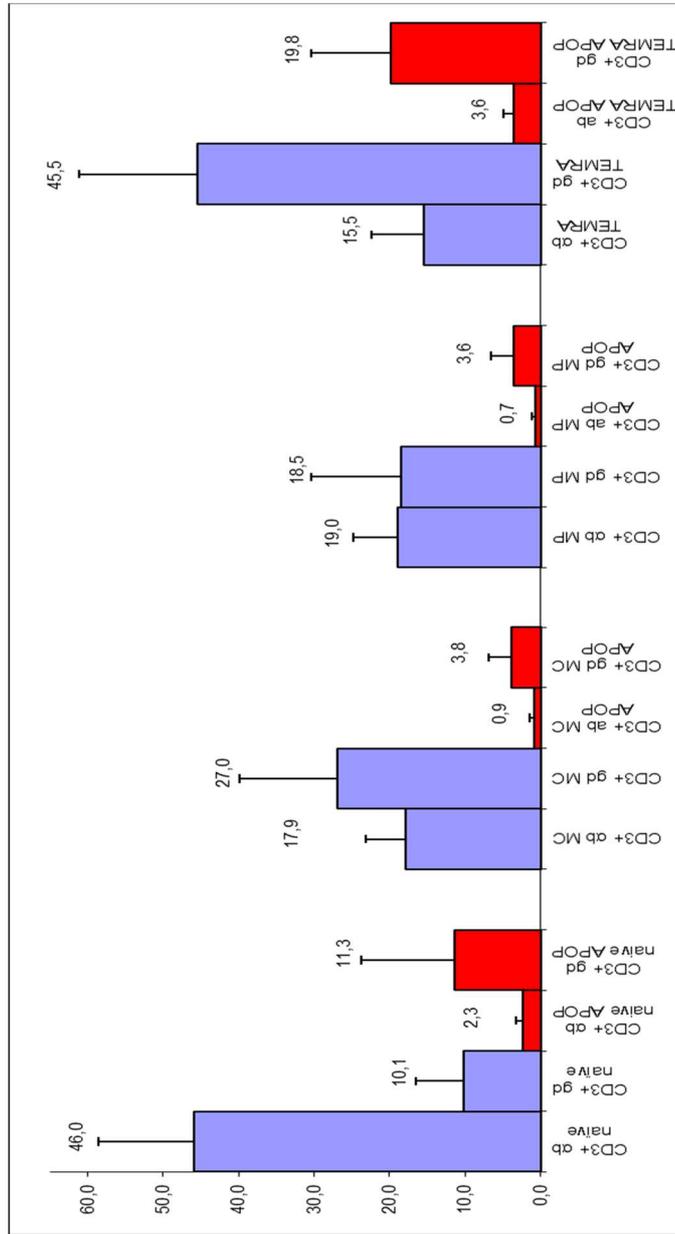


Fig. 4.23. Estados funcionales y su apoptosis de los linfocitos CD3+/ $\alpha\beta$ + vs CD3+/ $\gamma\delta$ +.

LT CD4+ $\alpha\beta$ y LT CD4+ $\gamma\delta$

Observamos un aumento de los linfocitos CD3+CD4+ $\alpha\beta$ en estado naïve respecto de los $\gamma\delta$, que por el contrario presentan un aumento respecto de los $\alpha\beta$ en estado efector terminal (TEMRA).

Respecto al porcentaje de apoptosis, podemos ver como en los diferentes estados funcionales, la apoptosis está elevada en los linfocitos CD3+CD4+ $\gamma\delta$ respecto de los $\alpha\beta$, excepto en estado naïve, donde no hemos encontrado apoptosis (fig.4.24).

Estas diferencias han sido estadísticamente significativas para todas las parejas de poblaciones analizadas, excepto para los LT CD4+ $\alpha\beta$ + memoria central vs CD4+ $\gamma\delta$ +memoria central, tanto para el porcentaje de la población como la apoptosis, y en el porcentaje de la población CD4+ $\alpha\beta$ + memoria periférica vs CD4+ $\gamma\delta$ +memoria periférica.

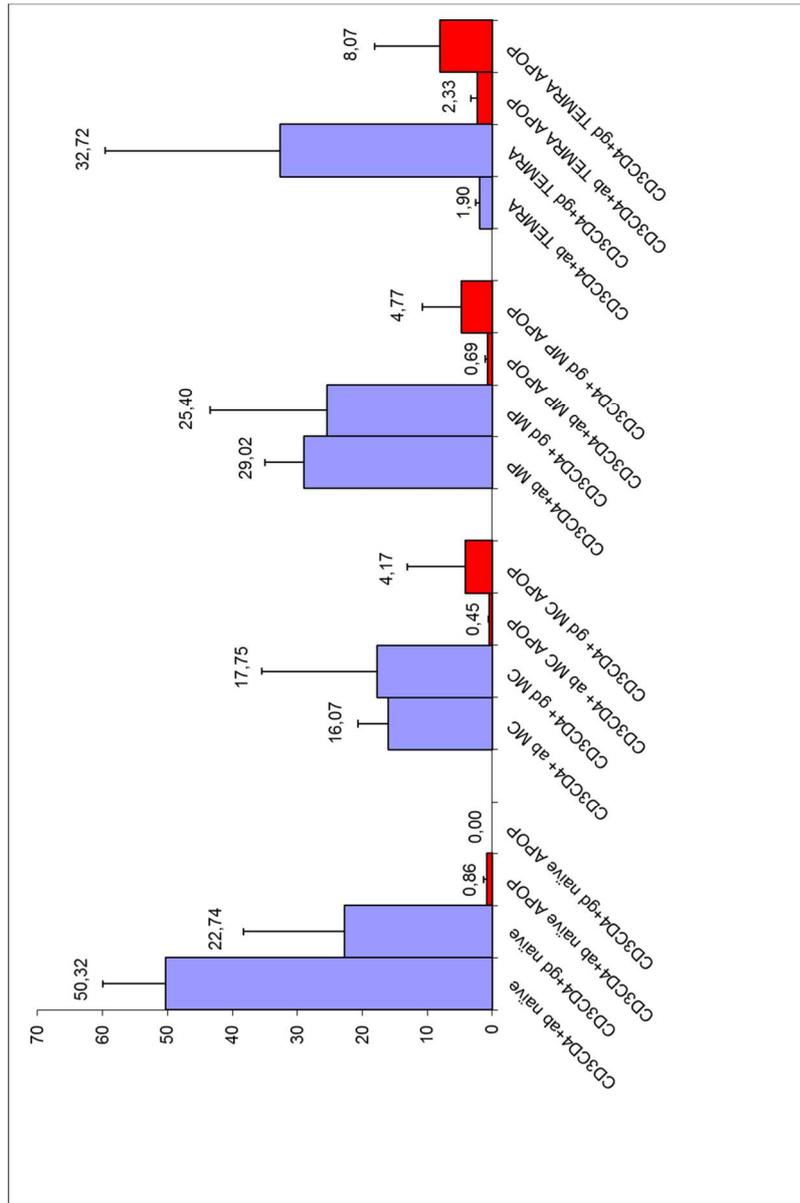


Fig. 4.24. Estados funcionales y su apoptosis de los linfocitos CD3+/CD4+/αβ+ vs CD3+/CD4+/γδ+.

LT CD8+ $\alpha\beta$ y LT CD8+ $\gamma\delta$

Observamos un aumento de los linfocitos CD3+CD8+ $\alpha\beta$ en estado naïve respecto de los $\gamma\delta$, que por el contrario presentan un aumento respecto de los $\alpha\beta$ en el resto de estados funcionales: memoria central, periférica y TEMRA.

Respecto al porcentaje de apoptosis, podemos ver como en los diferentes estados funcionales, la apoptosis está elevada en los linfocitos CD3+CD8+ $\gamma\delta$ respecto de los $\alpha\beta$, excepto en memoria periférica, donde no hemos encontrado apoptosis (fig.4.25).

Estas diferencias han sido estadísticamente significativas para todas las parejas de poblaciones estudiadas excepto para la población CD3+CD8+ $\alpha\beta$ memoria central vs CD3+CD8+ $\gamma\delta$ memoria central.

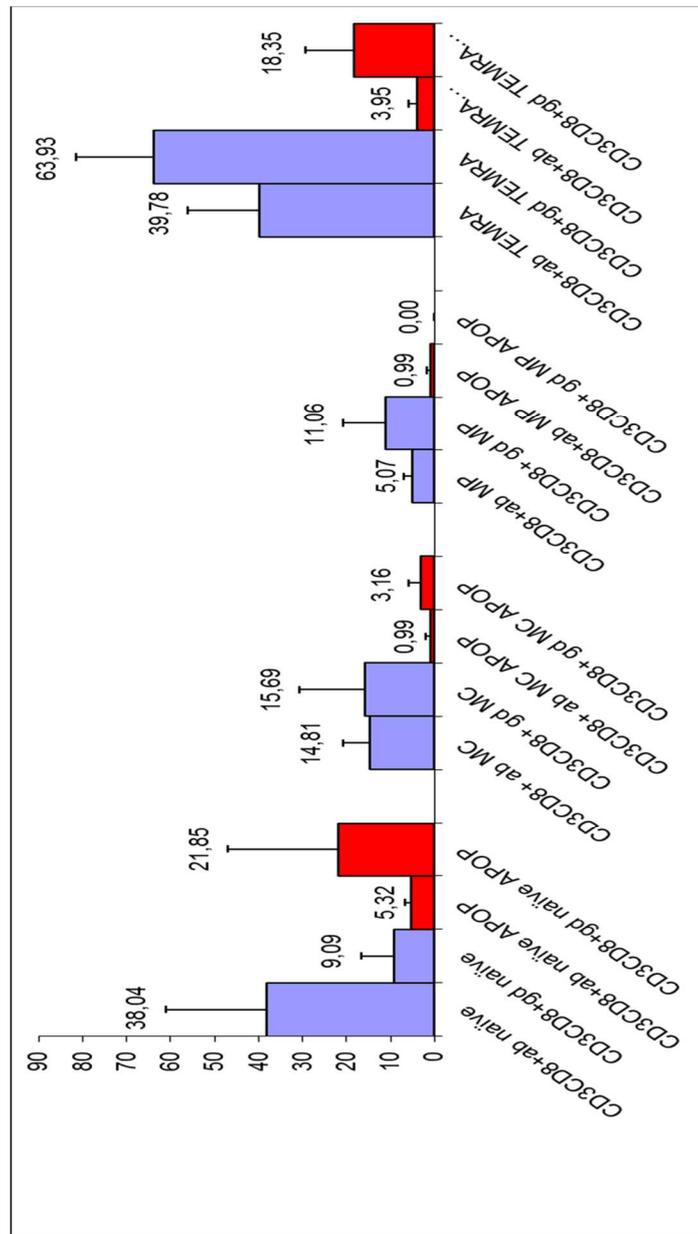


Fig. 4.25. Estados funcionales y su apoptosis de los linfocitos CD3+/CD8+/ $\alpha\beta$ + vs CD3+/CD8+/ $\gamma\delta$ +.

LT CD56+ $\alpha\beta$ y CD56+ $\gamma\delta$

Observamos un aumento de los linfocitos CD3+CD56+ $\alpha\beta$ en todos los estados, excepto en memoria periférica respecto de los $\gamma\delta$.

Respecto al porcentaje de apoptosis, podemos ver como en los diferentes estados funcionales, la apoptosis está elevada en los linfocitos CD3+CD56+ $\gamma\delta$ respecto de los $\alpha\beta$ (fig.4.26).

Estas diferencias han sido estadísticamente significativas para todas las parejas de poblaciones analizadas, excepto la apoptosis de los linfocitos CD3+CD56+ $\alpha\beta$ naïve vs CD3+CD56+ $\gamma\delta$ naïve.

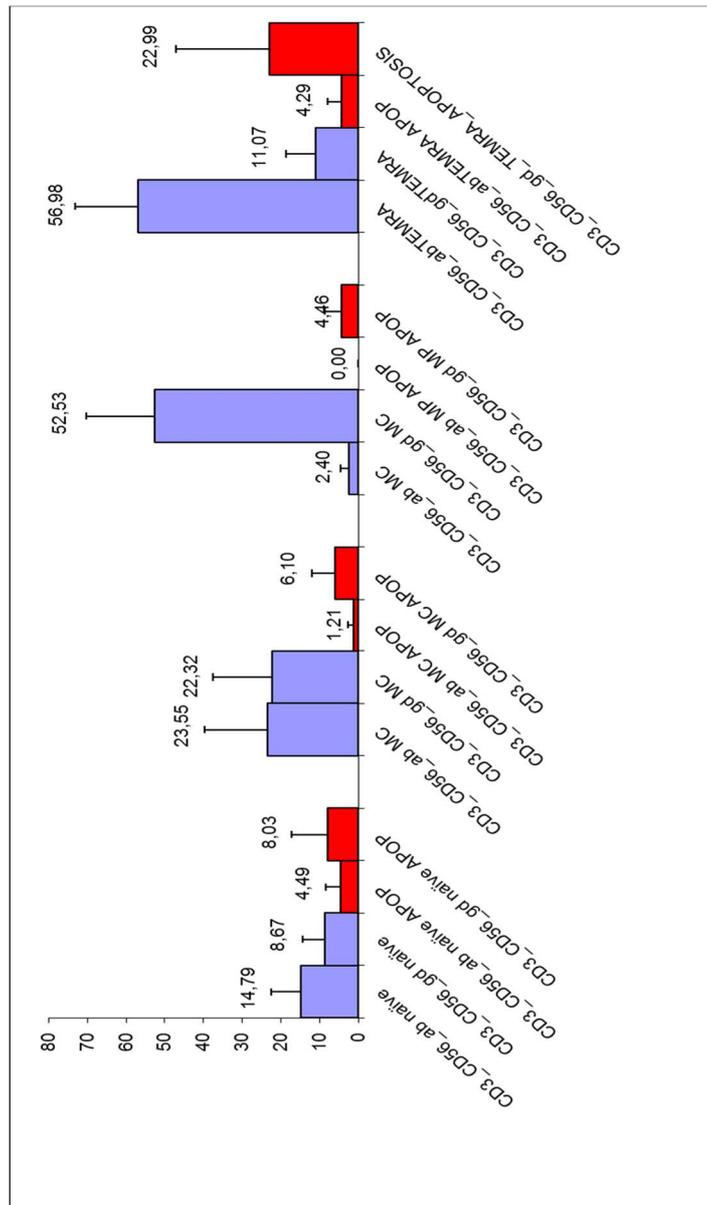


Fig. 4.26. Estados funcionales y su apoptosis de los linfocitos CD3⁺/CD56⁺/αβ⁺ vs CD3⁺/CD56⁺/γδ⁺.

4.4 Subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y su apoptosis en relación a sexo y edad.

4.4.1 Sexo

Respecto al estudio de posibles diferencias relacionadas con el sexo, como podemos ver en la fig. 4.27 hemos encontrado un aumento en las mujeres en el valor medio de los linfocitos $CD3+\alpha\beta$ y $CD3+CD4+\alpha\beta$, mientras que existe un valor medio menor en las mujeres en los linfocitos $CD3+CD8+\alpha\beta$ y $CD3+CD56+\alpha\beta$.

Respecto al porcentaje de apoptosis, podemos ver cómo, al contrario de las poblaciones analizadas, los valores de apoptosis están disminuidos en las mujeres respecto a los hombres en los linfocitos $CD3+\alpha\beta$ y $CD3+CD4+\alpha\beta$, mientras que está aumentadas en los linfocitos $CD3+CD8+\alpha\beta$ y $CD3+CD56+\alpha\beta$.

Estas diferencias han sido estadísticamente significativas para las poblaciones $CD3+\alpha\beta$ y $CD3+CD4+\alpha\beta$ ($p=0,05$), como ya habíamos descrito en un estudio previo.

Respecto a los LT $\gamma\delta$ (fig.. 4.28), no observamos diferencias entre el sexo ni para el porcentaje o valores absolutos, ni para la apoptosis encontrada en cada grupo.

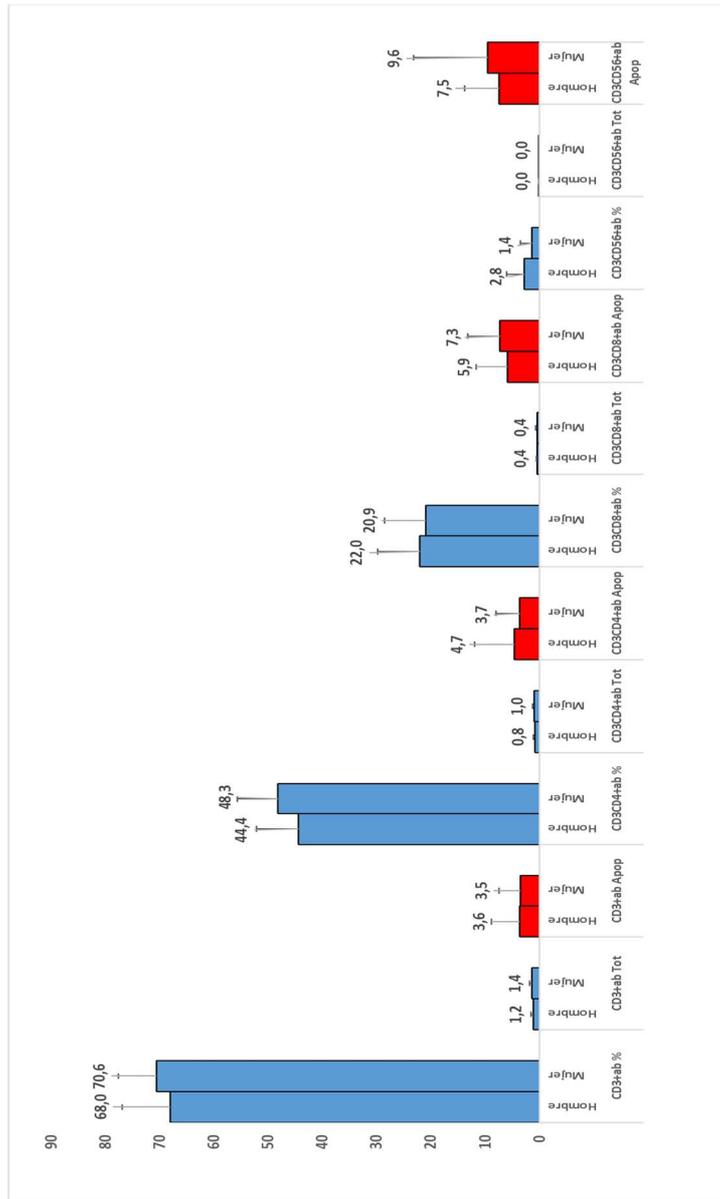


Fig. 4.27. Porcentajes y apoptosis de las subpoblaciones $\alpha\beta$ respecto al sexo.

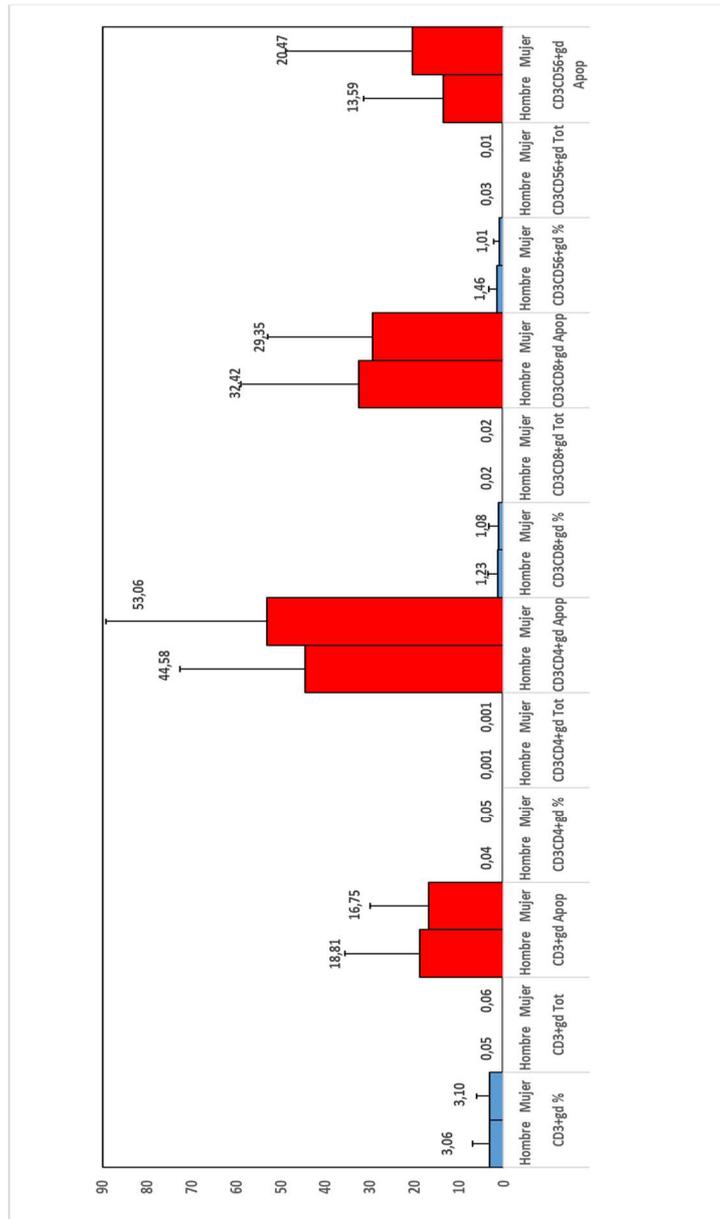


Fig. 4.28. Porcentajes y apoptosis de las subpoblaciones $\gamma\delta$ respecto al sexo.

4.4.2 Edad

Respecto a la edad, la fig. 4.29 muestra una disminución en los linfocitos CD3+CD4+ $\alpha\beta$ y CD3+CD8+ $\alpha\beta$ en los grupos de mayor edad, mientras que observamos un ligero aumento de los linfocitos CD56+ $\alpha\beta$ a medida que aumenta la edad. Se observa también un aumento de los linfocitos CD3+CD56+ $\alpha\beta$ en el grupo de individuos de más edad. Tratándose de la apoptosis, no observamos ningún patrón diferente que podamos asociar a la edad.

Las diferencias observadas son estadísticamente significativas en las siguientes poblaciones:

CD3+ $\alpha\beta$:

Grupo de 0-30 vs 31-60, $p < 0,001$

Grupo de 0-30 vs 61-100, $p = 0,005$

Grupo de 31 a 60 vs 61 a 100, $p = 0,03$

CD3+CD4+ $\alpha\beta$:

Grupo de 0-30 vs 61-100, $p = 0,018$

CD3+CD8+ $\alpha\beta$:

Grupo de 0-30 vs 31-60, $p = 0,009$

Grupo de 0-30 vs 61-100, $p = 0,001$

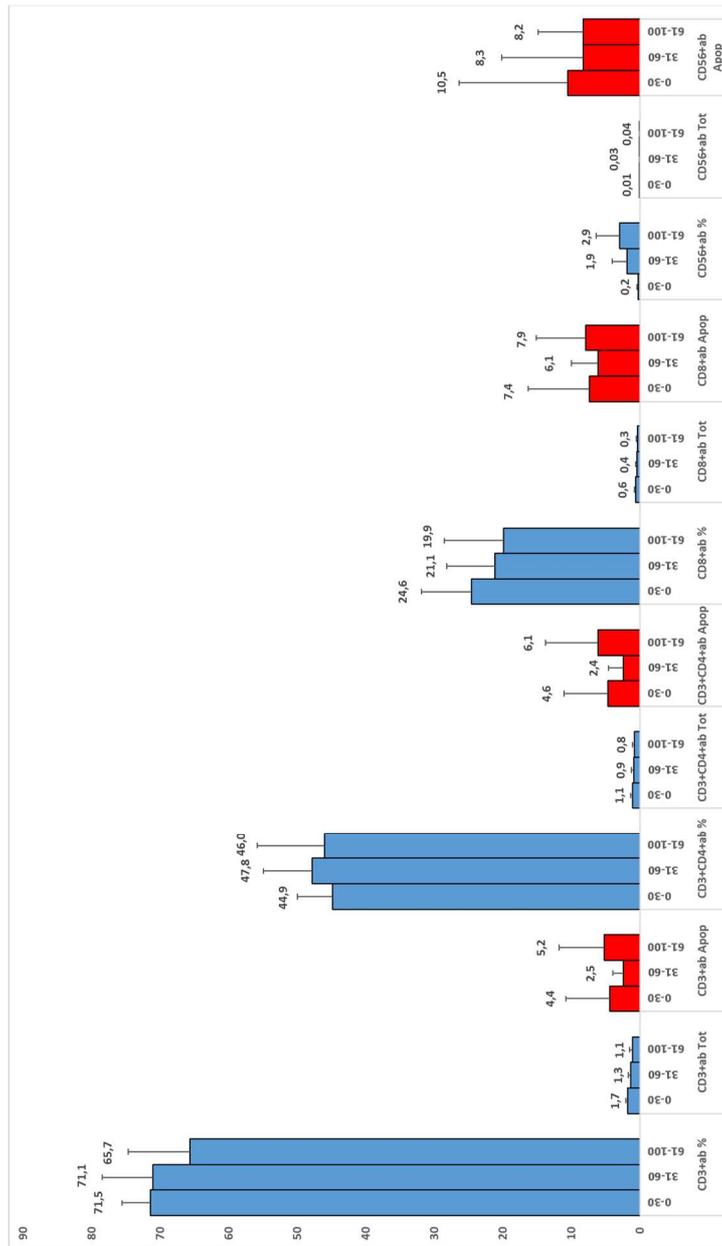


Fig. 4.29. Porcentajes y apoptosis de las subpoblaciones $\alpha\beta$ respecto a la edad.

Referente a los $LT\gamma\delta$ (fig.. 4.30), observamos una disminución con la edad en los $CD3+\gamma\delta$ y una ligera tendencia a aumentar en los linfocitos $CD3+CD8+\gamma\delta$.

Respecto a la apoptosis, se observa aumentada en los linfocitos $CD3+\gamma\delta$ en el grupo de individuos de más edad, así como en los linfocitos $CD3+CD8+\gamma\delta$.

Estas diferencias son estadísticamente significativas en las siguientes poblaciones:

$CD3+\gamma\delta$:

Grupo de 0-30 vs 31-60, $p=0,037$

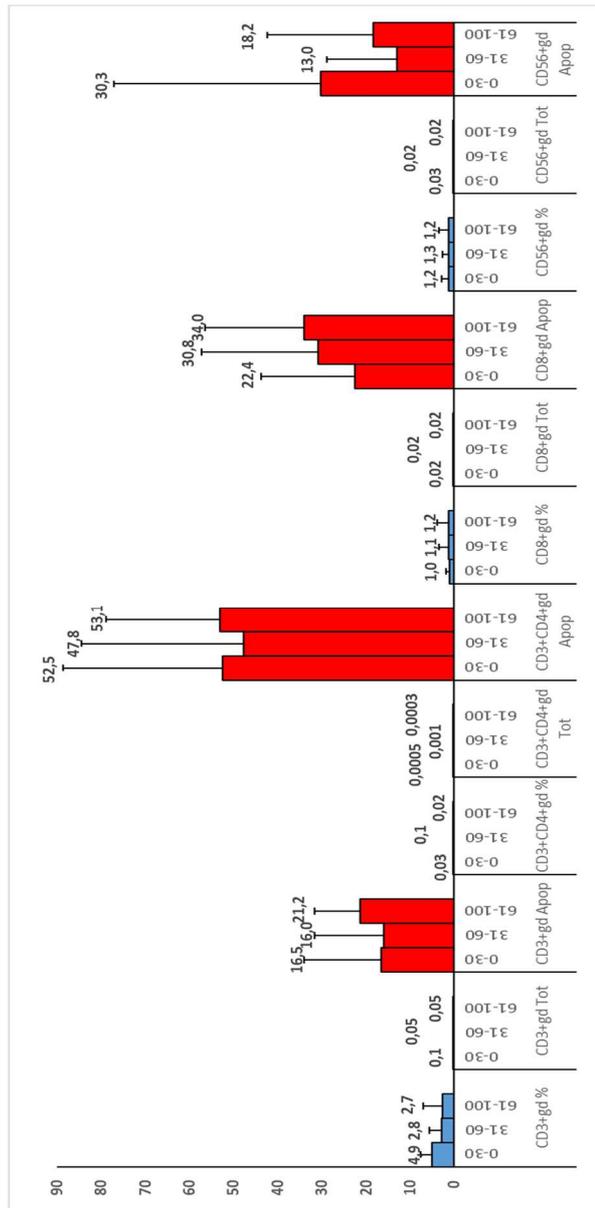


Fig. 4.30. Porcentajes y apoptosis de las subpoblaciones $\gamma\delta$ respecto a la edad.

El análisis de las relaciones en la apoptosis entre diferentes subpoblaciones, muestra uniones estadísticamente significativas en las siguientes parejas:

APOPTOSIS	CD3+ $\gamma\delta$	CD3+CD4+ $\gamma\delta$	CD3+CD56+ $\gamma\delta$
CD3+ $\alpha\beta$	<i>p=0,002</i>	<i>p=0,001</i>	<i>p=0,007</i>

APOPTOSIS	CD3+ $\gamma\delta$	CD3+CD4+ $\gamma\delta$
CD3+CD4+ $\alpha\beta$	<i>p=0,01</i>	<i>p<0,001</i>

APOPTOSIS	CD3+ $\gamma\delta$	CD3+CD4+ $\gamma\delta$	CD3+CD8+ $\gamma\delta$	CD3+CD56+ $\gamma\delta$
CD3+CD8+ $\alpha\beta$	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p=0,001</i>	<i>p=0,002</i>

APOPTOSIS	CD3+ $\gamma\delta$	CD3+CD4+ $\gamma\delta$	CD3+CD8+ $\gamma\delta$	CD3+CD56+ $\gamma\delta$
CD3+CD56+ $\alpha\beta$	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo en el que se describe y cuantifica la apoptosis en $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$ en un número importante de adultos sanos y que se relaciona, además, con el estado funcional linfocitario.

Durante décadas, los $LT\gamma\delta$ han generado cierto desconcierto debido a su preponderancia en los tejidos periféricos sobre la sangre periférica y a la presencia de fenotipos activados y de memoria mayoritariamente, así como por su capacidad para reconocer un amplio repertorio de antígenos, alguno de los cuales no requieren ser procesados por el MHC.

Por otro lado, también presenta dificultades el estudio de este tipo celular, pues la mayoría de los linfocitos deben ser aislados de los tejidos (especialmente en humanos) y, además, no existe una gran homología entre los $LT\gamma\delta$ de humanos y de otros modelos animales, como, por ejemplo, el ratón.

Recientemente, Tyler y colaboradores (109) demostraron la colaboración entre los $LT\gamma\delta$ de sangre periférica y otras células implicadas en la respuesta inmune, actuando como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa mediante la activación y diferenciación de distintos tipos de APC, e incluso, actuando en ocasiones ellas mismas como APC, o allanando el camino a otras células efectoras de la respuesta inmune y contribuyendo a la memoria inmunitaria a largo plazo.

El receptor FAS (CD95), es una proteína de superficie con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado, implicado en la apoptosis celular. Matsumoto y colaboradores (110) estudiando un grupo de pacientes en hemodiálisis demostraron que los LT $\gamma\delta$ tenían mayor expresión del receptor FAS en la membrana celular que los LT $\alpha\beta$, tanto en controles normales como en pacientes en hemodiálisis. Esto podría indicar que los LT $\gamma\delta$ son más susceptibles o están más preparados para la muerte celular programada que los LT $\alpha\beta$.

En la misma línea se orientan los resultados de esta tesis. En primer lugar, el aumento significativo de la apoptosis encontrado en nuestro estudio en las células T $\gamma\delta$ con respecto a las células T $\alpha\beta$ en sangre periférica concuerda con la escasa prevalencia de los LT $\gamma\delta$ en la sangre con respecto a las células T $\alpha\beta$, y con el hecho de que su constante contacto con elementos antigénicos las hace entrar en apoptosis con mayor rapidez. Es bien conocido que, tras el estado de activación y su posterior función efectora, la mayor parte de los linfocitos entra en apoptosis y muere.

Como vimos en la introducción, el fenotipo mayoritario del TCR LT $\gamma\delta$ en el adulto sano es el V γ 9V δ 2. Pero no siempre es así. Desde el nacimiento y hasta los 7 años, hay un incremento en el número de los LT $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2, sin hallarse una oleada de expulsión de nuevos linfocitos en el timo. Parece ser que existe una expansión por contacto con los antígenos (111). El fenotipo que expresan estos linfocitos mayoritariamente es CD45RA- (fenotipo de memoria), en contraste con los que encontramos en la sangre de cordón umbilical (CD45RA+). Este fenómeno demuestra que tienen capacidad efectora inmediata, a la vez que son capaces de generar una

respuesta de memoria tras la infección (111). Los resultados obtenidos en este trabajo presentan datos muy similares a los anteriormente descritos. La población $T\gamma\delta$ presenta mayoritariamente fenotipo efector y de memoria. Este fenómeno ocurre tanto en los $CD3+CD4+\gamma\delta$ como en los $CD3+CD8+\gamma\delta$, que no habían sido descritos hasta el momento.

En ratones se ha investigado la esperanza de vida de los $LT\gamma\delta$ en comparación con los $LT\alpha\beta$. Los $LT\gamma\delta$ tienen un recambio mucho más rápido, tanto durante su desarrollo en el timo, como en su estancia en los tejidos linfoides periféricos. Además, el fenotipo es de activación y memoria, encontrándose pocas en estado naïve (112). De nuevo, todos los datos confirman los hallazgos del presente trabajo, en el que las células $T\gamma\delta$ están en constante apoptosis y recambio con respecto a las células $T\alpha\beta$, muy probablemente por un mayor contacto antigénico, por lo que están mayoritariamente en estado de activación, con escasas células naïve. Esto supone que los $LT\gamma\delta$ tienen una función fundamental como células en constante actividad inmunitaria.

Respecto a los cambios ocurridos durante la inmunosenescencia, como ya habíamos comentado en la introducción, distintos grupos de trabajo han publicado diferentes resultados relativos a la disminución en los porcentajes de las diferentes subpoblaciones linfocitarias (65–70). En un trabajo previo de nuestro grupo observamos un descenso en los porcentajes de linfocitos $CD3+$ tanto $LT\alpha\beta$ como $LT\gamma\delta$ a partir de la década de los 60 años. Sin embargo, los $LTCD8+$, tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$, mantenían unas cifras parecidas a lo largo de la edad (64). Los resultados del presente trabajo confirman la mayoría de los resultados previamente obtenidos con una serie diferente de

voluntarios, mostrando en este nuevo trabajo una disminución también de la subpoblación CD3+CD8+ $\alpha\beta$.

Estudios previos habían relacionado un aumento de la apoptosis en los LT de los individuos de más edad (73–77). Este incremento en la apoptosis sería debido a un aumento de moléculas pro-apoptóticas y un descenso en moléculas anti-apoptóticas. En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias significativas al comparar los distintos grupos de edad analizados o las subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ (tanto CD4+ como CD8+), si existiendo un aumento de la apoptosis, sin embargo, en los LT $\gamma\delta$. Esta discordancia entre trabajos anteriores y la presente tesis, podría ser explicada por el limitado número de voluntarios reclutados en los grupos de edad más joven y más anciano (11 y 22 voluntarios respectivamente). Sería conveniente aumentar el tamaño muestral en un trabajo posterior, para confirmar o refutar los resultados obtenidos. Así mismo, el reducido número de individuos en estos grupos no nos ha permitido realizar el análisis estadístico de la apoptosis en los estados funcionales de los linfocitos por grupos de edad, ya que se requería un número mayor de individuos para que los resultados alcanzaran verdadera significación.

Por último, haciendo referencia al sexo, hemos confirmado los resultados obtenidos por nosotros en un trabajo previo, analizado ya en la presente tesis (64), encontrando valores significativamente más elevados en las mujeres de los LT $\alpha\beta$ y LTCD4+ $\alpha\beta$. La presencia de valores más elevado de LT CD3+ y CD4+ en mujeres ya habían sido descritos en una población de adultos sanos italianos, país muy cercano al nuestro con formas de vida parecidas a nuestra población de estudio (69). Respecto a la apoptosis de los

LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$, no hemos encontrado diferencias significativas en los porcentajes de apoptosis para cada subpoblación.

Como hemos comentado en la introducción de la presente tesis doctoral, todos los LT incluyen en la superficie de la membrana celular el receptor del TCR asociado al complejo CD3. No obstante, entre todo el conjunto de células T, encontramos una subpoblación particular que se caracteriza por expresar marcadores típicos de las células NK. Son las denominadas células NKT. Esta subpoblación de linfocitos, caracterizada por la coexpresión del TCR y la molécula NK1.1 (CD161), se describió en 1987 en ratones C57BL6 (113). Las células NKT presentan actividad citotóxica, contribuyen a la eliminación de células infectadas por microorganismos, participan en el rechazo de los trasplantes y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Son capaces de eliminar células diana induciendo la apoptosis mediada por el sistema Fas/FasL. Existen muy pocos estudios que valoren los porcentajes de este subtipo celular y menos aún si nos referimos a las subpoblaciones de células NKT $\alpha\beta+$ y NKT $\gamma\delta+$. No hemos encontrado diferencias significativas, aunque si cierta tendencia a existir un aumento de las NKT $\alpha\beta+$ respecto de las NKT $\gamma\delta$, que además tienen mayor porcentaje de apoptosis, con diferencia estadísticamente significativa en este caso.

Todos estos datos sugieren que los LT $\gamma\delta$, como ya se ha mencionado anteriormente, forman parte de un sistema inmunológico superpuesto entre la inmunidad innata y la adquirida. Estas células están en constante contacto con sustancias medioambientales, identificando posibles patógenos para presentarlos a otras células o eliminarlos (células T $\gamma\delta$ activadas),

memorizando su estructura antigénica para posteriores contactos (células T $\gamma\delta$ memoria), funciones estas últimas relacionadas con la inmunidad adquirida.

El hecho de la privilegiada localización de las células T $\gamma\delta$ en las mucosas, entre las células epiteliales, en primera línea de defensa, les confiere unas características inmunológicas innatas acordes con estos resultados encontrados experimentalmente.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Al comparar los valores de apoptosis entre los $LT\alpha\beta$ y $LT\gamma\delta$ hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas que demuestran un aumento de la apoptosis en estos últimos.
2. Esta apoptosis aumentada se encuentra en casi todas las poblaciones analizadas: $CD3+$, $CD3+CD4+$, $CD3+CD8+$ y $CD3+CD56+$.
3. No hemos encontrado un aumento significativo de la apoptosis entre las distintas subpoblaciones analizadas, en los individuos de más edad, que justifique la disminución de estas poblaciones con el envejecimiento.
4. No hemos encontrado diferencias significativas de la apoptosis relacionada con el sexo.
5. Hemos encontrado una relación entre los estados funcionales de los LT y la apoptosis. Los $LT\gamma\delta$ se encuentran principalmente en estado de memoria y efectores, con una apoptosis incrementada respecto a los $LT\alpha\beta$. Este dato sugiere que los $LT\gamma\delta$ se encontrarían en un estado de activación constante que los mantendría dispuestos para participar en las respuestas inmunitarias de su competencia, y en constante actividad.

7.BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

1. Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* [Internet]. 1988 Feb [cited 2015 Sep 17];8(1):3–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3134960>
2. Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1968 Oct 1 [cited 2015 Sep 17];128(4):801–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2138540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Mitchell GF, Miller JF. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1968 Oct 1 [cited 2015 Sep 17];128(4):821–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2138546&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Brenner MB, McLean J, Scheft H, Riberdy J, Ang SL, Seidman JG, et al. Two forms of the T-cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* [Internet]. Jan [cited 2015 Sep 16];325(6106):689–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3102967>
5. Li H, Lebedeva MI, Llera AS, Fields BA, Brenner MB, Mariuzza RA. Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* [Internet]. 1998 Jan 29 [cited 2015 Sep 14];391(6666):502–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461220>

6. Adams EJ, Chien Y-H, Garcia KC. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science* [Internet]. 2005 Apr 8 [cited 2015 Sep 16];308(5719):227–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821084>
7. Allison TJ, Winter CC, Fournié JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* [Internet]. 2001 Jun 14 [cited 2015 Sep 16];411(6839):820–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459064>
8. Koop BF, Rowen L, Wang K, Kuo CL, Seto D, Lenstra JA, et al. The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics* [Internet]. 1994 Feb [cited 2015 Sep 16];19(3):478–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8188290>
9. Leiden JM. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1993 Jan [cited 2015 Sep 16];11:539–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8476572>
10. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* [Internet]. 1995 Jan [cited 2015 Sep 16];42(6):455–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550092>
11. LeFranc MP, Forster A, Baer R, Stinson MA, Rabbitts TH. Diversity and rearrangement of the human T cell rearranging gamma genes: nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell* [Internet]. 1986 Apr 25 [cited 2015 Sep 16];45(2):237–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2938743>
12. Satyanarayana K, Hata S, Devlin P, Roncarolo MG, De Vries JE, Spits H, et al. Genomic organization of the human T-cell antigen-receptor alpha/delta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988 Nov [cited 2015 Sep 16];85(21):8166–70. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=282388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

13. Moss PA, Rosenberg WM, Bell JI. The human T cell receptor in health and disease. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1992 Jan [cited 2015 Sep 16];10:71–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591001>
14. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* [Internet]. 1994 Jan 28 [cited 2015 Aug 27];76(2):263–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8293463>
15. Alberto García-Mariscal, Beatriz del Blanco CH-M. Generation of lymphocyte antigen receptor diversity: Validation of the “accessibility model” in controlling V(D)J recombination. *inmunología*. 2013;32(2):57–69.
16. Hayday AC, Pennington DJ. Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Sep 22];8(2):137–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242687>
17. Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* [Internet]. 2004 Jun [cited 2015 Sep 16];20(6):735–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189738>
18. Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2015 Sep 16];4(2):168–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514733>

19. Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg E V. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Sep 16];24(1):53–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413923>
20. von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2015 Sep 15];5(7):571–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15999096>
21. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2015 Sep 7];21:139–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414722>
22. García-Mariscal A, del Blanco B, Hernández-Munain C. Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del «modelo de accesibilidad» en el control de la recombinación V(D)J. *Inmunología* [Internet]. Elsevier; 2013 Apr 1 [cited 2015 Oct 25];32(2):57–69. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-inmunologia-322-articulo-generacion-diversidad-los-receptores-antigeno-90199503>
23. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1993 Jan [cited 2015 Sep 16];11:637–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8476575>
24. Chien Y, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Aug 29];32:121–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24387714>

25. Bonneville M, Janeway CA, Ito K, Haser W, Ishida I, Nakanishi N, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. *Nature* [Internet]. 1988 Dec 1 [cited 2015 Sep 16];336(6198):479–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461518>
26. Lichtman AH, Abbas AK. T-cell subsets: recruiting the right kind of help. *Curr Biol* [Internet]. 1997 Apr 1 [cited 2015 Sep 23];7(4):R242–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162501>
27. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* [Internet]. 2002 Feb [cited 2015 Sep 23];109(4):431–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Ferreira LMR. Gammadelta T cells: innately adaptive immune cells? *Int Rev Immunol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2015 Sep 16];32(3):223–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23617235>
29. Lotze MT, Finn OJ. Recent advances in cellular immunology: implications for immunity to cancer. *Immunol Today* [Internet]. 1990 Jun [cited 2015 Sep 16];11(6):190–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2354026>
30. Sperling AI, Linsley PS, Barrett TA, Bluestone JA. CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor-gamma delta+ T lymphocytes. *J Immunol* [Internet]. 1993 Dec 1 [cited 2015 Sep 16];151(11):6043–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245449>
31. Horner AA, Jabara H, Ramesh N, Geha RS. gamma/delta T

lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1995 Mar 1 [cited 2015 Sep 16];181(3):1239–44. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191938&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

32. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* [Internet]. 1999 Jul 30 [cited 2015 Sep 16];285(5428):727–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426993>
33. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Aug 16 [cited 2015 Sep 16];91(17):8175–9. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1996 Jan [cited 2015 Sep 16];14:511–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717523>
35. Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan P-L, et al. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis* [Internet]. 2009 Sep 15 [cited 2015 Sep 16];200(6):858–65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656068>
36. Alexander AAZ, Maniar A, Cummings J-S, Hebbeler AM, Schulze DH, Gastman BR, et al. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ $\{\gamma\}\{\delta\}$ T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet].

2008 Jul 1 [cited 2015 Sep 16];14(13):4232–40. Available from:
[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2614380
&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2614380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)

37. Himoudi N, Morgenstern DA, Yan M, Vernay B, Saraiva L, Wu Y, et al. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol* [Internet]. 2012 Feb 15 [cited 2015 Jun 17];188(4):1708–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22250090>
38. Tsuji M, Mombaerts P, Lefrancois L, Nussenzweig RS, Zavala F, Tonegawa S. Gamma delta T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in alpha beta T-cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Jan 4 [cited 2015 Sep 16];91(1):345–9. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Sutton CE, Mielke LA, Mills KHG. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2015 Sep 13];42(9):2221–31. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949320>
40. Wands JM, Roark CL, Aydintug MK, Jin N, Hahn Y-S, Cook L, et al. Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2015 Sep 16];78(5):1086–96. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16204632>
41. Maniar A, Zhang X, Lin W, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, et al. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood* [Internet]. 2010 Sep 9 [cited 2015 Sep 16];116(10):1726–33. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3324253>

&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

42. Jameson J, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Sep 16];215:114–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291283>
43. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2015 Sep 16];10(7):467–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539306>
44. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* [Internet]. 2000 Jul 20 [cited 2015 Sep 16];406(6793):309–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10917533>
45. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Dec 4 [cited 2015 Sep 16];192(11):1553–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 Mar [cited 2015 Sep 16];3(3):233–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12658271>
47. Huber SA. $\gamma\delta$ T lymphocytes kill T regulatory cells through CD1d. *Immunology* [Internet]. 2010 Oct [cited 2015 Sep 16];131(2):202–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2967266&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

48. Cheng L, Cui Y, Shao H, Han G, Zhu L, Huang Y, et al. Mouse gammadelta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2008 Oct 15 [cited 2015 Sep 10];203(1):3–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Brandes M, Willimann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, et al. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Feb 17 [cited 2015 Sep 16];106(7):2307–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2650152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
50. Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med* [Internet]. 2005 Apr 18 [cited 2015 Sep 16];201(8):1269–79. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
51. Jameson JM, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells. *Front Biosci* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2015 Sep 16];9:2640–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358587>
52. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013 Jan 25 [cited 2015 Jun 28];13(2):88–100. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3951794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

53. Cavanagh MM, Weyand CM, Goronzy JJ. Chronic inflammation and aging: DNA damage tips the balance. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2015 Sep 21];24(4):488–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3423478&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Hohensinner PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. *Aging Dis* [Internet]. 2011 Dec [cited 2015 Sep 21];2(6):524–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3295061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
55. Goronzy JJ, Li G, Yang Z, Weyand CM. The janus head of T cell aging - autoimmunity and immunodeficiency. *Front Immunol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Sep 21];4:131. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3671290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
56. Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. Vaccines for the elderly. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2012 Oct [cited 2015 Aug 19];18:100–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22862783>
57. Gupta S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exp Gerontol* [Internet]. Jan [cited 2015 Sep 23];37(2-3):293–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772515>
58. Fagnoni FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, et al. Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood* [Internet]. 2000 May 1 [cited 2015 Sep 23];95(9):2860–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779432>

59. Weyand CM, Fulbright JW, Goronzy JJ. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. *Exp Gerontol* [Internet]. 2003 Aug [cited 2015 Sep 21];38(8):833–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915205>
60. Yung RL. Changes in immune function with age. *Rheum Dis Clin North Am* [Internet]. 2000 Aug [cited 2015 Sep 21];26(3):455–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989507>
61. Linton PJ, Haynes L, Tsui L, Zhang X, Swain S. From naive to effector--alterations with aging. *Immunol Rev* [Internet]. 1997 Dec [cited 2015 Sep 21];160:9–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476661>
62. Mountz JD, Wu J, Zhou T, Hsu HC. Cell death and longevity: implications of Fas-mediated apoptosis in T-cell senescence. *Immunol Rev* [Internet]. 1997 Dec [cited 2015 Sep 21];160:19–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476662>
63. Schindowski K, Fröhlich L, Maurer K, Müller WE, Eckert A. Age-related impairment of human T lymphocytes' activation: specific differences between CD4(+) and CD8(+) subsets. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2002 Feb [cited 2015 Sep 21];123(4):375–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744048>
64. Andreu-Ballester JC, García-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigó V, Almela-Quilis a., Mayans J, et al. Values for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: Assessment by age and gender. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2012;82 B(4):238–44.
65. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* [Internet].

2004 Mar [cited 2015 Sep 22];72(3):203–12. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962239>

66. Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, et al. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* [Internet]. 1993 Nov 1 [cited 2015 Sep 22];82(9):2767–73. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8219229>
67. Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin Immunol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2015 Sep 22];116(2):192–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993366>
68. Uppal SS, Verma S, Dhot PS. Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2003 Mar [cited 2015 Sep 22];52(1):32–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12599179>
69. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, et al. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* [Internet]. 1999 Jun [cited 2015 Sep 22];84(6):499–504. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366792>
70. Stulnig T, Maczek C, Böck G, Majdic O, Wick G. Reference intervals for human peripheral blood lymphocyte subpopulations from “healthy” young and aged subjects. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1995 Nov [cited 2015 Sep 22];108(3):205–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7580284>

-
71. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science* [Internet]. 1999 Feb 26 [cited 2015 Sep 16];283(5406):1277–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10084932>
 72. Argentati K, Re F, Donnini A, Tucci MG, Franceschi C, Bartozzi B, et al. Numerical and functional alterations of circulating gammadelta T lymphocytes in aged people and centenarians. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2015 Sep 22];72(1):65–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101264>
 73. Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol* [Internet]. 1998 Feb 15 [cited 2015 Sep 23];160(4):1627–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469419>
 74. Phelouzat MA, Arbogast A, Laforge T, Quadri RA, Proust JJ. Excessive apoptosis of mature T lymphocytes is a characteristic feature of human immune senescence. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 1996 Jul 5 [cited 2015 Sep 23];88(1-2):25–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804091>
 75. Phelouzat MA, Laforge T, Arbogast A, Quadri RA, Boutet S, Proust JJ. Susceptibility to apoptosis of T lymphocytes from elderly humans is associated with increased in vivo expression of functional Fas receptors. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 1997 Jun [cited 2015 Sep 23];96(1-3):35–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223109>
 76. Lechner H, Amort M, Steger MM, Maczek C, Grubeck-Loebenstein B. Regulation of CD95 (APO-1) expression and the induction of apoptosis in human T cells: changes in old age. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1996 Jul [cited 2015 Sep 23];110(3):238–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8688670>

77. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* [Internet]. 1972 Aug [cited 2015 Jan 14];26(4):239–57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2008650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Barros LF, Hermosilla T, Castro J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* [Internet]. 2001 Oct [cited 2015 Sep 16];130(3):401–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11913453>
79. Barros LF, Stutzin A, Calixto A, Catalán M, Castro J, Hetz C, et al. Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* [Internet]. 2001 Jan [cited 2015 Sep 16];33(1):114–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124827>
80. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* [Internet]. 1995 Jan [cited 2015 May 2];146(1):3–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1870771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
81. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2015 Jul 10];88(3):355–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039262>
82. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* [Internet]. 2003 Feb 21 [cited 2015 Aug 26];112(4):481–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600312>

83. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* [Internet]. 2002 Mar [cited 2015 Sep 16];9(3):459–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931755>
84. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* [Internet]. 2004 Jan 23 [cited 2015 Aug 2];116(2):205–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744432>
85. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* [Internet]. Jan [cited 2015 Sep 16];84(2-3):203–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022951>
86. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* [Internet]. 2004 Aug [cited 2015 Sep 16];13(8):1979–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2279816&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
87. Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2015 Sep 16];129(2-3):346–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806085>
88. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Oct 15 [cited 2015 Jan 22];116(Pt 20):4077–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972501>
89. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1997 Aug [cited 2015 Sep 16];22(8):299–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9270303>

90. Kvensakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF, Perugini MA, et al. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* [Internet]. 2008 Oct [cited 2015 Sep 23];15(10):1564–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551131>
91. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* [Internet]. 2000 Nov 10 [cited 2015 Sep 23];103(4):645–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106734>
92. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* [Internet]. 1996 May 23 [cited 2015 Sep 23];381(6580):335–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692274>
93. Perciavalle RM, Opferman JT. Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Sep 20];23(1):22–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3532576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
94. Schellenberg B, Wang P, Keeble JA, Rodriguez-Enriquez R, Walker S, Owens TW, et al. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell* [Internet]. 2013 Mar 7 [cited 2015 Sep 15];49(5):959–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3594749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
95. Moldavan A. PHOTO-ELECTRIC TECHNIQUE FOR THE COUNTING OF MICROSCOPICAL CELLS. *Science* [Internet]. 1934 Aug 24 [cited 2015 Sep 28];80(2069):188–9. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17817054>

96. GUCKER FT, O'KONSKI CT. A photoelectronic counter for colloidal particles. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1947 Oct [cited 2015 Sep 28];69(10):2422–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20268300>
97. Kamensky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* [Internet]. 1965 Oct 29 [cited 2015 Aug 22];150(3696):630–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5837105>
98. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* [Internet]. 1990 Mar [cited 2015 Sep 22];136(3):593–608. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1877493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
99. Wlodkovic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Recent Advances in Cytometry, Part B - Advances in Applications [Internet]. *Methods in cell biology*. Elsevier; 2011 [cited 2015 Mar 31]. 55-98 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722800>
100. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* [Internet]. 1997 Jan 1 [cited 2015 Sep 22];27(1):1–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000580>
101. Darzynkiewicz Z, Huang X, Okafuji M, King MA. Cytometric methods to detect apoptosis. *Methods Cell Biol* [Internet]. 2004 Jan [cited 2015 Sep 22];75:307–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15603431>

102. Swat W, Ignatowicz L, Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* [Internet]. 1991 Mar 1 [cited 2015 Sep 22];137(1):79–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1901329>
103. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* [Internet]. 1994 Sep 1 [cited 2015 May 18];84(5):1415–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068938>
104. Prieto A, Díaz D, Barcenilla H, García-Suárez J, Reyes E, Monserrat J, et al. Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell cultures. *Cytometry* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2015 Sep 22];48(4):185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12210142>
105. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* [Internet]. 1995 Nov 1 [cited 2015 Aug 26];182(5):1545–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
106. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* [Internet]. 1992 Nov 19 [cited 2015 Aug 4];360(6401):264–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1436108>
107. Solana R, Tarazona R, Aiello AE, Akbar AN, Appay V, Beswick M, et al. CMV and Immunosenescence: from basics to clinics. *Immun Ageing* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Oct 3];9(1):23. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3585851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

108. Lin Z, Chiang NY, Chai N, Seshasayee D, Lee WP, Balazs M, et al. In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells. *Nat Protoc* [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2014 Jun 5 [cited 2015 Oct 11];9(7):1563–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2014.104>
109. Tyler CJ, Doherty DG, Moser B, Eberl M. Human V γ 9/V δ 2 T cells: Innate adaptors of the immune system. *Cell Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;296(1):10–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000887491500009X>
110. Matsumoto Y, Shinzato T, Takai I, Nishimoto A, Nakai S, Sakai T, et al. Peripheral deletion of gammadelta T cells in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 1998 Nov [cited 2015 Oct 18];13(11):2861–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829491>
111. Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med* [Internet]. 1990 May 1 [cited 2015 Oct 18];171(5):1597–612. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2187908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
112. Tough DF, Sprent J. Lifespan of gamma/delta T cells. *J Exp Med*. 1998;187(3):357–65.
113. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE,

Schwartz RH, et al. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* [Internet]. Jan [cited 2015 Oct 21];329(6136):251–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3114646>

8. ANEXOS

8. ANEXOS

8.1 HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO

HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO.

Título del estudio: Apoptosis linfocitaria según receptor TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ en sujetos sanos

Promotor: Dr. Juan Carlos Andreu Ballester

Código del ensayo: APO-01-2015

¿Por qué hacemos este estudio?

Hay dos motivos fundamentales que justifican este estudio. El primero el conocimiento inmunológico básico de la posible diferencia en la apoptosis entre ambas subpoblaciones T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

Y segundo, los estudios clínicos que involucran a los linfocitos según sus receptores TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ son escasos, pero van en aumento. Entre ellos la inmunodeficiencia congénita o adquirida es un objetivo del estudio, involucrando la apoptosis como mecanismo de aquella.

¿Por qué han pensado en incluirle en el estudio?

Hasta el momento actual no se ha estudiado la apoptosis en sujetos sanos en número extenso de pacientes. Sería muy conveniente el conocimiento de la apoptosis en personas sanas como medio de control en las diferentes patologías estudiadas en un futuro.

¿Qué le pedimos que haga?

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Un médico se pondrá en contacto con Ud. Le pedimos que done una muestra de sangre para estudios del sistema inmunitario. Durante el ensayo se extraerán a cada voluntario una muestra de sangre (aproximadamente 10-15 ml). Las muestras se analizarán en los laboratorios de Hematología y Citometría de Flujo del Hospital Arnau de Vilanova. Las características de los análisis realizados no permiten que las muestras puedan almacenarse, por lo que una vez realizadas todas las determinaciones, el sobrante de sus muestras (si lo hubiere) será destruido conforme a la reglamentación en vigor.

Durante el ensayo se realizarán los siguientes análisis:

Cálculo de las subpoblaciones linfocitarias: LT $\alpha\beta$, LT CD4+ $\alpha\beta$, LT CD3+CD8+ $\alpha\beta$, LT CD56+ $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$, LT CD4+ $\gamma\delta$, LT CD8+ $\gamma\delta$, LT CD56+ $\gamma\delta$.

- Proporción LT vírgenes y T de memoria.

- Apoptosis

- Hemograma

Todos los datos personales se guardarán de forma codificada.

¿Qué pasará con la muestra?

Una vez realizadas todas las determinaciones, el sobrante de sus muestras (si los hubiere) será destruido conforme a la reglamentación en vigor.

¿Existen riesgos o efectos secundarios?

Las muestras de sangre se recogerán durante un análisis de sangre habitual del ensayo. Los posibles efectos adversos son los típicos de una extracción de sangre por venopunción.

¿Cuál es el beneficio para mí de la cesión de la muestra de sangre?

Usted no obtendrá ningún beneficio directo pero la investigación podría ser útil para futuros pacientes. Teniendo en cuenta que la investigación tardará algún tiempo hasta las conclusiones finales, no recibirá ningún resultado del análisis.

¿Cómo se protegerá mi privacidad?

Para garantizar la privacidad de su identidad, todas sus muestras se etiquetarán con un número en vez de con su nombre. Estas muestras estarán en consonancia con su información sanitaria del estudio. No se harán análisis de otras enfermedades genéticas. No se le comunicarán los resultados de este análisis. Tampoco quedará constancia en sus documentos médicos. Los estudios como este solo proporcionan información acerca de las razones de la aparición de las enfermedades en grupos especiales de pacientes.

Los investigadores mantendrán la confidencialidad de sus datos sanitarios recabados conforme a lo establecido en la legislación vigente en España en lo relativo al tratamiento de muestras biológicas en investigación (LIB14/2007 y RD 1716/2011).

Los datos obtenidos en estas investigaciones no se le proporcionarán porque se consideran exploratorios y/o preliminares. Esto quiere decir que no están pensados para tomar decisiones clínicas y que no deben utilizarse para guiar su diagnóstico, pronóstico o cuidado médico. En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información general acerca de los estudios de investigación en los que hayan utilizado las muestras.

Si abandona el ensayo, se puede seguir usando la información recabada sobre usted hasta ese momento.

8.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Datos del participante

Nombre:

Persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento

Nombre:

1. Declaro que he leído la Hoja de Información al Voluntario sobre el estudio citado y acepto participar en él.
2. Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al Voluntario y una copia de este Consentimiento Informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos del mismo.
3. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

4. Sé que se mantendrá la confidencialidad de mis datos.

5. El consentimiento lo otorgo de manera voluntaria y sé que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del mismo, por cualquier razón.

DOY _

NO DOY _

Mi consentimiento para la participación en el estudio propuesto

Fecha:

Firma del paciente:

Hago constar que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus riesgos y beneficios potenciales a la persona cuyo nombre aparece escrito más arriba. Esta persona otorga su consentimiento por medio de su firma fechada en este documento

Fecha:

Firma del Investigador o la persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento: