



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Estudio celular de la inmunosenescencia en adultos mayores vacunados y en pacientes con cáncer de mama**

**Ivon Johanna Rodríguez Rodríguez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Bogotá, Colombia  
02 de Junio 2021



# **Estudio celular de la inmunosenescencia en adultos mayores vacunados y en pacientes con cáncer de mama**

**Ivon Johanna Rodríguez Rodríguez**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctora en Ciencias Biomédicas**

Director (a):

Doctor Carlos Alberto Parra López, MD, PhD.

Línea de Investigación:

Fundamentos de inmunidad y Medicina experimental

Grupo de Investigación:

Inmunología y Medicina Traslacional

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Doctorado en Ciencias Biomédicas

Ciudad, Colombia

02 de Junio 2021



*Dedicada a la memoria de mi Papá Gesman.*



# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

---

Nombre: Ivon Johanna Rodríguez Rodríguez

Fecha 18/08/2021

## **Agradecimientos**

A mi familia, mi mamá, mi esposo y mis hermanos por su amor, apoyo incondicional y soporte durante los momentos más difíciles de este proceso. A mi amada hija Elena y a mi sobrina Mariana que llegaron para llenar de amor nuestra familia.

Al Dr. Carlos Alberto Parra mi director, por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo cuando más la necesitaba, por creer y confiar en mí. Por sus enseñanzas no solo como inmunólogo, sino como jefe y ser humano.

A mis compañeros de laboratorio: Manuela y Nicolás por enseñarme a hacer el trabajo de laboratorio con la mejor disposición, su amistad y apoyo incondicional. A Julián por su apoyo, amistad y revisión de texto. A Laura, Oscar, Esteban y Juan Pablo por su pilera, apoyo incondicional a mi trabajo, y por su dedicación para hacer las revisiones sistemáticas. Diego y David Santiago por su amistad. Sin ustedes no lo había podido lograr.

A David Bernal por su orientación para el desarrollo del trabajo de investigación y el análisis de los resultados (especialmente, en el análisis automatizado). Por su amistad y buena disposición para enseñar siempre.

A todos los profesores del Departamento de Movimiento Corporal Humano por el apoyo para obtener mi comisión de estudios y muy especialmente a la Profesora Beatriz Mena quien me ayudo a sobrellevar el peso de esta responsabilidad.

A las personas que fueron confidentes y me brindaron su consejo desinteresado en los momentos difíciles, especialmente al Dr. Miguel Martínez, Dr. Jean Paul Vernot, Natalia y Mauricio.

## Resumen

### **Estudio celular de la inmunosenescencia en adultos mayores vacunados y en pacientes con cáncer de mama**

**Introducción:** La mejora continua de las condiciones de saneamiento básico ha aumentado la esperanza de vida de la población en la mayoría de los países, lo que se traduce en una mayor prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles. El envejecimiento es un proceso heterogéneo de salud-enfermedad caracterizado por el deterioro progresivo de la capacidad funcional de las células que componen el organismo, incluidas las que componen el sistema inmune. Este deterioro de las células compromete la capacidad proliferativa, promueve la detención del ciclo celular, la expresión de marcadores asociados con la senescencia y el agotamiento, la producción de citocinas pro y antiinflamatorias y la acumulación de células senescentes. Además, el envejecimiento del sistema inmune (inmunosenescencia) se ha asociado con una menor capacidad de respuesta a la vacunación (parcialmente explicado por cambios en la frecuencia y fenotipo de los LT CD4+ foliculares helper (LTfh)) y una mayor susceptibilidad al cáncer, causado por inmunovigilancia deficiente del tumor.

**Materiales y Métodos:** Para identificar el perfil de inmunosenescencia y su relación con una respuesta inmune deficiente a la vacunación y una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades como el cáncer, se analizó mediante citometría de flujo multiparamétrica el perfil fenotípico y funcional de diferentes subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica de tres grupos de voluntarios: (i) adultos mayores sanos, (ii) adultos mayores sanos vacunados con toxoide tetánico y (iii) mujeres con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia. Los datos recolectados se analizaron manualmente utilizando el software de análisis FlowJo y mediante algoritmos automatizados de reducción de dimensionalidad (t-SNE) y agrupamiento no supervisado (FlowSOM y CITRUS). Este

protocolo fue aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia No. 008-063.

**Resultados:** (i) Los adultos sanos exhiben un incremento de monocitos proinflamatorios con una disminución en la respuesta al estímulo inflamatorio, y un número mayor de poblaciones senescentes de células asesinas naturales y linfocitos T, (ii) Los adultos mayores tienen una menor expansión de LTfhc después de la vacunación contra toxoide tetánico que los jóvenes, y una menor expresión de Bcl-6, CXCR3 y CD40L, moléculas importantes para la diferenciación de LTfhc y su interacción en los centros germinales con linfocitos B y (iii) las pacientes con cáncer de mama prequimioterapia exhiben cambios en la frecuencia y el fenotipo de diferentes poblaciones de leucocitos con características de inmunosenescencia y agotamiento celular, que pueden estar afectando su capacidad de inmunovigilancia. Después de la quimioterapia neoadyuvante hay cambios asociados con inmunomodulación, pero también un incremento en marcadores de senescencia.

**Conclusiones:** Encontramos cambios asociados con la inmunosenescencia que podrían aumentar la susceptibilidad de los adultos mayores a enfermedades crónicas no transmisibles, infecciones y cáncer, una menor capacidad de expansión de Tfh en adultos mayores como lo demuestra la respuesta de vacunación al toxoide tetánico. Y en pacientes con cáncer de mama, las características de inmunosenescencia de los leucocitos pueden estar asociadas con un mecanismo de escape del tumor. Además, la quimioterapia podría tener un papel ambiguo sobre los leucocitos, por un lado, generando cambios funcionales para favorecer la reactivación de la inmunovigilancia y, por otro, aumentando la senescencia en las células asesinas naturales y los Linfocitos T.

**Palabras clave:** (Inmunosenescencia, Agotamiento de LT, Citometría de Flujo, Cáncer de mama, Toxoide tetánico).

## Abstract

### **Cellular study of immunosenescence in vaccinated older adults and patients with breast cancer**

**Introduction:** The continuous improvement of sanitation conditions has increased the population's life expectancy (aging) and the higher prevalence of chronic non-communicable diseases in most countries. Aging is a heterogeneous health-disease process characterized by the progressive deterioration of the functional capacity of the cells that make up the body, including those that make up the immune system. This deterioration on cells compromise proliferative capacity, promote cell cycle arrest, the expression of markers associated with senescence and depletion, the production of pro-and anti-inflammatory cytokines, and the accumulation of senescent cells. In addition, aging of the immune system (Immunosenescence) has been associated with a lower capacity to respond to vaccination (partially explained by changes in the frequency and phenotype of CD4 + T follicular helper cells (LTfh)) and greater susceptibility to cancer, caused by poor immunosurveillance of the tumor.

**Materials and Methods:** To identify the immunosenescence profile and its relationship with an inadequate immune response to vaccination and greater susceptibility to the development of diseases such as cancer, the phenotypic and functional profile of different subpopulations of leukocytes was analyzed using multiparametric flow cytometry in peripheral blood samples from three groups of volunteers: (i) healthy older adults, (ii) healthy older adults vaccinated with tetanus toxoid, and (iii) women with breast cancer before and after chemotherapy. The collected data were analyzed manually using FlowJo analysis software and automated algorithms for dimensionality reduction (t-SNE) and unsupervised clustering (FlowSOM and CITRUS). This protocol was approved by the ethics committee of Universidad Nacional de Colombia No. 008-063.

**Results:** (i) Healthy older adults show an increase in pro-inflammatory monocytes with a decrease in response to the inflammatory stimulus and increased natural killer and T

senescent cells number of senescent populations *(ii)* Older adults showed less expansion of TFH after vaccination against tetanus toxoid than young people, and a lower expression of Bcl-6, CXCR3, and CD40L, essential molecules for the differentiation of TFH and its interaction in the germinal centers with B lymphocytes and *(iii)* the patients with pre-chemotherapy breast cancer exhibits changes in the frequency and phenotype of different populations of leukocytes with characteristics of immunosenescence and cellular depletion, which may be affecting their immunosurveillance capacity. post-chemotherapy, there are changes associated with immunomodulation, but also an increase in senescence markers.

**Conclusions:** We found changes associated with immunosenescence that could increase the susceptibility of older adults to chronic non-communicable diseases, infections, and cancer — a lower expansion capacity of TFH in older adults as shown by vaccination response to tetanus toxoid. And in patients with breast cancer, the immunosenescence characteristics of leukocytes may be associated with a tumor escape mechanism. Furthermore, chemotherapy could have an ambiguous role on leukocytes, on the one hand, generating functional changes to favor the reactivation of immunosurveillance and, on the other, increasing senescence in natural killer cells and T cells.

**Keywords:** (Immunosenescence, T cells exhaustion, Flow Cytometry, Breast cancer, Tetanus toxoid).

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Lista de Figuras Suplementarias</b> .....	<b>XX</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>XXI</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Diseño experimental .....	6
Universo de estudio y selección de la muestra poblacional .....	6
Citometría de flujo .....	7
<b>Capítulo 1: Marcadores de senescencia en células de los componentes del sistema inmune innato y adaptativo en adultos mayores sanos</b> .....	<b>11</b>
1.1 Estado del arte .....	11
1.1.1 Inmunosenescencia .....	12
1.2 Materiales y métodos .....	29
1.2.1 Participantes .....	29
1.2.2 Separación de PBMCs .....	29
1.2.3 Evaluación <i>ex vivo</i> .....	30
1.2.4 Estimulación de TLRs .....	30
1.2.5 Serología CMV .....	30
1.2.6 Maduración de células dendríticas .....	30
1.2.7 Medición de citoquinas por CBA .....	31
1.2.8 Linfocitos T .....	32
1.2.9 Citometría de flujo .....	32
1.2.10 Análisis estadístico .....	32
1.3 Resultados .....	32
1.3.1 Los adultos mayores exhiben un incremento de monocitos intermedios y no clásicos. ....	32
1.3.2 Expresión de TLRs en monocitos en respuesta al estímulo <i>in vitro</i> con sus agonistas .....	33
1.3.3 Los monocitos de los adultos mayores producen una menor cantidad de citoquinas cuando son estimulados con agonistas de TLRs .....	36
1.3.4 Se detectan diferencias asociadas a la edad en la respuesta a un estímulo proinflamatorio de DCs inmaduras. ....	37

1.3.5	Incremento de las células natural killer (NK) circulantes en los adultos mayores.	40
1.3.6	Cambios en la expresión de receptores de NKs con la edad.....	41
1.3.7	El análisis multidimensional evidenció diferencias en la distribución de poblaciones de NKs entre adultos mayores y jóvenes. ....	42
1.3.8	Las poblaciones identificadas en FlowSOM se confirmaron en el análisis automatizado con CITRUS. ....	43
1.3.9	Disminución de las subpoblaciones vírgenes de LT en los adultos mayores. ....	44
1.3.10	Los LT CD8 vírgenes expresan marcadores de senescencia. ....	45
1.3.11	Análisis automatizado de subpoblaciones de LT por FlowSOM y CITRUS....	46
1.3.12	Influencia de las diferencias sexuales en la distribución de diferentes poblaciones de leucocitos. ....	48
1.4	Discusión .....	51
 <b>Capítulo 2. Respuesta a la vacunación de linfocitos T CD4+ Foliculares Helper (LTfh) en individuos adultos mayores sanos.....</b>		
1.5	Estado del arte.....	59
1.5.1	Linfocitos T Foliculares Helper (LTfh) .....	60
1.5.2	LTfhc y la respuesta a las vacunas durante la vejez.....	61
1.6	Materiales y métodos.....	65
1.6.1	Participantes .....	65
1.6.2	Separación de PBMCs .....	66
1.6.3	Evaluación de LTfh.....	66
1.6.4	Citometría de flujo .....	67
1.6.5	Análisis estadístico.....	67
1.7	Resultados.....	67
1.7.1	Disminución de los LT vírgenes CD4+ en los adultos mayores .....	67
1.7.2	Expansión de LTfhc después de la vacunación con Toxoide tetánico .....	68
1.7.3	Los LTfhc de jóvenes tienen una mayor expansión en comparación con los adultos mayores cuando se aplica un segundo estímulo <i>in vitro</i> . ....	70
1.7.4	Los LTfhc vírgenes expanden en respuesta a la estimulación con el antígeno en adultos jóvenes, pero no en adultos mayores. ....	71
1.7.5	Análisis automatizado utilizando CITRUS confirmó la expansión de LTfhc vírgenes en jóvenes.....	72
1.7.6	Análisis multidimensional con FlowSOM identifica una población folicular que está aumentada en los adultos mayores.....	73
1.8	Discusión .....	74
 <b>Capítulo 3. Deficiencia funcional de Linfocitos T (LT) y células presentadoras de antígeno (APC) en mujeres con cáncer de mama con un fenotipo inmunosenescente y su respuesta a la terapia neoadyuvante.....</b>		
1.9	Estado del arte.....	78
1.9.1	Senescencia celular .....	79
1.9.2	Inmunovigilancia e inmunoedición del cáncer.....	81
1.9.3	Inmunosenescencia y cáncer .....	82
1.9.4	Quimioterapia neoadyuvante e inmunovigilancia.....	85
1.10	Materiales y métodos.....	87
1.10.1	Tipo de estudio y diseño experimental .....	87
1.10.2	Participantes .....	87

---

1.10.3 Separación de PBMCs.....	88
1.10.4 Evaluación ex vivo de subpoblaciones.....	88
1.10.5 Generación <i>in situ</i> de DCs maduras a partir de monocitos .....	89
1.10.6 Expresión de marcadores de agotamiento/senescencia en LT e internalización del CD3.....	89
1.10.7 Fosforilación de ZAP70 y expresión de Ki-67 en LT CD8 .....	90
1.10.8 Citoquinas intracelulares en LT CD8.....	90
1.10.9 Expresión de p21, p16 y $\beta$ -galactosidasa en LT .....	90
1.10.10 Citometría de flujo.....	91
1.10.11 Análisis estadístico .....	91
1.11 Resultados .....	91
1.11.1 Poblaciones celulares de monocitos después de la quimioterapia neoadyuvante con esquema A/C.....	91
1.11.2 Maduración de células dendríticas derivadas de monocitos.....	95
1.11.3 Evaluación de poblaciones de NKs y la expresión de receptores inhibitorios y activadores.....	98
1.11.4 Análisis funcional del compartimiento de LT en pacientes con cáncer de mama. 101	
1.11.5 Asociación de la capacidad de maduración de DCs y la internalización del CD3 con la respuesta clínica.....	103
1.11.6 Los LT CD8 efectores terminales exhiben una disminución en la capacidad proliferativa.....	104
1.11.7 Polifuncionalidad de los LT CD8 vírgenes después de la quimioterapia .....	105
1.11.8 Diferencias en la detección de subpoblaciones de LT CD4+ y LT CD8+ en pacientes con cáncer de mama.....	107
1.11.9 La quimioterapia induce una disminución del fenotipo de agotamiento en LT CD4+ y LT CD8+ detectado en pacientes con cáncer previo al tratamiento. ....	108
1.11.10 Aumento en la expresión de CD57 en LT CD4+ después de la quimioterapia.....	109
1.11.11 Análisis de alta dimensión de citometría de flujo en LT.....	112
1.11.12 Análisis de identificación por clúster a través de FlowSOM .....	113
1.11.13 Expresión de $\beta$ -gal, p16, p21 en LT CD4+ y CD8. ....	116
1.12 Discusión .....	117
<b>Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>131</b>
1.13 Conclusiones.....	131
1.14 Perspectivas.....	134
<b>Bibliografía .....</b>	<b>135</b>
<b>A. ANEXO 1. Material suplementario.....</b>	<b>147</b>
<b>B. ANEXO 2. PRODUCTOS ACADEMICOS.....</b>	<b>155</b>
<b>Artículos científicos:.....</b>	<b>155</b>
<b>Socialización de resultados en eventos científicos:.....</b>	<b>156</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Estrategia metodológica .....	8
Figura 2. Resumen de la estrategia de análisis utilizada en cada subpoblación celular.....	10
Figura 3. Esquema de maduración de células dendríticas derivadas de monocitos.....	31
Figura 4. Subpoblaciones de monocitos. ....	33
Figura 5. Cambios en la expresión del TLR4 después de la estimulación con LPS. ....	35
Figura 6. Cambios en la expresión de TLRs después de la estimulación de monocitos con los agonistas de TLR2, TLR3 y TLR9. ....	35
Figura 7. Los monocitos de adultos mayores son menos respondedores a la estimulación de los TLRs. ....	37
Figura 8. Cambios en la expresión de marcadores de maduración de las DCs.....	39
Figura 9. Cambios en la secreción de citoquinas en células dendríticas maduras de jóvenes y adultos mayores.....	40
Figura 10. Cambios en células NKs asociados a la edad.....	40
Figura 11. Jóvenes y adultos mayores exhiben diferencias en la expresión de receptores en subpoblaciones de NKs. ....	41
Figura 12. Análisis de subpoblaciones de NKs por FlowSOM.....	43
Figura 13. Fenotipo y abundancia de los clústeres asociados al fenotipo NKs en jóvenes y adultos mayores.....	44
Figura 14. Cambios en las poblaciones de memoria de LT con el envejecimiento.....	45
<i>Figura 15.</i> Expresión de marcadores de senescencia en las poblaciones de memoria de LT CD8+.....	46
<i>Figura 16.</i> Análisis automatizado de LT por Flow SOM.....	47
Figura 17. Fenotipo y abundancia del clúster identificado en LT.....	47
Figura 18. Los hombres adultos mayores tienen un mayor porcentaje de monocitos intermedios en comparación con las mujeres de edad avanzada. ....	49
Figura 19. Hombres y mujeres exhiben diferencias en el porcentaje de células NKs.....	50
Figura 20. Diferencias asociadas al sexo y a la edad en la distribución de distintas subpoblaciones de LT.....	51

---

Figura 21. Estado del componente CD4+ en adultos mayores. ....	68
Figura 22. Estado componente LTfhc en respuesta a la vacunación.....	69
Figura 23. Después de la vacunación con toxoide los LTfhc incrementan la expresión de Bcl-6 y CXCR3 en jóvenes, pero no en adultos mayores. ....	70
Figura 24. Expansión de LTfhc vírgenes en jóvenes después de la vacunación.....	72
Figura 25. Fenotipo y abundancia de los clústeres asociados al fenotipo LTfhc en jóvenes y adultos mayores. ....	73
Figura 26. Identificación de un clúster LTfhc CD4- que esta aumentado en los adultos mayores. ....	74
Figura 27. Modelo de la respuesta de adultos mayores a la vacuna con Toxoide tetánico.	77
Figura 28. Frecuencia de monocitos totales y expresión de HLA-DR y PD-L1 en mujeres con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia.....	93
Figura 29. Frecuencia de las subpoblaciones de monocitos y porcentaje de monocitos expresando HLA-DR y PD-L1 en mujeres con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia. ....	94
Figura 30. Estrategia de análisis para la evaluación de la maduración de células dendríticas estándar derivadas de monocitos. ....	96
Figura 31. Las DCs derivadas de monocitos de las pacientes con cáncer de mama antes de la quimioterapia exhiben una limitada capacidad de maduración en respuesta a la estimulación <i>in vitro</i> . ....	97
Figura 32. Respuesta al estímulo proinflamatorio de DCs inmaduras originadas a partir de dos subpoblaciones de monocitos definidas por la expresión diferencial de CD14 y CD16. ....	97
Figura 33. Evaluación de células NKs, subpoblaciones y expresión de receptores inhibitorios y activadores. ....	99
Figura 34. Reducción de dimensionalidad mediante tSNE. ....	100
Figura 35. Análisis multiparamétrico de NKs con FlowSOM. ....	101
Figura 36. La estimulación <i>in vitro</i> de PBMCs evidencia una deficiente capacidad funcional medida por la internalización del TCR en LT de pacientes con cáncer de mama. ....	102
Figura 37. Relación de la internalización del TCR y la expresión de CD83 en DCs con la respuesta clínica.....	104
Figura 38. Disminución en la capacidad proliferativa de LT CD8.....	105
Figura 39. Los LT CD8 vírgenes exhiben polifuncionalidad después de la terapia neoadyuvante. ....	106
Figura 40. Distribución de las distintas subpoblaciones de memoria en LT CD4+ y LT CD8+. ....	107

Figura 41. Cambios en la expresión de marcadores de agotamiento en LT CD4+ y CD8....	109
Figura 42. Cambios en la expresión de marcadores de senescencia en LT CD4+ y CD8. ..	110
Figura 43. Marcadores de agotamiento y senescencia en las subpoblaciones de memoria de LT CD4. ....	111
Figura 44. Marcadores de agotamiento y senescencia en las subpoblaciones de memoria de LT CD8. ....	112
Figura 45. Reducción mediante tSNE de dimensionalidad en LT.....	113
Figura 46. Análisis multiparamétrico de LT mediante FlowSOM. ....	115
Figura 47. La quimioterapia puede inducir características de envejecimiento molecular en LT. .....	116
Figura 48. Características de envejecimiento celular en las subpoblaciones de memoria de LT. .....	117
Figura 49. Modelo de senescencia en mujeres con cáncer de mama.....	130
Figura 50. Resumen de los cambios asociados a la edad y al cáncer de mama.....	133

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Numero de muestras de sangre periférica obtenidas de cada grupo .....	7
Tabla 2. Paneles de anticuerpos.....	9
Tabla 3. Características del envejecimiento inmunológico.....	14
Tabla 4. Características de las subpoblaciones de memoria reportadas en los estudios. ....	22
Tabla 5. Características de los estudios que reportaron marcadores de agotamiento y senescencia.....	24
Tabla 6. Características de los estudios que midieron citoquinas.....	26
Tabla 7. Características de los estudios que reportan la longitud de los telómeros. ....	28
Tabla 8. Comparación de las características de los LT agotados y senescentes.....	84
Tabla 9. Características clínicas de las pacientes. ....	88

## Lista de Figuras Suplementarias

Figura suplementaria 1. Cambios en la expresión del TLR2 después de la estimulación con Pam3CSK. ....	147
Figura suplementaria 2. Cambios en la expresión del TLR3 después de la estimulación con Poly I:C.....	148
Figura suplementaria 3. Cambios en la expresión del TLR9 después de la estimulación con CPG.....	149
Figura suplementaria 4. Expresión de marcadores de senescencia en las poblaciones de memoria de LT CD4+.....	150
Figura suplementaria 5. Los LTfhc vírgenes se expanden en respuesta a la estimulación del antígeno en los adultos jóvenes, pero no en los adultos mayores. ....	151
Figura suplementaria 6. Gráfica de validación del modelo predictivo de los clústeres LTfh identificados en Citrus.....	152
Figura suplementaria 7. Diferencia en la expresión de CD40 y HLA DR en monocitos después de la maduración de detriticas in vitro. ....	152
Figura suplementaria 8. Diferencia en la expresión de receptores en las subpoblaciones de NKs.....	153
Figura suplementaria 9. Análisis de reducción de dimensionalidad mediante tSNE.....	153
Figura suplementaria 10. Modelo de internalización del CD3.....	154

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Termino	Abreviatura	Termino
<b>A/C</b>	Antraciclina Ciclofosfamida	<b>E2F</b>	E2 factor
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>EBV</b>	Epstein Barr Virus
<b>AINEs</b>	Antiinflamatorios no esteroideos	<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase	<b>EM</b>	Linfocito T de memoria efectora
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno	<b>EMT</b>	Transición epitelio mesenquimal
<b>ARF</b>	Transcription factor alternative reading frame	<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>BATF</b>	Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like	<b>FlowSOM</b>	Flow Self-Organizing Maps
<b>Bcl-6</b>	B-cell lymphoma 6 protein	<b>FMO</b>	Fluorescencia menos uno
<b>BCR</b>	Receptor de células B	<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonia granulocito macrófago
<b>BFA</b>	Brefeldina A	<b>HDM2</b>	Human double minute 2 homolog
<b>CBA</b>	Cytometric Bead Array	<b>HER2/neu</b>	Human epidermal growth factor receptor 2
<b>CD</b>	Clúster de diferenciación	<b>HIV</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>CDK</b>	Cyclin-dependent kinases	<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>CF</b>	Citometría de Flujo	<b>HLA-DR</b>	Antígeno leucocitario humano - isotipo DR
<b>CG</b>	Centro germinal	<b>HMGB-1</b>	High mobility group box 1
<b>CITRUS</b>	Cluster identification, characterization, and regression	<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>CM</b>	Linfocito T de memoria central	<b>I&amp;MT</b>	Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional
<b>Cmaf</b>	Transcription factor musculoaponeurotic fibrosarcoma	<b>iDCs</b>	Células dendríticas inmaduras
<b>CMV</b>	Citomegalovirus	<b>IDO</b>	Indolamina 2,3- dioxigenasa
<b>CPG</b>	Citosina-fosfato-guanina	<b>IFN</b>	Interferón
<b>CRT</b>	Calreticulina	<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>CTL</b>	Linfocitos T citotóxicos	<b>IL</b>	Interleuquina
<b>CTLA4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	<b>IRF</b>	Interferon-regulatory factor
<b>DAMP</b>	Damage associated molecular patterns	<b>KLRG1</b>	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
<b>DC</b>	Célula dendrítica	<b>LAG3</b>	Lymphocyte activation gene 3 protein
<b>DDR</b>	ADN damage response (Respuesta al daño del ADN)	<b>LB</b>	Linfocito B
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfoxido	<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>E</b>	Linfocito T efector	<b>LT</b>	Linfocito T

<b>Abreviatura</b>	<b>Termino</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Termino</b>
<b>LT <math>\gamma\delta</math></b>	Linfocitos T gamma delta	<b>PerCP</b>	Clorofila de peridina
<b>LT-CD4+</b>	Linfocito T CD4+	<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>LT-CD8+</b>	Linfocito T CD8+	<b>PMA</b>	phorbol myristate acetate
<b>LTFH</b>	Linfocito T folicular helper	<b>pMHC</b>	Complejo MHC - péptido
<b>LTreg</b>	Linfocito T regulador	<b>Poly I:C</b>	Polyinosinic:polycytidylic acid
<b>LTscm</b>	Linfocitos T de memoria tipo stem cell	<b>pRB</b>	Proteína de Retinoblastoma
<b>M-CSF</b>	Factor estimulador de colonia de monocitos	<b>RCB</b>	<i>Residual Cancer Burden</i>
<b>mDCs</b>	células dendríticas mieloides	<b>SAHF</b>	Senescence-associated heterochromatin foci
<b>MDSC</b>	Myeloid-derived suppressor cells	<b>SAP</b>	Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein
<b>MFI</b>	Mean fluorescence intensity	<b>SAPS</b>	Senescence-associated secretory phenotype
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>moDCS</b>	Células dendríticas derivadas de monocitos	<b>STAT-3</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription-3
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response 88	<b>stDCs</b>	Células Dendríticas estándar
<b>N</b>	Linfocito T Naïve (Linfocito T virgen)	<b>Tab1</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase 7-interacting protein 1
<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>	Factor Nuclear Kappa Beta	<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>NK</b>	Linfocitos asesinos naturales	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>NKG2D</b>	Natural killer group 2 member D	<b>TIL</b>	Linfocitos infiltrantes de tumor
<b>NKp30</b>	Natural killer protein 30	<b>TIM3</b>	T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>TIR</b>	Toll/interleukin-1 receptor
<b>p16/CDKN2A</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>p21/CDKN1A</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1	<b>TME</b>	Microambiente tumoral
<b>Pam3CSK4</b>	Pam3CysSerLys4	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos	<b>TRIF</b>	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
<b>PBMC</b>	Pheripheral blood Mononuclear Cells	<b>tSNE</b>	t-distributed stochastic neighbor embedding
<b>PD1</b>	Programmed cell death protein 1	<b>TT</b>	Toxoide tetánico
<b>PDCs</b>	células dendríticas plasmacitoides	<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento de vénulas y endotelio
<b>PD-L1</b>	Programmed death-ligand 1	<b><math>\beta</math>-gal</b>	Beta galactosidasa
<b>PE</b>	Ficoeritrina		

## Introducción

El crecimiento de la población mundial ha sido acompañado de un incremento en la esperanza de vida. En este momento, el 10% de la población corresponde a adultos mayores de 60 años y se calcula que para el 2050 el porcentaje será del 21%, es decir, un aumento de 600 a 2000 millones de adultos mayores (persona de 60 años o más edad (1)) (2). La población colombiana sigue la tendencia de los países desarrollados como resultado de avances tecnológicos y científicos, mejores condiciones de saneamiento básico y salud, con una mejora en la esperanza de vida al nacer y mayor supervivencia de personas mayores de 60 años. En el año 2013 en el país habían 4.962.491 de adultos mayores (10.53% del total de la población) y se estimaba una tasa de crecimiento de 3,76% para el año 2020, la más alta de la población total. Estos cambios en la dinámica poblacional demandan nuevas políticas de salud pública y destinación de un mayor presupuesto para el sistema de seguridad social en salud, debido a la susceptibilidad de la población mayor a sufrir enfermedades crónicas no transmisibles e infecciones (3). Como se ha demostrado con la alta incidencia de morbi-mortalidad por covid-19 en este grupo poblacional en nuestro país.

El envejecimiento produce cambios en las células y tejidos que afectan el desempeño de los diferentes órganos y sistemas biológicos. El sistema inmune al igual que otros sistemas sufre cambios con el envejecimiento lo cual favorece por un lado, una mayor susceptibilidad a las infecciones por ciertos patógenos, y por el otro, el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles responsables de la alta morbilidad como enfermedades cardiovasculares, el cáncer y enfermedades autoinmunes (4). La efectiva competencia del sistema inmune a lo largo de la vida para responder a múltiples patógenos es resultado del trabajo coordinado de la inmunidad innata y adaptativa (5). Durante el envejecimiento estos dos componentes del sistema inmune experimentan cambios en el fenotipo y función de diferentes poblaciones celulares conocidos como inmunosenescencia.

La inmunosenescencia es un proceso que se ha caracterizado principalmente por: (i) Incapacidad para responder a nuevos agentes infecciosos, (ii) respuestas de linfocitos de memoria no sostenidas, (iii) Disminución de las poblaciones de linfocitos vírgenes o inmaduros y aumento de los linfocitos terminalmente diferenciados, y (iv) una inflamación crónica de bajo grado, definida en inglés con el término “*inflammaging*” (6, 7).

En la última década, abundante evidencia científica señala que el envejecimiento del sistema inmune está asociado a cambios en el fenotipo y función de distintos subtipos de leucocitos como monocitos, neutrófilos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK) linfocitos T y linfocitos B (8). En la actualidad, se considera que el envejecimiento de las células del sistema inmune es responsable de una susceptibilidad inmunológica que predispone a individuos de la tercera edad a una menor capacidad de respuesta a las vacunas y a una mayor incidencia de enfermedades infecciosas con altas tasas de mortalidad (9). Así mismo, la inmunosenescencia está asociada a un mayor riesgo de desarrollo de cáncer con la edad, lo cual puede estar asociado a la deficiente capacidad de eliminar células senescentes y apoptóticas, que favorece la acumulación de células con capacidad de secretar factores que estimulan la tumorigénesis (2, 10, 11). A pesar de estas observaciones alrededor del probable efecto que tiene la inmunosenescencia en la morbi-mortalidad del adulto mayor, no existe información precisa acerca de las bases celulares del envejecimiento de las células del sistema inmune en la población general y menos en nuestra población. A pesar de la enorme investigación en el área aun es necesario profundizar y esclarecer cuestiones como: (i) Identificar bio-marcadores celulares que permitan tipificar un fenotipo senescente; (ii) establecer si hay relación entre inmunosenescencia y agotamiento inmune; (iii) investigar el papel que puede jugar la inmunosenescencia en cáncer y (iv) describir características senescentes en los leucocitos que pueden afectar la respuesta del adulto mayor a las vacunas, son preguntas pendientes por resolver y cuyas respuestas son importantes para el diseño de estrategias a salvaguardar la calidad de vida y la salud de individuos de la tercera edad. En este proyecto fueron diseñados una serie de experimentos orientados a: (i) monitorear cambios de inmunofenotipo de algunas poblaciones de leucocitos asociadas a la edad; (ii) examinar respuesta alteraciones en las células del sistema inmune del adulto mayor que quizás expliquen la respuesta deficiente de estos individuos a la vacunación; (iii) identificar un fenotipo celular senescente que predisponga al desarrollo del cáncer de mama, y (iv)

evaluar si el fenotipo celular senescente en estas pacientes es reversible en pacientes que experimentan una respuesta clínica favorable al tratamiento antitumoral.

En Colombia, existe el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) que “tiene como objetivo la eliminación, erradicación y control de las enfermedades inmunoprevenibles en el país” (12). En Bogotá, se realiza la vacunación contra influenza estacional de manera gratuita en adultos mayores de 60 años (identificado como grupo de alto riesgo) (12). Además de la influenza, dentro del esquema nacional de vacunación, las vacunas recomendadas para la tercera edad son tétanos y difteria, herpes zoster y neumococo (13). No obstante, pese a los programas de inmunización esta población sigue siendo de alto riesgo para el desarrollo de estas enfermedades, lo cual se atribuye al fenotipo senescente de su sistema inmune. Por esta razón, es necesario identificar marcadores y posibles blancos de inmunosenescencia terapéuticamente modificables, que quizás permitan mejorar la eficacia protectora de las vacunas en esta población (9). El grupo de inmunología y medicina traslacional (I&MT) ha realizado estudios comparando la respuesta a la vacuna contra el tétanos (TT) entre individuos jóvenes y adultos mayores de 65 años, en este último grupo, encontró una deficiente expansión de linfocitos T foliculares helper (LT<sub>fh</sub>), una población de linfocitos T CD4+ importante para la producción de anticuerpos (14). Con base en estos resultados, en una cohorte de voluntarios jóvenes y adultos mayores sanos que recibieron la vacuna contra TT, se comparó el grado de expansión de LT<sub>fh</sub> con fenotipo stem (LT<sub>scm</sub>) en respuesta a la vacunación *ex vivo* y en respuesta a la estimulación *in vitro* con el antígeno (TT) (15).

Por otro lado, en Colombia, la primera causa de muerte por cáncer en mujeres es el cáncer de mama con un 14% de mortalidad total (16) con una incidencia del cáncer que incrementa con la edad (17). Estudios realizados por el grupo de I&MT en pacientes con cáncer de mama han permitido identificar algunos marcadores en células dendríticas y Linfocitos T que sugieren disminuida capacidad funcional de estas células cuando se compara su desempeño funcional con las de mujeres sanas (18). De manera interesante, la deficiencia funcional de estas células en pacientes con cáncer de mama se recupera luego de la terapia antitumoral (19, 20). En la presente investigación nos propusimos evaluar si estos marcadores hacen parte de un fenotipo senescente y si marcadores sugestivos de senescencia descritos por otros investigaciones como: (i) la disminución de la población de LT vírgenes, (ii) incremento de monocitos con perfil proinflamatorio (21) y (iii) si linfocitos T efectores senescentes (detectados por la producción de B-galactosidasa

y aumento de p16 y p21), son características de LT de mujeres recién diagnosticadas con cáncer de mama y cómo evolucionan estos marcadores luego del tratamiento antitumoral. Consideramos, que un mejor entendimiento de los cambios fisiológicos que ocurren con el envejecimiento y la identificación de marcadores de senescencia de células del sistema inmune asociados a la aparición del cáncer de mama, quizás permitan mejorar las estrategias del tratamiento de estas pacientes.

Este estudio, es una investigación biomédica de carácter preclínico con un diseño experimental comparativo (22). Utilizando muestras de sangre periférica de varios grupos de estudio se analizaron diferentes subpoblaciones de leucocitos con el propósito de mejorar el conocimiento acerca de las bases celulares de la inmunosenescencia y su relación con la pobre respuesta a la vacunación y al cáncer de mama en nuestra población.

# Objetivos

## Objetivo general

Identificar marcadores celulares de inmunosenescencia que se correlacionen con la pobre respuesta a la vacunación en adultos mayores y a la susceptibilidad al cáncer de mama en mujeres.

## Objetivos específicos

1. Identificar marcadores de senescencia en células de los componentes del sistema inmune innato y adaptativo en adultos mayores sanos.
2. Analizar la respuesta a la vacunación de linfocitos T CD4+ Foliculares Helper (LTfh) en individuos adultos mayores sanos.
3. Asociar la deficiencia funcional de Linfocitos T (LT) y células presentadoras de antígeno (APC) en mujeres con cáncer de mama con un fenotipo inmunosenescente y su respuesta a la terapia neoadyuvante.

## Metodología

Este trabajo es una investigación biomédica con un diseño experimental comparativo (22). En este estudio, mediante muestras de sangre periférica de tres grupos de voluntarios se realizó el análisis de diferentes poblaciones de leucocitos con el propósito de mejorar el conocimiento acerca de las bases celulares de la inmunosenescencia y su relación con la respuesta a las vacunas y la susceptibilidad al cáncer de mama.

### Diseño experimental

En el presente proyecto de investigación se utilizaron PBMCs aisladas de sangre periférica, mediante ensayos *ex vivo* e *in vitro* se evaluaron marcadores asociados con senescencia en distintas células del sistema inmune. Los grupos de estudio fueron: (i) jóvenes y adultos mayores ( $\geq 60$  años) sanos, (ii) jóvenes y adultos mayores ( $\geq 65$  años) sanos vacunados con toxoide tetánico y (iii) mujeres con cáncer de mama y contrapartes sanas.

### Universo de estudio y selección de la muestra poblacional

Las instituciones donde se presentó el proyecto para la recolección de las muestras de estudio fueron: (i) Unisalud y Facultad de Medicina-UNAL (ii) Hospital Universitario Nacional de Colombia (HUN) y (iv) Instituto Nacional de Cancerología (INC). Después de la aprobación del protocolo de investigación en cada institución, las personas que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado y donaron muestras de sangre periférica de 60 ml/toma en tubos heparinizados previa asepsia y antisepsia. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Inmunología y Medicina traslacional de la Facultad de Medicina. Las PBMCs se obtuvieron mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll® hipaque; de acuerdo con la actividad experimental se analizaron *ex vivo* o fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido hasta su uso. Un registro del número de viales congelados, número de células por vial y viabilidad (evaluada con azul de tripán), fue registrado bajo un código en base de datos.

Muestra no probabilística por conveniencia: Las muestras obtenidas de los individuos voluntarios fueron utilizadas para hacer los ensayos experimentales.

Las muestras obtenidas de los individuos voluntarios correspondieron a los siguientes grupos:

**Tabla 1. Numero de muestras de sangre periférica obtenidas de cada grupo**

Grupo	# de sujetos
<b>Adultos mayores <math>\geq</math> 60 años sanos</b>	1 punto/tiempo (n= 10)
<b>Adultos jóvenes <math>\geq</math> 18 y hasta 30 años sanos</b>	1 punto/tiempo (n= 10)
<b>Adultos mayores <math>\geq</math> 65 años sanos vacunados (Toxoide Tetánico)</b>	3 puntos/tiempo (n= 5)
<b>Adultos jóvenes <math>\geq</math> 18 y hasta 30 años sanos vacunados (Toxoide Tetánico)</b>	3 puntos/tiempo (n= 5)
<b>Mujeres con cáncer de mama</b>	2 puntos/tiempo (n= 10)
<b>Mujeres sanas contrapartes de la misma edad de pacientes</b>	1 punto/tiempo (n= 10)
<b>Total</b>	80 muestras

## Citometría de flujo

En ensayos con PBMCs de individuos jóvenes e individuos  $\geq 60$  años se compararon:

**Primero:** Las subpoblaciones de monocitos que expresan diferencialmente los marcadores (CD14 y CD16), la respuesta de monocitos a dos tipos de estímulo proinflamatorio (agonistas de TLRs y citoquinas proinflamatorias), mediante la producción de citoquinas por CBA, la expresión de TLR 2, 3, 4 y 9, y el grado de diferenciación de monocitos a DCs maduras midiendo la expresión de HLA-DR, CD83, CD80 y CD40.

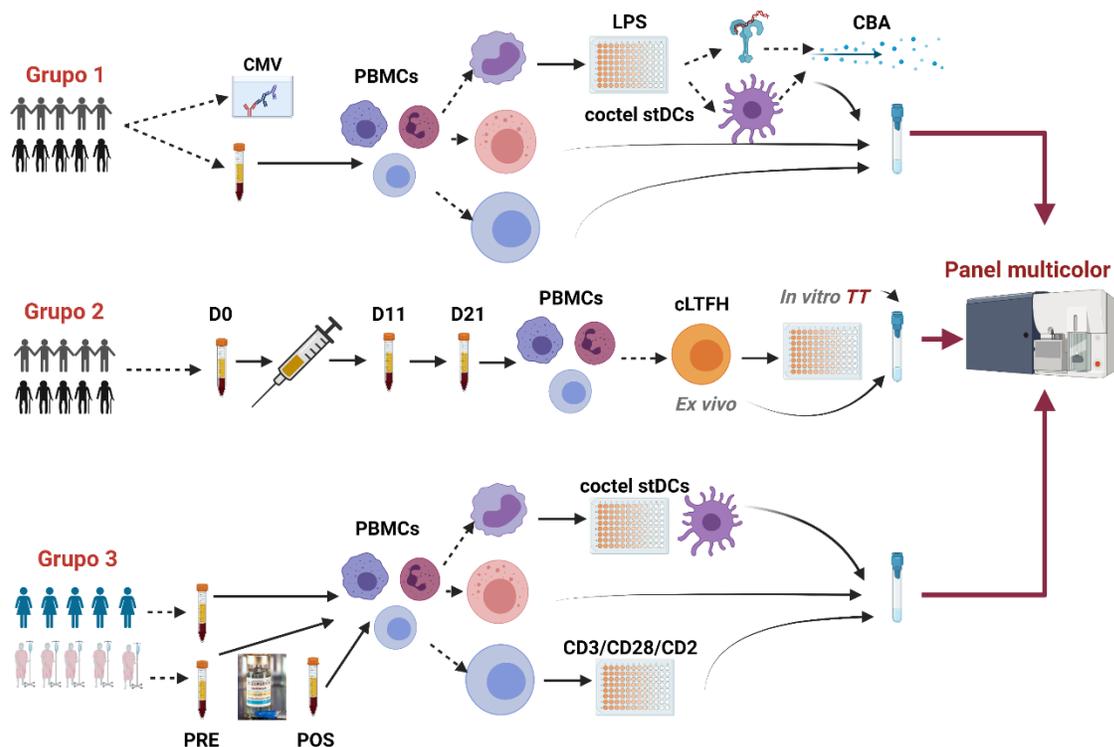
**Segundo:** Las subpoblaciones de NKs (CD56/CD16) y la expresión de marcadores asociados con senescencia y activación de NKs como CD57, NKG2D, NKp30 y KLRG1.

**Tercero:** La expresión diferencial de los marcadores: KLRG1 y CD57 en células vírgenes, de memoria y efectoras (determinadas por la expresión diferencial de los marcadores (CD45RA y CD62L) en Linfocitos T (CD3+) tanto CD4+ como CD8+.

En el grupo que recibió la vacuna con TT se evaluó el compartimento de LT CD4+ y el grado de expansión de LTfh *ex vivo* en respuesta a la vacunación e *in vitro* en respuesta a la estimulación con el antígeno (TT).

Finalmente, en leucocitos de pacientes con cáncer de mama antes y después de quimioterapia se midió: **Primero:** Las subpoblaciones de monocitos que expresan

diferencialmente los marcadores (CD14 y CD16), y la expresión de PD-L1 y HLA-DR, el grado de diferenciación de monocitos a DCs maduras midiendo la expresión de HLA-DR, CD83, CD80 y CD40. **Segundo:** Las subpoblaciones de NKs (CD56/CD16) y la expresión de marcadores asociados con maduración y memoria como CD57, NKG2D, NKp30 y KLRG1 (23). **Tercero:** La expresión diferencial de los marcadores: KLRG1, CD57, PD1, CTLA4, LAG3 y TIM3 en células vírgenes, de memoria y efectoras (determinadas por la expresión diferencial de los marcadores (CD45RA y CD62L) en Linfocitos T (CD3+) tanto CD4+ como CD8+ utilizando citrus (análisis multiparamétrico automatizado de datos de citometría de flujo) y FlowSOM. **Cuarto:** La capacidad de internalización del CD3+, la fosforilación de pZAP70 y la proliferación como medida indirecta de la expresión de Ki-67, después de la estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos anti CD2/CD3 y CD28. **Quinto:** la producción de  $\beta$ -galactosidasa y la expresión de p16 y p21 (marcadores de senescencia celular) en Linfocitos T.



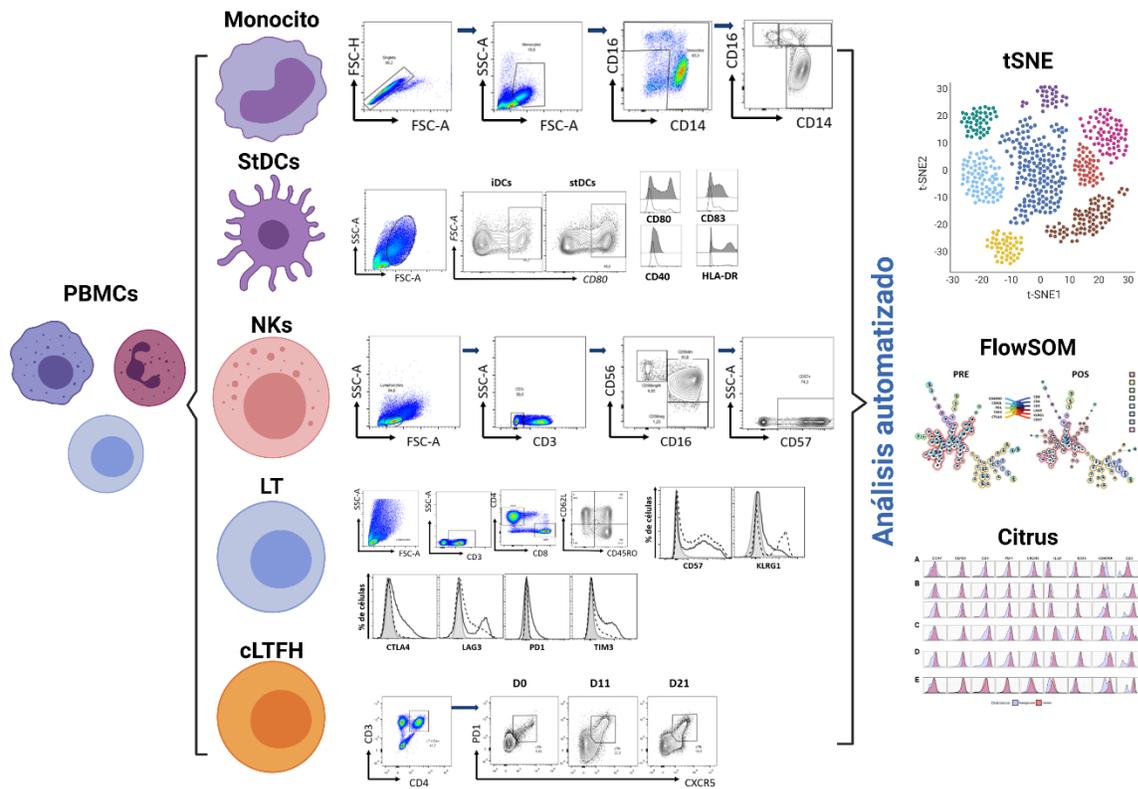
**Figura 1. Estrategia metodológica**

La gráfica resume las actividades experimentales realizadas en cada grupo de estudio que corresponden a los objetivos uno, dos y tres, respectivamente. Creado con *BioRender.com*.

**Tabla 2. Paneles de anticuerpos**

Población celular	Panel
Monocitos	FITC anti-CD14 (M5E2), PE/Cy5 anti-CD16 (3G8), PE/Dazzle594 anti-HLA-DR (L243) y APC anti-PD-L1 (29E.2A3)
Monocitos TLRs	APC anti-CD14, PE/Cy5 anti-CD16, FITC anti-TLR2 o PE anti-TLR4. Para TLR3 y TLR9 se utilizaron FITC anti-CD14, PE/Cy5 anti-CD16, APC anti-TLR3 o PE anti-TLR9,
DCs derivadas de Monocitos	FITC anti-CD14 (M5E2), PE/Cy5 anti-CD16 (3G8), PECy7 anti-CD83, PE/Dazzle594 HLA-DR, PE anti- CD80 y APC anti-CD40.
Natural Killer	Pacific blue™ anti-CD3, FITC anti-CD56 (5.1H11), APC anti-CD57 (HNK-1), APC/Fire™750 anti-KLRG1(SA231A2), PECy7 anti-NKp30 (P30-15), PE anti-NKG2D (1D11)
Linfocitos T foliculares helper	Biologend: PE anti-CD40L (24-31), Pacific blue™ anti-CD3 (HIT3a), Brillant violet 510™ anti-CD4+ (SK3), APC/Cy7 anti-CD45RA (HI100), FITC anti-CCR7 (G043H7), Alexa fluor 647 anti-CD95 (Dx2), Alexa fluor 700 anti-ICOS (C398.4A), PerCP/Cy5.5 anti-PD1 (EH12.2H7), PE/Cy7 anti-CXCR5 (J252D4), Brillant violet 650 anti-CXCR3 (G025H7) y PE/Dazzle594 anti-Bcl-6 (7D1).
Linfocitos T	Pacific blue™ anti-CD3, Brillant violet 510™ anti-CD4+ (SK3), PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), FITC anti-CD45RO (UCHL1), PerCP/Cy5.5 anti-PD1 (EH12.2H7), PE/Cy7 anti-CTLA4 (L3D10), PE anti-TIM3 (F38-2E2), y APC/Fire™750 anti-KLRG1(SA231A2). BD bioscience: BV711 anti-CD62L (DREG-56), APC anti-CD57 (NK-1) y BV786 anti-LAG3 (T47-530).
Fosforilación de ZAP70 y proliferación de Linfocitos T	PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), FITC anti-CD45RO (UCHL1), Alexafluor700 anti-CD62L (DREG-5b), PE anti-Ki-67 (11F6) y Alexafluor647 anti-pZAP70 (1503310).
Producción intracelular de citoquinas en LT	PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), APC anti-CD28, APC/Cy7 anti-CD27, FITC anti-IL-2, BV605 anti-TNF y PE anti-IFN $\gamma$
Actividad de la $\beta$ -galactosidasa y expresión de p16 y p21	Brillant violet 510™ anti-CD4+ (SK3), PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), APC anti-CD45RA y APC/Cy7 anti-CD27, PE anti-p16 (Biologend), Alexa405 anti-p21 (Santacruz), y el <i>Senescence green Flow cytometry assay kit</i> , de ThermoFisher.

Los datos fueron analizados manualmente con FlowJo V10.0 y mediante análisis automatizado con tSNE, FlowSOM y Citrus.



**Figura 2. Resumen de la estrategia de análisis utilizada en cada subpoblación celular.**

La gráfica resume las estrategias de análisis utilizadas para cada una de las subpoblaciones celulares analizadas. Creado con *BioRender.com*.

# Capítulo 1: Marcadores de senescencia en células de los componentes del sistema inmune innato y adaptativo en adultos mayores sanos.

## 1.1 Estado del arte

El aumento de la esperanza de vida al nacer y la disminución de la natalidad consecuencia de mejores políticas de salud pública y desarrollo socioeconómico, han favorecido la transición demográfica hacia un incremento de la población mayor de 60 años en todo el mundo. Sin embargo, la susceptibilidad de la población mayor a enfermedades crónicas e infecciones, demanda cambios en la sociedad y en las políticas públicas para garantizar la salud, la capacidad funcional y la calidad de vida de los adultos mayores (24).

El envejecimiento es posiblemente el aspecto más familiar, aunque menos comprendido, de la biología humana (25). Los eventos celulares que subyacen al envejecimiento humano se han asociado con la senescencia replicativa, descrita como el estado de arresto irreversible del ciclo celular, experimentado por todas las células mitóticamente competentes después de una cantidad predecible de divisiones celulares (límite de Hayflick), una barrera intrínseca natural exhibida por todas las células del organismo a la división celular ilimitada (26). El mecanismo que monitorea la división celular y media las señales de senescencia replicativa es la longitud de los telómeros (27). Durante la división celular, la síntesis incompleta de la hebra de ADN genera la pérdida de 50 a 200 bases en cada división y el consecuente acortamiento de los telómeros hasta una longitud crítica lo cual estimula eventos de inestabilidad cromosómica que pueden activar la apoptosis o el arresto del ciclo celular (27).

Así mismo, las células continuamente están experimentando estímulos estresores exógenos y endógenos incluyendo: telómeros disfuncionales, daño en el DNA,

estimulación excesiva por mitógenos y alteración de la cromatina, a los que pueden responder en un rango que va desde la completa recuperación hasta la muerte celular, entre estas respuestas está la senescencia celular, que permite proteger al organismo del desarrollo del cáncer. No obstante, las células senescentes adquieren cambios fenotípicos que pueden contribuir con el envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad, incluido el cáncer, en etapas tardías de la vida (11). Con el envejecimiento la regeneración y la reparación tisular disminuyen consecuencia de una mayor cantidad de células senescentes. El hecho de que la senescencia celular en un organismo joven sea beneficiosa (previene el cáncer) mientras que, en organismos viejos sea perjudicial (promueve el cáncer), es lo que se ha denominado como pleiotropía antagonista (11).

### **1.1.1 Inmunosenescencia**

En el año 2000, la población mayor de 60 años representaba el 10% de la población según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y se proyecta que para el 2050 los mayores de 65 años representen el 22% de la población total (5). El envejecimiento representa un estado paradójico de inmunodeficiencia e inflamación que favorece la autoinmunidad en la mayoría de los casos no-órgano específica, el cual está ligado a la alteración de diferentes componentes del sistema inmune (células inmunes, órganos linfoides y factores solubles) asociados a una mayor susceptibilidad a adquirir infecciones, a desarrollar enfermedades crónicas, menor respuesta a la vacunación y una mayor incidencia de cáncer. A este conjunto de cambios del sistema inmune ligados a la edad que tienen como resultado una deficiente vigilancia de los tumores, de los agentes infecciosos y una mayor susceptibilidad a la autoinmunidad se le ha denominado inmunosenescencia (4).

La inmunosenescencia es multifactorial, depende en gran medida de factores ambientales, retos antigénicos y modificaciones epigenéticas inherentes a la experiencia del sistema inmune de cada individuo (Inmunobiografía) (28). La acumulación en órganos linfoides de células efectoras y de memoria, causada por la estimulación y exposición continua a antígenos se caracteriza por: (i) falla en la habilidad para responder a nuevos antígenos, (ii) respuestas de memoria no sostenida y expansión de células terminalmente diferenciadas, (iii) contracción del repertorio de células inmaduras y (iv) Inflamación crónica de bajo grado (6, 10).

La heterogeneidad de las respuestas del sistema inmune para responder a los antígenos depende de las experiencias previas del individuo, el género, los estilos de vida, el estado funcional e incluso el nivel socioeconómico y el bienestar psicológico. Con el envejecimiento se incrementa esta heterogeneidad, resultado del remodelamiento del sistema inmunológico a lo largo de la vida lo que contribuye al aumento en el riesgo de infecciones, cáncer y enfermedades autoinmunes (29). Estos cambios asociados con la edad afectan tanto a la inmunidad innata como adaptativa, y generan deterioro en las funciones y actividades del sistema inmune. Aunque muchos aspectos del sistema inmune se deterioran con el envejecimiento, existe evidencia de un incremento en la activación de algunas células en un intento por mantener respuestas inmunes efectivas, lo cual puede ser beneficioso para responder contra el cáncer e infecciones, pero puede acarrear un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes y enfermedades crónicas en la vejez (30). La OMS desde el año 2000, ha propuesto políticas de salud para la prevención o compensación de los defectos inmunológicos como objetivo del envejecimiento saludable. En este sentido, la investigación sobre el envejecimiento inmune busca encontrar características de la senescencia susceptibles de ser manipuladas o revertidas, para mejorar la calidad de vida de los adultos mayores.

El compromiso funcional de diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmune con la edad se evidencia en células inmunes innatas, en el caso de monocitos y células dendríticas, por el aumento de subpoblaciones proinflamatorias, la disminución en la expresión de TLRs y una menor capacidad para procesar y presentar los antígenos; y en el caso de las células asesinas naturales (células NK), por el aumento de su capacidad citolítica, citotóxica y disminución del número de células NK inmaduras (31). En células de la inmunidad adaptativa como linfocitos T, la edad avanzada está asociada a la disminución de poblaciones de linfocitos T vírgenes, disminución de la expresión de CD28 y diversidad del TCR, aumento de la expresión de CD57, KLRG1 y PD1, y aumento de la sensibilidad a señales pro-apoptóticas. En el caso de linfocitos B de los adultos mayores producen anticuerpos con menor especificidad por el antígeno, menor capacidad de recombinación de clase y una alta expresión de los genes p16 y ARF asociados con la activación de vías de senescencia (Tabla 3. Características del envejecimiento inmunológico.) (32). A continuación, se describen los principales cambios reportados en la literatura en las subpoblaciones celulares de interés.

Tabla 3. Características del envejecimiento inmunológico.

Tipo celular	Modelo	Cambios asociados con el envejecimiento	Referencia
Monocitos	Humano	↓ función de los TLR 1/2, ↓ producción de citoquinas post-estimulación, ↓ expresión de los TLR 1	(33)
		↑ monocitos proinflamatorios, ↓ función de los TLR 1/2, ↓ producción de citoquinas post-estimulación, ↓ expresión de los TLR 1, ↓ fosforilación de ERK1/2	(34)
		↓ expresión de HLA-DR y CX3CR1, ↑ monocitos proinflamatorios, ↑ CCL2 en suero	(35)
		↓ expresión de CCR2 y CX3CR1, ↑ monocitos proinflamatorios, ↑ interleucinas proinflamatorias en suero	(36)
		↑ expresión de genes asociados con el inflamósoma (NLRC4, NLRC5 e IL1B)	(37)
		↑ expresión de receptores TAM	(38)
		↓ expresión de TRAF 3, alteración en la señalización RIG-I, ↓ activación de IFN I	(39)
Macrófagos	Humano	↓ Quimiotaxis, ↓ proliferación	(40)
Neutrófilos	Humano	↓ Quimiotaxis, ↓ proliferación	(40)
Células dendríticas	Humano	↓ pDCs, ↓ producción de IFN $\alpha$ ,	(41)
		↓ pDCs, ↓ producción de citoquinas post-estimulación TLRs, ↑ producción de citoquinas sin estimulación, ↓ expresión de TLRs	(42)
	Ratón	↓ pDCs, ↓ producción de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10) después de la estimulación con LPS	(43)
		↓ la capacidad de procesar y presentar el antígeno, ↓ la capacidad de presentación cruzada y consecuente activación de CD8+	(44)
		↓ la expresión de CD141 y GARP en respuesta a la estimulación con ácido retinoico, en consecuencia ↓ la producción de IL-10 y ↓ en la activación de LT reguladoras	(45)
Natural Killer	Humano	↑ subpoblación CD56 <sup>dim</sup> , ↓ subpoblación CD56 <sup>bright</sup> , ↓ expresión de NKp30, NKp46	(44)
		↑ expresión de CD57, NKG2C	(46)
		↓ actividad citotóxica antitumoral	(40)
MDSC	Humano	↑ número de células circulantes	(47)
Linfocitos T CD4+	Humano	↓ expresión de CD28	(48)
		↑ de las poblaciones terminalmente diferenciadas, ↑ expresión de KLRG1, CD57, ↑ expresión nuclear de $\gamma$ H2AX	(49)
		↑ expresión de p38, ↓ Actividad de la telomerasa y la proliferación	(50)
	Ratón	↑ expresión receptores inhibitorios (PD1, ICOS, CTLA4, TIM3, LAG3, KLRG1 Y NKG2A)	(51)
		↓ capacidad de generar memoria	(49)
		↓ la capacidad de activación de las CD4+ y ↓ la habilidad de contribuir con la respuesta de linfocitos B y la generación de anticuerpos	(52)
		↑ La variabilidad transcripcional y desestabilización de la cromatina	(53)
Linfocitos T CD8+	Ratón	↓ población virgen, ↓ capacidad de activar linfocitos T específicos a nuevos antígenos	(54)
		↓ población virgen, ↓ diversidad y función	(55, 56)
	Humano	↓ población virgen, ↓ diversidad y función, ↑ población efectora de memoria	(57, 58)
		↑ expresión de KLRG1, CD57, $\gamma$ H2AX, p38 y p16, ↓ expresión de CD28,	(57-59)
		Los LT de memoria centrales y vírgenes exhiben patrones de transcripción más diferenciados ↑ eucromatina, ↓ NRF1, ↓ capacidad de fosforilación oxidativa	(60)
		↑ apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ en los LT vírgenes (N) y de memoria central (CM), ↓ expresión de TRAF-2 y RIP, ↓ fosforilación de JNK, IKK $\alpha$ / $\beta$ , and I $\kappa$ B $\alpha$ y ↓ activación de NF- $\kappa$ B en LT N y CM	(61)

### ▪ Línea monocito-macrófago

Los monocitos son células de la inmunidad innata capaces de iniciar respuestas contra patógenos invasores y de activar la respuesta inmune adaptativa a partir de la presentación de antígenos (62). Los monocitos pueden ser diferenciados en tres subpoblaciones de acuerdo con la expresión diferencial de los marcadores CD14 (receptor de lipopolisacáridos) y CD16 (receptor FcγRIII). La primera población CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> conocidos como monocitos clásicos, representan el 80 a 90% del total de monocitos periféricos, expresan CD62L, CD64 y CCR2 con bajo nivel de CX3CR1. La segunda población, monocitos intermedios que expresan CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, expresan CD64 y CD32 tienen actividad fagocítica, expresan altos niveles de CX3CR1, tienen un perfil proinflamatorio caracterizado por la alta producción de TNFα en respuesta a estímulos TLR2 y TLR4 y representan el 5 al 10% del total de monocitos de sangre periférica (31). Y una tercera población de monocitos no clásicos que expresan bajos niveles de CD14, CD14<sup>low</sup> CD16<sup>+</sup>, carecen de la expresión de otros receptores Fc, son pobremente fagocíticos y no producen TNFα o IL-1β en respuesta a la estimulación con LPS (63).

Algunos estudios sobre los monocitos de adultos mayores han identificado un aumento en la subpoblación de monocitos CD16<sup>+</sup> con perfil proinflamatorio, y disminución en la expresión de moléculas MHC clase II alterando la presentación antigénica de estas células. Se ha encontrado que los monocitos en reposo de las personas mayores de 60 años presentan altos niveles de IL-6 e IL-8 y menor producción de citoquinas TNFα e IL-6 después de estimular los TLR1/TLR2 (34). Además, disminución en la expresión de TLR4 y TLR8 y aumento en la expresión de TLR1 y TLR2 (33).

Por otro lado, también se ha encontrado en los monocitos de este grupo etario, aumento en la expresión de receptores TAM (Tyro 3, Axl, and Mer), lo cual tiene implicaciones en la desregulación de la respuesta inmune asociada con el envejecimiento. Particularmente la vía Mer que es fundamental en el aclaramiento de células apoptóticas asociado con el desarrollo del envejecimiento inflamatorio (38). Molony y cols. (2017) identificaron también en estos monocitos, una disminución en la expresión de la molécula TRAF3, que afecta directamente las vías primarias y secundarias de señalización de RIG-1, encargadas de modular la transcripción de genes de IFN tipo I, sugiriendo que los monocitos de adultos mayores tienen deficiente producción de IFN tipo I (39).

Estas investigaciones demuestran que el fenotipo y el número de los monocitos se altera con el envejecimiento y se pueden correlacionar con la inflamación crónica de bajo grado y algunas enfermedades de la vejez (36). Sin embargo, se necesita mayor investigación para identificar si estos cambios contribuyen al desarrollo de las enfermedades o por el contrario son causados por estas. Considerando que los cambios sobre el sistema inmune dependen de diferentes factores externos e internos, este trabajo evaluó si estos cambios observados en otras poblaciones se presentan en la población colombiana.

### ▪ Células Dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son células profesionales presentadoras de antígeno capaces de activar los linfocitos T vírgenes, son un vínculo clave entre la inmunidad innata y adaptativa (31). Las DCs se derivan de precursores mieloides y linfoides de tal manera que se pueden clasificar en células dendríticas mieloides (mDCs) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs) (42). La activación de las DCs depende del reconocimiento de patógenos a través de los receptores de reconocimiento de patrón como los Receptores Toll (TLR por sus siglas en inglés), las mDCs se caracterizan por expresar TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y las células pDCs expresan TLR 7 y 9, cuando son estimuladas secretan IL-12, IL-6 y TNF $\alpha$  e IFN tipo I y TNF $\alpha$  respectivamente (42). Las mDCs se encuentran en tejidos periféricos, órganos linfoides secundarios y circulando en sangre, mientras que las pDCs se encuentran circulando en sangre y entran a los órganos linfoides a través de las vénulas endoteliales.

Las DCs disminuyen con el envejecimiento, disminuye la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citoquinas afectando su capacidad de activar linfocitos T y estimular la proliferación (64). Panda y cols. (2010) compararon el número y función de las células dendríticas en individuos jóvenes y adultos mayores, encontrando en estos últimos: (i) disminución de la cantidad de células dendríticas, específicamente las pDCs circulantes de 3725 a 1975 células/ml, (ii) menor producción intracelular de citoquinas después de ser estimuladas con ligandos específicos para los TLRs (iii) aumento en la producción basal de citoquinas en las DCs y (iv) disminución de la expresión de los TLRs (42).

De igual manera, en diferentes estudios se ha identificado que con el envejecimiento disminuye la capacidad de las DCs de capturar cuerpos apoptóticos. La falta de remoción de estos cuerpos promueve una necrosis secundaria con subsecuente inflamación tisular,

lo cual puede ocasionar autoreactividad por antígenos endógenos como consecuencia de una alta y variada cantidad de autoanticuerpos (64). Adicionalmente, las DCs de adultos mayores que aún tienen la capacidad de capturar los cuerpos apoptóticos tienden al parecer a producir mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias y menor cantidad de antiinflamatorias (31).

Con el envejecimiento también se ha identificado la disminución de la fosforilación de Akt y aumento en la fosforilación de p38 (MAPkinasa), en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (LPS). Los defectos en esta vía de señalización están asociados con deterioro en la capacidad de fagocitosis, migración y aumento en la producción de citoquinas. La vía PI3K/Akt al parecer puede ser un regulador negativo de la respuesta inflamatoria mediada por TLR (31). En resumen, durante el envejecimiento las DCs disminuyen su capacidad de: (i) capturar antígenos, (ii) fagocitar patógenos y células apoptóticas, (iii) Migrar hacia los ganglios linfáticos, (iv) expresar moléculas co-estimuladores (CD80/CD86), activar linfocitos T CD4+ y CD8+ y (v) producir de IFN tipo I e IFN tipo III (31, 42, 64). La alteración funcional de las DCs con el envejecimiento es de interés para el grupo de investigación debido a los trabajos de inmunoterapia del cáncer y vacunas basadas en células dendríticas diseñadas para estimular la activación y expansión de linfocitos T CD8+ con capacidad citotóxica sobre las células tumorales que permita su efectiva erradicación. Por lo tanto, dentro de este proyecto se evaluó la influencia de la edad sobre la capacidad de maduración de DCs derivadas de monocitos.

#### ▪ **Natural Killer**

Las células NKs comprenden el 10-15% de la población de linfocitos circulantes, son células linfoides innatas caracterizadas por su habilidad de reconocer y eliminar células infectadas, células estresadas y células cancerígenas. Las NKs tienen dos grandes funciones: la citotoxicidad y la secreción de citoquinas y quimioquinas (65). Las NKs se identifican por la expresión de CD56 y CD16 y la ausencia de TCR/BCR en superficie. De acuerdo con el nivel de expresión de CD56 y CD16, se pueden clasificar en tres subpoblaciones principales: CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>neg/-</sup> CD16<sup>+</sup>, y la expresión de CD57 en estas dos últimas subpoblaciones, se asocia con estadios senescentes y altamente citotóxicos (23, 66). El envejecimiento fisiológico se acompaña de cambios en la composición, función y fenotipo de las subpoblaciones de NKs (65). En los adultos mayores se ha encontrado un aumento significativo del número de células NKs,

principalmente expansión de las células CD56<sup>dim</sup> y disminución de las células CD56<sup>bright</sup>, lo que sugiere una expansión de células maduras con la edad. Las subpoblaciones maduras, además expresan CD57 y KLRG1, y se caracterizan por ser células menos respondedoras a la estimulación con citoquinas y altamente citotóxicas (28, 31).

Funcionalmente, las NKs son claves en la respuesta inmune innata por su capacidad de secretar múltiples citoquinas inmunomoduladoras como IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, IL-10 e IL-13. Sin embargo, las células NKs disminuyen la producción de citoquinas (<CD56<sup>bright</sup>) con la edad (44). La remodelación de subpoblaciones de células NKs también puede contribuir a la desregulación de la inmunidad adaptativa e innata, ya que las citoquinas producidas por las células CD56<sup>bright</sup> no solo son críticas para la activación de las DCs, sino que además interactúan con los monocitos que promueven la inflamación (31).

La disminución en la producción de citoquinas con la edad, puede ser el resultado de alteraciones en la expresión de receptores de membrana. En individuos mayores de 60 años se ha identificado una disminución en la expresión de NKp30 y NKp46, estos receptores están involucrados en el reconocimiento celular y la muerte de las células blanco, así como la interacción con las células dendríticas (31). De igual manera se ha encontrado disminución de la expresión de CD94 y DNAM-1, estas moléculas están involucradas en la regulación de la citotoxicidad y la producción de IFN $\gamma$  (23, 44). Estas alteraciones en el fenotipo y función de las NKs, se ha asociado a defectos del sistema inmune como: (i) incremento en la reactivación de *Mycobacterium tuberculosis* latente, (ii) baja respuesta a las vacunas, (iii) Respuesta inflamatoria sostenida y (iv) acumulación de células senescentes (65). En este trabajo se evaluó cambios en las NKs circulantes y la distribución de subpoblaciones con la edad.

#### ▪ **Linfocitos T**

Los linfocitos T se someten a un remodelamiento continuo como resultado de la interacción constante con múltiples estresores en el medio interno y externo. En consecuencia, se genera una reorganización del sistema inmune a lo largo de la vida (67). Dada la importancia de las células vírgenes, una disminución en el tamaño de este compartimento tiene un efecto en la respuesta inmune debido a que son necesarias para responder tanto a las infecciones crónicas/latentes como a las nuevas infecciones mediante la expansión clonal y la diferenciación a subpoblaciones efectoras (4). En la edad adulta la homeostasis de las células T depende de la producción homeostática de los LT vírgenes, el recambio

permanece estable, cercano al 0.04%. Sin embargo, en adultos mayores se ha observado una aceleración del recambio de LT CD8 a partir de células T de memoria que favorece una expansión de células de memoria en estadios terminalmente diferenciados (67).

Con la edad disminuye la población de linfocitos T vírgenes, resultado de la involución tímica, la acumulación de defectos en el ADN y el aumento de la expresión del factor de transcripción *Batf*, que limita la auto renovación de las células linfoides hematopoyéticas en respuesta al daño del DNA, y esta disminución se acompaña de aumento en las poblaciones de LT de memoria efectora (EM) (4-6). Así mismo, los adultos mayores exhiben una reducción en la diversidad del repertorio TCR y una alteración en las vías de señalización (alteración en la fosforilación de ERK, expresión a la baja de moléculas co-estimuladoras como CD28/CD27 y regulación al alza de receptores inhibitorios) que afectan la consecuente activación y expansión de la población efectora y disminuye la polifuncionalidad del sistema (67).

La diversidad del repertorio del TCR puede tornarse oligoclonal en las personas mayores con infecciones latentes como el CMV. El impacto de estos cambios se manifiesta en respuestas inmunes menos potentes lo que implica una menor eficacia de las vacunas y mayor susceptibilidad a infecciones y al cáncer (68). Los LT CD8<sup>+</sup> diferenciados que pierden la expresión de receptores de superficie CD27 y CD28 exhiben características de senescencia que incluyen: (i) baja actividad proliferativa, (ii) acortamiento de los telómeros, (iii) disminución de la actividad de la telomerasa y (iv) expresión de marcadores asociados con senescencia (CD57 y KLRG1) y moléculas intracelulares (p38 y  $\gamma$ H2AX) (58). La convergencia de características de la inmunidad innata y adaptativa en los LT CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup>, es una particularidad de un sistema inmune senescente (69). Estos LT CD8 con fenotipo de NK también expresan a la alta receptores inhibitorios de NKs (KLRG1 y NKG2A) y activadores (NKG2C y NKG2D) (58). Diferentes estudios sugieren que las células T CD8<sup>+</sup> terminalmente diferenciadas se vuelven menos dependientes de señales específicas del antígeno y más sensibles a señales innatas. Se ha propuesto que estos LT CD8<sup>+</sup> senescentes pueden ser activados de manera independiente del TCR (en ausencia del antígeno específico) a través de la acción de las citoquinas: IFN de tipo I, IL-15, IL-12 e IL-18 y esta activación es mediada por los NKRs (NKG2D y NKG2C). Este mecanismo ha sido identificado en las respuestas contra infecciones y vigilancia antitumoral. No obstante, puede favorecer el desarrollo de inflamación y autoinmunidad (30). Finalmente,

es posible evaluar la edad de los linfocitos T circulantes a través del análisis en la expresión de CD27, CD28, CD57, KLRG-1 y una de las isoformas CD45 (RA / RO) (58, 70).

#### ▪ **Infección crónica por Citomegalovirus**

El citomegalovirus (CMV) es un herpes virus ubicuo, latente en la mayoría de la población en todo el mundo. En adultos inmunocompetentes la infección está controlada, mientras que en pacientes inmunocomprometidos el CMV puede inducir una enfermedad grave (55). Sin embargo, se ha encontrado que, individuos mayores sanos CMV+ se caracterizan por la expansión de LT CD8 terminalmente diferenciados a expensas de una disminución del repertorio de LT vírgenes. Las células inmunes específicas a CMV se acumulan durante la persistencia del virus a lo largo de la vida y esta acumulación ocurre principalmente en el compartimento de LT CD8. Dicha expansión de células específicas resulta en un fenómeno denominado “inmunodominancia”, que compromete la capacidad de la respuesta inmune a nuevos antígenos. Por esta razón, se ha sugerido que la infección por CMV acelera el proceso de envejecimiento del sistema inmune (56). En la infección por CMV hay una disminución en la diversidad de LT caracterizada por una expansión de LT específicos para CMV, acumulación de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> de ME, con alteración funcional y menor capacidad proliferativa. Las personas CMV+ con altos niveles de proteína C reactiva en sangre tienen menor expectativa de vida independientemente de la edad. Así mismo, individuos adultos mayores CMV+ tienen mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedad cardiovascular y cáncer (71). Las infecciones virales latentes (CMV y Epstein Barr (EBV)) muchas veces adquiridas desde la infancia no sólo tienen efectos sobre el proceso de envejecimiento inmunológico sino también sobre el desarrollo de patologías con alta carga de morbilidad en el paciente adulto mayor (69).

#### ▪ **Revisión sistemática: Estudio de inmunosenescencia de LT**

Debido al alto número de estudios de inmunosenescencia se realizó una revisión sistemática de la literatura para identificar los mejores marcadores de inmunosenescencia en LT medidos por citometría de flujo (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Para esto, consultamos las bases de datos de PubMed, MEDLINE, EBSCO y se incluyeron un total de 36 estudios realizados en los últimos 20 años, la información se clasificó en cuatro variables principales (i) Subpoblaciones de memoria de LT, (ii) Marcadores de senescencia y agotamiento, (iii) citoquinas y (iv) longitud de telómeros.

### ***Subpoblaciones de memoria de LT***

La generación y el mantenimiento de la memoria antígeno-específica de LT es crucial para la protección inmune a largo plazo. Han sido descritos cuatro principales subpoblaciones de memoria: N: Vírgen, CM: Memoria central, EM: Memoria efectora y E: Efectoras terminales, las cuales pueden ser caracterizadas por la expresión en superficie de proteínas como CCR7, CD45RA / RO, CD27, CD28, CD62L y CD95, entre otros (72, 73). A pesar de que el número total de LT permanece relativamente constante con la edad, se han observado cambios significativos en la distribución de las poblaciones de memoria con el envejecimiento (74). Entre los 36 estudios elegidos, 15 caracterizaron subpoblaciones de memoria de LT con diferentes combinaciones de marcadores. Estos estudios reportaron una disminución significativa en la población de LT vírgenes tanto en LT CD4+ (75-81) como en LT CD8+ (75-79, 82-84). Sin embargo, nosotros encontramos que estos estudios tenían un alto riesgo de sesgo debido a la heterogeneidad de los protocolos utilizados, los rangos de edad y la forma de presentar los resultados entre otros.

Lograr una reducción de la variabilidad de los estudios podría ayudar a comprender mejor la distribución de las poblaciones de memoria ya que, a diferencia de los LT vírgenes, las subpoblaciones de memoria mostraron resultados contradictorios en los estudios incluidos, lo que imposibilitó evaluar el efecto global del envejecimiento en estas poblaciones (85). Uno de los factores que podría afectar la modulación de estas poblaciones es la presencia de infecciones crónicas como el CMV (86). Como se mencionó anteriormente, la infección por CMV induce la diferenciación y el agotamiento de los LT, actuando en muchos casos como un factor de confusión de la edad en los estudios de inmunosenescencia (87).

Estos estudios reportaron diferencias en la distribución de las subpoblaciones de memoria con la edad dependiendo de la serología por CMV de los voluntarios. Aunque la disminución de LT vírgenes y el incremento de los LT efectores fue una característica compartida entre los voluntarios de la tercera edad y los individuos CMV+, las subpoblaciones de CM y EM tienen comportamientos diferentes cuando se comparan los voluntarios CMV+ Vs. CMV- (88). En conclusión, los estudios reportan una disminución en las subpoblaciones de LT vírgenes y un aumento de los LT efectores con el envejecimiento que podría favorecer un ambiente proinflamatorio y mayor fragilidad en esta población (88, 89).

Tabla 4. Características de las subpoblaciones de memoria reportadas en los estudios.

No.	Referencias	Año	Linfocitos	A. Mayor	Joven	CMV	Definición de Memoria	A. Mayor (media ± SD, %)				Joven (media ± SD, %)			
				n	n			N	CM	EM	E	N	CM	EM	E
1	Xu et al. (87)	2019	γ/δ	12	12	Si	CD27 CD45RA	↓	NS	NS	↑	↑	NS	NS	↓
2	Sizzano et al. (75)	2018	CD4/CD8	7	7	No	CCR7 CD45RO	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
3	Bajwa et al. (90)	2017	CD4/CD8	103	48	Si	CD27 CD45RA	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4	Riddell et al. (88)	2015	CD8	125		Si	CD27 CD45RA	↓	NS	NS	↑	↑	NS	NS	↓
5	Henson et al. (57)	2015	CD8	8	8	No	CD27 CD45RA	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6	Britanova et al. (76)	2014	CD4/CD8	7	10	No	CD27 CD45RA	18,8±12,6	NM	NM	NM	37,5±8,1	NM	NM	NM
7	Larbi et al. (77)	2014	CD4/CD8	15	15	No	CD27 CD45RA	↓	NS	↑	↑	↑	NS	↓	↓
8	Dolfi et al. (82)	2013	CD8	5	5	No	CD27 CD45RA	↓	NC	NC	NC	↑	NC	NC	NC
9	Lee et al. (89)	2012	CD8	43	62	Si	CCR7 CD45RA	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
10	Libri et al. (80)	2011	CD4+	±67	±40	Si	CD27 CD45RA	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
11	Czesnikiewicz-Guzik et al. (78)	2008	CD4/CD8	26	31	No	CCR7 CD45RA	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓
12	Nasi et al. (79)	2006	CD4/CD8	10	12	No	CCR7 CD45RA	↓	↑	↑	NS	↑	↓	↓	NS
13	Alberti et al. (81)	2006	CD4	20	12	No	CD28 CD95	35,6+/- 2,3	45,9+/- 2,8	11,8+/- 1,3		55 +/- 3,6	34,8+/- 2,8	8+/- 2,4	
14	Hong et al. (83)	2004	CD8	17	17	No	CCR7 CD45RA	9.5 +/- 2.6	NS	51.3 +/- 3.4	32.3 +/- 3.7	46.4 +/- 4.1	NS	28.2 +/- 2.8	18.0 +/- 2.5
15	Zanni et al. (84)	2003	CD8	10	10	No	CD28 CD95	3.6 +/- 1.4	42.3 +/- 6	54 +/- 6		40.6 +/- 5	36.6 +/- 5	16.8 +/- 9	

La tabla de memoria resume los datos reportados en los artículos seleccionados que medían cambios en la distribución de las subpoblaciones de memoria en dos grupos jóvenes Vs. adultos mayores. N: Virgen CM: Memoria central. EM: Memoria efectora. E: Efectoras terminales. ↑: aumentado. ↓: disminuido NS: Sin cambios o cambios no significativos entre los grupos. NM: No medido, NC: no comparado entre los grupos, NR: No informado

### ***Marcadores de agotamiento y senescencia***

En nuestra revisión, 21 de los 36 artículos evaluaron marcadores asociados con agotamiento y/o senescencia. Los principales marcadores evaluados fueron CD57 (47.6%), CD28 (42.8%), KLRG1 (23.8%), CD95 (19%), PD1 (19%), CTLA4 (9.5%), p16 (9.5%), p21 (9.5%),  $\gamma$ H2AX (9.5%), CD85j (9.5%) y CD11a (9.5%) (85). La expresión de CD57 fue mayor en los adultos mayores en comparación con los jóvenes, tanto en LT CD4+ como CD8+ (57, 59, 78, 82, 91-93); y se expresa principalmente en las subpoblaciones efectoras de LT de todas las edades, pero en menor proporción en los adultos más jóvenes (57). En el caso de KLRG1, los estudios reportaron un incremento de su expresión en LT CD8+ con la edad (57, 59, 82, 87, 94). A sí mismo, la expresión de CD95 incrementó en los LT de adultos mayores cuando se comparó con los LT de adultos jóvenes (95-97) y es mayor en los LT efectores cuando se comparó con los otras subpoblaciones de memoria (91).

Por otro lado, los estudios reportaron que la expresión de CD28 disminuyó en los LT CD8+ de adultos mayores en comparación con los LT de adultos jóvenes y se correlacionó con la infección por CMV+ (59, 78, 91-93, 98-100). La pérdida de la expresión de CD28 es más frecuente en los LT CD8+ que en los LT CD4+ (78). Libri y cols. mostraron una disminución en la expresión de CD28 en las subpoblaciones más diferenciadas (EM y E) al compararlas con las subpoblaciones menos diferenciadas (N y CM) en los LT CD4+ (80). En general, los LT CD4+ son más resistentes a los cambios fenotípicos asociados con la edad que los LT CD8+ (78).

Entre los estudios seleccionados para esta revisión, que midieron la expresión de PD1 (57, 82, 91, 101). Dos reportaron aumento en la expresión de PD1 en adultos mayores en comparación con adultos jóvenes (57, 82). Curiosamente, Canaday y cols. mostraron una menor expresión de PD1 y TIM3, y una mayor expresión de CTLA4 en adultos mayores (101). Dolfi y cols. encontraron un aumento de la expresión de LAG3 en los LT de los adultos mayores en comparación con los adultos jóvenes (82). De otra parte, las proteínas p16, p21 y  $\gamma$ H2AX se midieron en pocos artículos (57, 59, 91). Sin embargo, los artículos que los midieron mostraron una mayor expresión de estas moléculas en adultos mayores. Teniendo en cuenta la falta de estudios sobre estas moléculas, no fue posible asumir su utilidad para identificar LT senescentes, incluso cuando estas moléculas se han considerado distintivas de la senescencia replicativa en otros tipos de células.

**Tabla 5. Características de los estudios que reportaron marcadores de agotamiento y senescencia.**

No.	Referencias	Año	Linfocitos	A. Mayor	Joven	CMV	Marcadores en adultos mayores										
				N	n		CD28	CD57	KLRG1	CD95	PD1	CTLA4	TIM3	p16	p21	Otros	
1	Xu et al. (87)	2019	$\gamma/\delta$	12	12	Si	NM	↑	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	↑CD85j, ↑CD244+, NC: $\gamma$ H2AX	
2	Ross et al. (98)	2018	CD4/CD8	10	9	Si	↓	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	↓CD31	
3	Onyema et al. (91)	2015	CD8	11	11	No	↓	↑	NM	NC	NC	NM	NM	NC	↑	↑CD245, NC Bcl-2	
4	Henson et al. (57)	2015	CD8	8	8	No	NM	↑	↑	NM	↑	NM	NM	NM	NM	↑ p38, ↑ $\gamma$ H2AX	
5	Canaday et al.	2013	CD4/CD8	24	24	No	NM	NM	NM	NM	↓	↑	↓	NM	NM	↓ ICOS in CD4+ <i>ex vivo</i>	
6	Dolfi et al. (82)	2013	CD8	±38	±37	No	NM	↑	↑	NM	↑	NM	NM	NM	NM	↑LAG3 ↑2B4, ↑T-bet, ↑Eomes	
7	Onyema O et al. (59)	2012	CD8	11	11	Si	↓	↑	↑	NM	NM	NM	NM	↑	↑		
8	Libri et al. (80)	2011	CD4+	25		Si	NC	NC	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	IL-7Ra, Bcl-2
9	Agius et al. (102)	2009	CD4	±9	±11	No	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NS: CLA, CD11a, CCR4
10	Herndler-Brandstetter et al. (103)	2008	CD8	NR	NR	Si	NM	NS	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NS:CD62L, CD11a, CD126,
11	Czesnikiewicz-Guzik et al. (78)	2008	CD4/CD8	41	68	No	↓	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	↑ CD85j, ↓ CD26
12	Nasi et al. (79)	2006	CD4/CD8	7	7	No	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NS:CD127
13	Sawhney et al. (95)	2006	CD4/CD8	25	20	No	NM	NM	NM	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	CD4: ↑CD95L; CD8: NS CD95L
14	He et al. (92)	2006	CD8	15	22	Si	↓	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	
15	Pinti et al. (96)	2004	CD4/CD8	14	13	No	NM	NM	NM	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	
16	Ouyang et al. (99)	2003	CD4/CD8	5	5	Si	↓	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NS: HLA-DR, CD69, CD45RO/RA
17	Machado et al. (104)	2003	CD4/CD8	±10	±20	No	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	↓ P-glicoproteína 1
18	Ouyang et al. (94)	2003	CD8	70	11	Si	NM	NM	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	
19	Trzonkowski et al. (93)	2003	CD8	91	63	Si	↓	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	
20	Trzonkowski et al. (100)	2002	CD8	65	31	No	↓	NM	NM	NM	NM	↓	NM	NM	NM	NM	
21	Sandmand et al. (97)	2002	CD4/CD8	15	26	No	NM	NM	NM	↑	NM	NM	NM	NM	NM	NM	

La tabla de marcadores de agotamiento y senescencia resume los datos reportados en los artículos seleccionados que medían cambios en la expresión de proteínas asociadas con agotamiento/senescencia en LT de adultos mayores. ↑: aumentado. ↓: disminuido NS: Sin cambios o cambios no significativos entre los grupos. NM: No medido, NC: no comparado entre los grupos, NR: No informado.

### ***Citoquinas***

De los 36 artículos de la revisión, 15 realizaron mediciones de diferentes citoquinas y serinas proteasas como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, granzima y perforina. De estos estudios 12 midieron al menos una de estas citoquinas en LT CD8 y siete en LT CD4. Estos, mostraron que con el envejecimiento hay una tendencia a producir altos niveles de citoquinas proinflamatorias (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6) y antiinflamatorias (IL-4 e IL-10); y una menor producción de granzima y perforina en los LT.

El envejecimiento se ha asociado con un incremento de citoquinas proinflamatorias principalmente IL-6 y TNF $\alpha$ , que dan lugar al fenotipo de inflamación crónica de bajo grado que se relaciona con la etiología de diferentes enfermedades crónicas (105). La medición de citoquinas proinflamatorias se realiza principalmente en LT CD8 y las citoquinas que se miden con mayor frecuencia son IL-6, TNF $\alpha$ , IL-2, IL-1B, IL-8, IL-18 e IFN $\gamma$ . (106). No obstante, en la revisión encontramos que la mayoría de los estudios miden principalmente cuatro de estas citoquinas, siendo el IFN $\gamma$  la citoquina medida con mayor frecuencia. Por otro lado, las citoquinas antiinflamatorias (IL1-R $\alpha$ , IL-4, IL-10 y TGF $\beta$ ) se miden tanto en LT CD4+ como en LT CD8+ (106); cinco de los artículos incluidos midieron IL-4 o IL-10. Finalmente, solo dos estudios midieron las moléculas citotóxicas en LT CD8+. La producción de estas moléculas parece estar modulada principalmente por la edad, dado que los adultos mayores CMV+ secretan niveles más bajos que los adultos jóvenes tanto CMV- como CMV+ (87).

La técnica de medición de citoquinas considerada en este estudio fue la citometría de flujo, para medir las citoquinas intracelulares inhibiendo el transporte vesicular. Sin embargo, la medición de citoquinas también se puede realizar por citometría de flujo utilizando una matriz de perlas citométricas en una muestra de sobrenadante de cultivo celular, o utilizando otras técnicas como ELISA o ELISPOT que pueden detectar moléculas en el plasma, sobrenadante de un cultivo o directamente en células reactivas. La evidencia ha demostrado que estas técnicas son complementarias más que comparables, ya que no tienen una correlación directa con sus resultados (107). Se puede concluir entonces, que no existe un método estandarizado de medición de citoquinas, por lo que los estudios basados exclusivamente en una de estas técnicas no representan la perspectiva de las citoquinas como marcador de inmunosenescencia (85).

Tabla 6. Características de los estudios que midieron citoquinas.

No	Referencias	Año	Linfocitos	A. Mayor	Joven	CMV	Citoquinas							
				n	n		IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-10	Granzima B	Perforina	Otros
1	Xu et al. (87)	2019	$\gamma/\delta$	12	12	Si	↑	↑	↓	NM	NM	NM	NM	↑MIP-1 $\alpha$
2	Riddell et al. (88)	2015	CD8	8	8	Si	NS	NS	↑ CD8	NM	NM	NM	NM	
				7	7		NS	NS	NS	NM	NM	NM	NM	
3	Henson et al. (57)	2015	CD8	8	8	No	↑	↑	NM	NM	NM	↓	↓	
4	Larbi et al. (77)	2014	CD8	15	15	No	↑	↑	NM	NM	NM	NM	NM	
5	Dolfi et al. (82)	2013	CD8	44	54	No	↑	↑	↑	NM	NM	↓	NM	↓MIP-1 $\beta$
6	Agius et al. (102)	2009	CD4	±8	±8	No	NS	NM	NM	NM	NM	NM	NM	
7	Alberti et al. (81)	2006	CD4	20	12	No	↓	↓	NM	NS	NM	NM	NM	
8	Deng et al. (108)	2004	CD4/CD8	11	5	No	NS	NM	NM	NM	NM	NM	NM	
9	Ouyang et al. (94)	2003	CD8	70	11	Si	↓KLRG1+	NM	NM	NM	NM	NM	NM	
10	Pietschmann et al. (109)	2003	CD4/CD8	79	75	No	↑CD8	NM	NM	↑	NM	NM	NM	
11	Trzonkowski et al. (93)	2003	CD8	91	63	Si	NM	NM	NM	NM	↑	NM	NM	
12	Zanni et al. (84)	2003	CD8	10	10	No	↑	↑	↑	↑	↑	NM	NM	↑ IL-6
13	Sandmand et al. (110)	2003	CD4/CD8	14	25	No	NM	↑	NM	NM	NM	NM	NM	
14	Sandmand et al. (97)	2002	CD4/CD8	14	24	No	↓	NM	NM	↑	NM	NM	NM	
							↑	NM	NM	↑	NM	NM	NM	

La tabla de citoquinas resume los datos reportados en los artículos seleccionados que medían cambios en la expresión citoquinas intracelulares de LT de adultos mayores después de la estimulación. ↑: aumentado. ↓: disminuido NS: Sin cambios o cambios no significativos entre los grupos. NM: No medido, NC: no comparado entre los grupos, NR: No informado.

### ***Longitud de los telómeros***

Los estudios que midieron la longitud de los telómeros en los LT CD8+ (88, 103, 111, 112) mostraron que las diferentes subpoblaciones de memoria y los LT CD8+ totales tenían una reducción significativa de la longitud de los telómeros en los adultos mayores en comparación con los adultos jóvenes. Riddell y col. estratificaron a los adultos jóvenes y mayores en función de su serología por CMV y encontraron que los adultos jóvenes CMV+ tenían telómeros más cortos en todas las subpoblaciones de memoria en comparación con sus contrapartes CMV-. En los adultos mayores, hay un aumento de los LT TEMRA, pero no hay diferencias en la longitud de los telómeros entre CMV+ y CMV- (88). Son y cols. mostraron una disminución de la longitud de los telómeros en los LT CD4+ en función de la edad (112). El acortamiento de los telómeros puede ser un marcador útil para describir la inmunosenescencia de los LT, pero otros mecanismos también están involucrados en la restricción de su capacidad proliferativa. (88).

En conclusión, nuestra revisión sistemática permitió observar una disminución significativa en la subpoblación de LT vírgenes en adultos mayores en comparación con adultos jóvenes. Los marcadores primarios utilizados para identificar las células senescentes fueron la pérdida de CD28 y el aumento de la expresión de CD57 y KLRG1 especialmente en la subpoblación de LT efectores. Además, observamos un aumento de las citoquinas proinflamatorias y una disminución de la longitud de los telómeros en los LT de personas de edad avanzada. No fue posible realizar una síntesis cuantitativa de los marcadores de agotamiento/senescencia, de las citoquinas y la longitud de los telómeros debido a las variaciones significativas entre los grupos resultado de las diferencias en los protocolos y mediciones no reportadas, lo que genera un alto riesgo de sesgo.

La tendencia acelerada del envejecimiento de la población mundial promueve como objetivo esencial para el mantenimiento de la prosperidad y la estabilidad política de la comunidad mundial el envejecimiento saludable, de ahí la necesidad de comprender las características de envejecimiento de cada población. Por lo tanto, es esencial entender los mecanismos que contribuyen a la alteración de la inmunidad en los adultos mayores para identificar posibles blancos terapéuticos, como primer objetivo de esta tesis nos propusimos realizar una línea de base de características de inmunosenescencia en adultos mayores sanos de la población bogotana.

**Tabla 7. Características de los estudios que reportan la longitud de los telómeros.**

No	Referencias	Año	Linfocitos	A. Mayor	Joven	CMV	A. Mayor (media ± SD)				Joven (media ± SD, %)			
				n	n		N	CM	EM	E	N	CM	EM	E
1	Xu et al. (87)	2019	$\gamma/\delta$	9		Si	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
2	Riddell et al. (88)	2015	CD8	27	38	Si	5,7±1,92	4,6±1,42	4,0±1,26	4,1±1,32	10,1±2,82	8,2±2,78	7,0±2,57	7,7±2,73
3	Herndler-Brandstetter et al. (103)	2008	CD8	NR	NR	Si	5.1±0.4				7.1±0.1			
4	Mariani et al. (111)	2003	CD8	10	18	No	↓				↑			
5	Son et al. (112)	2000	CD4/CD8	30	22	No	CD4+: 6.7±2 CD8+:5.5±1.7				CD4+: 8.7±1.7 CD8+: 6.9±1.8			

La tabla de longitud de telómeros resume los datos reportados en los artículos seleccionados que medían cambios en la longitud de los telómeros de LT con la edad. N: Virgen CM: Memoria central. EM: Memoria efectora. E: Efectoras terminales. ↑: aumentado. ↓: disminuido, NC: no comparado entre los grupos.

## 1.2 Materiales y métodos

### 1.2.1 Participantes

Todos los participantes vivían de forma independiente en la comunidad, sin problemas de salud o con discapacidad. Se definieron los siguientes *criterios de inclusión*: voluntarios sanos de 18 a 30 años y adultos mayores de 60 años sanos residentes en la ciudad de Bogotá, colombianos. Criterios de no inclusión: Infección aguda reciente, consumo de antibióticos 3 semanas previas a la toma de la muestra, consumo de medicamentos antiinflamatorios y corticoides, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, cáncer, Diabetes mellitus, cirrosis, alcoholismo y tabaquismo. Los participantes se abstuvieron de realizar actividad física extenuante 24 horas antes de la muestra. Un grupo de jóvenes (N=10 de 18 a 28 años con una media de edad de  $24,5 \pm 2,98$  años, 5 hombres y 5 mujeres) y un grupo de adultos mayores (N=10 de 60 a 85 años con una media de edad de  $67,9 \pm 9,07$  años, 5 hombres y 5 mujeres) fueron reclutados para el estudio.

Este proyecto de investigación se rige según la resolución No. 008430 de 1993 por la cual se establecen las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud”. Se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

### 1.2.2 Separación de PBMCs

Se tomaron muestras de sangre periférica de 60 ml/toma en tubos heparinizados previa asepsia y antisepsia. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Inmunología y Medicina traslacional de la Facultad de Medicina. La separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se realizó mediante separación por gradiente de densidad (*Lymphoprep*) por 40 minutos a  $700g$ ,  $\pm 5 \times 10^7$  de PBMCs fueron obtenidas de la interfaz por muestra. A continuación, las PBMCs se centrifugaron y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 (Gibco). Las PBMCs se resuspendieron en medio AIMV (Gibco) para los experimentos.  $1 \times 10^7$  y fueron analizadas inmediatamente o sembradas para estimulación, las PBMCs sobrantes se dispensaron en crio-viales a una densidad de  $1 \times 10^7$  células/ml en medio de congelación (50% de RPMI-1640 + 40% de suero fetal bovino (SFB) + dimetil

sulfóxido al 10% (DMSO)) fueron crio-preservadas primero por 24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y luego en vapores de nitrógeno líquido.

### 1.2.3 Evaluación *ex vivo*

Las subpoblaciones de monocitos y natural killer se evaluaron *ex vivo* así. Un volumen de  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu\text{l}$  de PBS se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales marca biolegend: Monocitos con FITC anti-CD14 (M5E2), PE/Cy5 anti-CD16 (3G8), PE/Dazzle594 anti-HLA-DR. Natural killer: Pacific blue™ anti-CD3, FITC anti-CD56 (5.1H11), APC anti-CD57 (HNK-1), APC/Fire™750 anti-KLRG1(SA231A2), PECy7 anti-NKp30 (P30-15), PE anti-NKG2D (1D11) se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad. Posteriormente se lavaron con 1ml de PBS y se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de FACS Flow, al menos 50.000 eventos fueron leídos por muestra en el citómetro de flujo FACS Aria III.

### 1.2.4 Estimulación de TLRs

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células/pozo de PBMCs en placas de 96 pozos, se dejaron adherir por tres horas y se lavaron con PBS a  $37^{\circ}\text{C}$  dos veces. Las células fueron estimuladas con ligandos específicos para TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 (Pam3CSK 100 ng/ml, Poly I:C 5  $\mu\text{g/ml}$ , LPS 100 ng/ml y CPG 5  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes y fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la medición de citoquinas por *Cytometric Bead Array* (CBA). Los monocitos fueron marcados con APC anti-CD14, PE/Cy5 anti-CD16, FITC anti-TLR2 o PE anti-TLR4. Para TLR3 y TLR9 se utilizaron FITC anti-CD14, PE/Cy5 anti-CD16, APC anti-TLR3 o PE anti-TLR9, la marcación intracelular de estos receptores se realizó con el kit de fijación y permeabilización de DAKO según las instrucciones de manejo del fabricante.

### 1.2.5 Serología CMV

El plasma de los participantes fue congelado y posteriormente se midió la presencia de anticuerpos IgG anti-CMV, según las instrucciones del kit diagnóstico.

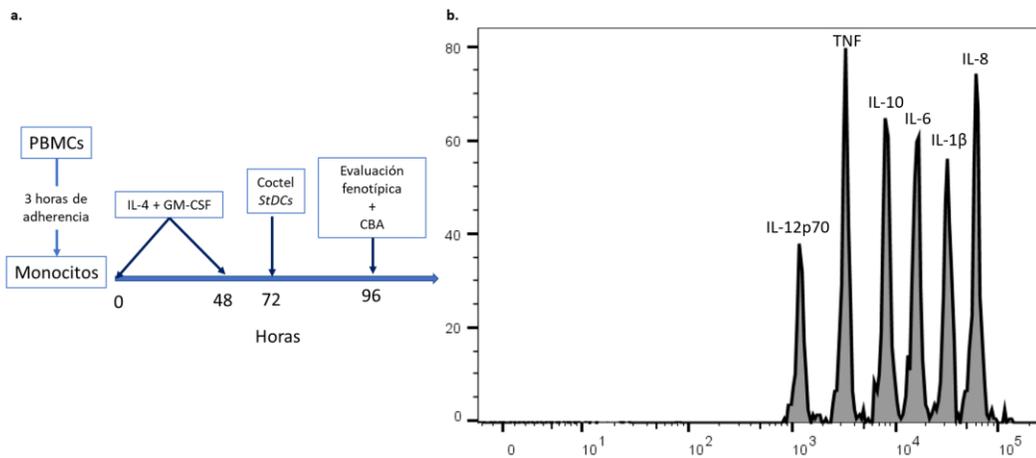
### 1.2.6 Maduración de células dendríticas

Un volumen de  $1 \times 10^6$  células/pozo de PBMCs se sembraron en placas de 96 pozos fondo plano, se dejaron adherir por tres horas y se lavaron dos veces con PBS a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los

monocitos cultivados en medio AIM-V suplementados con 750U/mL de IL-4 y 1000U/mL del factor estimulante de colonia granulocito macrófago (GM-CSF) (Cellgenix) a 37°C con atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas y un segundo estímulo con IL-4 + GM-CSF por 48 horas más. Posteriormente, se estimularon con el coctel proinflamatorio de células dendríticas estándar *stDCs* (IL-1 $\beta$  10ng, TNF $\alpha$  1000 UI, IL6 1000 UI y PGE2 1 $\mu$ g), durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes y fueron almacenados a -20 °C hasta la medición de citoquinas por CBA. Las células dendríticas fueron marcadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: PECy7 anti-CD83, PE/Dazzle594 HLA-DR, PE anti-CD80 y APC anti-CD40.

### 1.2.7 Medición de citoquinas por CBA

Los sobrenadantes de la estimulación de TLRs y la maduración de DCs se diluyeron 1/1 en PBS antes de la incubación con perlas de CBA recubiertas con anticuerpos anti-IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL- 8, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  (Human Inflammatory Cytokine Kit; BD Biosciences) (ver Figura 3). Las perlas se lavaron y se tiñeron con el anticuerpo secundario conjugado con PE. Las concentraciones de cada citoquina en los sobrenadantes se analizaron utilizando el software CBA (BD Biosciences).



**Figura 3. Esquema de maduración de células dendríticas derivadas de monocitos.**

**a.** Resumen del protocolo de maduración de cuatro días de *stDCs* derivadas de monocitos. **b.** Gráfica representativa de una muestra de las poblaciones de las perlas individuales en el kit de citoquinas inflamatorias humanas BD CBA. Cada población corresponde a una citoquina individual.

### **1.2.8 Linfocitos T**

Se sembraron  $1 \times 10^6$ /pozo de PBMCs en platos de 96 pozos fondo plano y se estimularon con perlas antiCD3/CD28 durante 24 horas. Después las células se lavaron con PBS y se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales de biolegend: Pacific blue™ anti-CD3, Brilliant violet 510™ anti-CD4+ (SK3), PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), FITC anti-CD45RO (UCHL1), Alexafluor700 anti-CD62L (DREG-5b), APC anti-CD57 (HNK-1) y APC/Fire™750 anti-KLRG1(SA231A2). Se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad, al menos 100.000 eventos fueron leídos por muestra.

### **1.2.9 Citometría de flujo**

Después de la marcación las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en líquido FACS, se leyeron en ARIA FACS III. En el programa FACS Diva posteriormente los datos fueron analizados en FlowJo V10.9

### **1.2.10 Análisis estadístico**

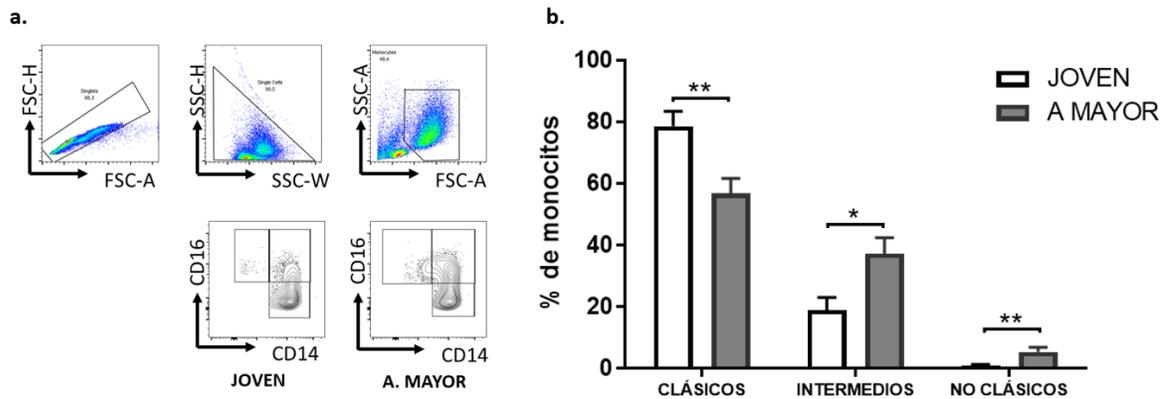
El análisis de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism (v9.0), para encontrar diferencias entre los grupos se aplicó una prueba t de Student (prueba no paramétrica de Mann-Withney) con valores de "p" < 0,05 que fueron considerados estadísticamente significativos.

## **1.3 Resultados**

### **1.3.1 Los adultos mayores exhiben un incremento de monocitos intermedios y no clásicos.**

Los monocitos juegan un papel fundamental en el inicio y resolución de los procesos inflamatorios. Con base en la expresión diferencial de CD14 y CD16, el análisis por citometría de flujo de monocitos permite definir tres subpoblaciones de monocitos: clásicos (~85%), intermedios (~5%) y no-clásicos (~10%). Las proporciones de estas subpoblaciones pueden cambiar con la edad o en enfermedades crónicas. Por ejemplo, los monocitos intermedios incrementan en enfermedades que cursan con inflamación crónica y en enfermedades cardiovasculares (113). Con el fin de examinar cambios que experimentan las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica de individuos de

nuestra población con la edad, se compararon por citometría de flujo los porcentajes de las tres subpoblaciones, en muestras de leucocitos de individuos jóvenes ( $n=10$ ) y adultos mayores ( $n=10$ ), definidas *ex vivo* por los parámetros de tamaño y complejidad, el marcaje de los monocitos con anticuerpos fluoro-marcados específicos para las proteínas CD16 y CD14 (Figura 4a). Los adultos mayores muestran un incremento significativo de los monocitos intermedios y no clásicos y una disminución en los monocitos clásicos, este hallazgo es compatible con el fenotipo pro-inflamatorio o “*inflammaging*” característico de la inmunosenescencia.



**Figura 4. Subpoblaciones de monocitos.**

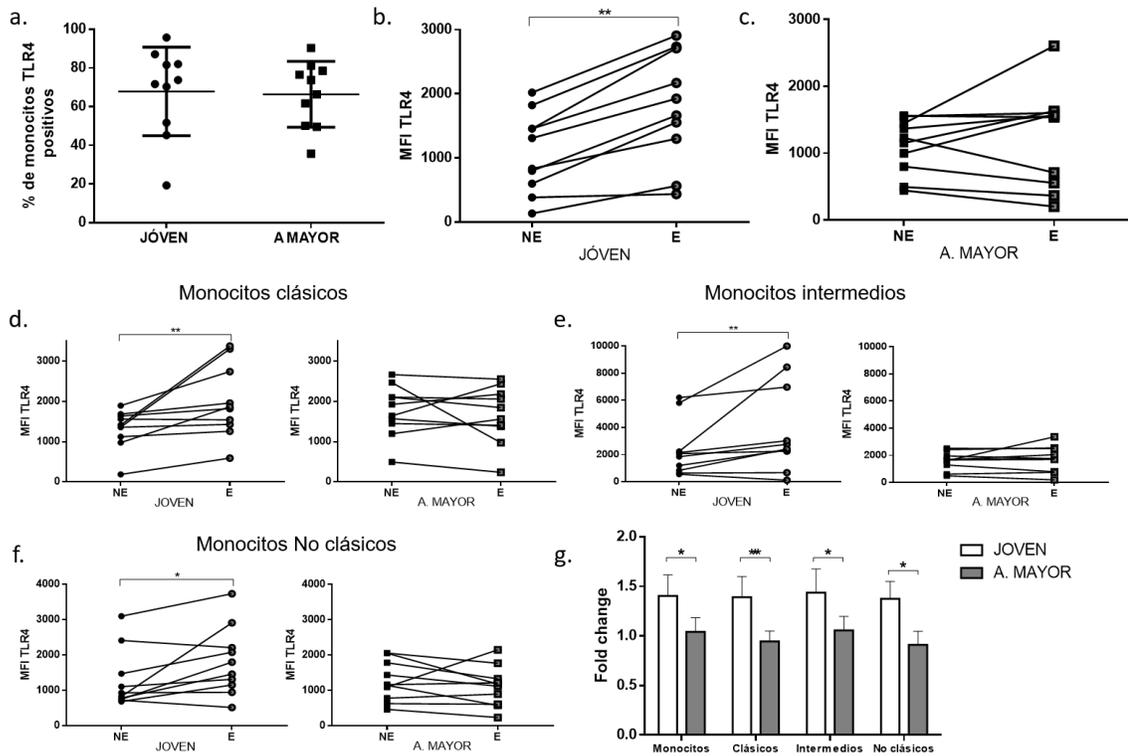
**a.** Estrategia de selección análisis utilizada para identificar las subpoblaciones de monocitos. Las PBMCs de cada individuo fueron escogidas mediante los parámetros de FSC-H vs FSC-A seguido del análisis por SSC-H vs SSC-W para seleccionar células únicas. Posteriormente, la selección de monocitos se hizo por tamaño y complejidad de las células (FSC-A vs SSC-A, respectivamente). Finalmente, las subpoblaciones de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos se identificaron con base en la expresión diferencial de CD14 y CD16 **b.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de las subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos en los grupos de jóvenes (barras blancas) y adultos mayores (barras grises) ( $n=10$ ). Los valores en todos los paneles son la media  $\pm$  SEM. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* con un valor *p*. significativo  $\leq 0,05$ .

### 1.3.2 Expresión de TLRs en monocitos en respuesta al estímulo *in vitro* con sus agonistas.

Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrón que reconocen patrones moleculares conservados en microbios y son clave para desencadenar respuestas de defensa antimicrobianas del huésped (42). Los TLR son un componente crítico de la vigilancia del sistema inmune innato para detectar patógenos invasores y se expresan en múltiples tipos de células, incluidos monocitos circulantes, neutrófilos y otros glóbulos blancos (114, 115). Deficiencias en la señalización de los TLRs se asocian con el desarrollo de algunas enfermedades como la sepsis, inmunodeficiencias, aterosclerosis y asma (42). Algunos estudios han observado que durante el envejecimiento hay un déficit de la

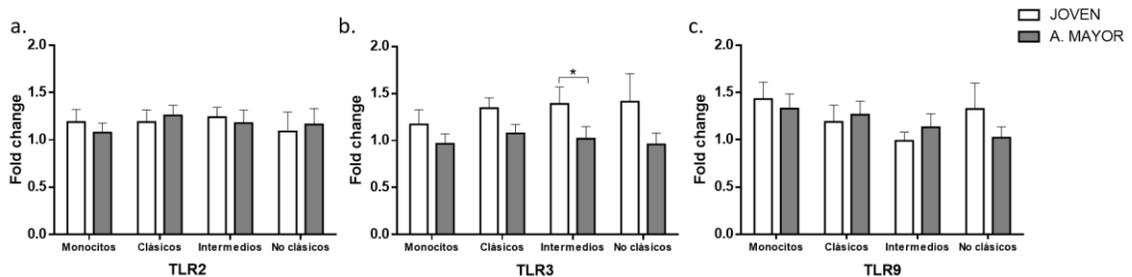
producción de citoquinas inducida por los TLRs la cual está asociada a una menor expresión en superficie de los TLRs (33).

La activación de los TLRs da como resultado una multitud de eventos proinflamatorios y antiinflamatorios que incluyen la regulación positiva de algunos TLRs, la producción de citoquinas y moléculas co-estimuladoras mediadas por la traslocación la núcleo de NF- $\kappa$ B y las señales de transducción mediadas por MAP kinasas (116). El nivel de expresión de TLRs fue comparado por citometría de flujo entre monocitos de un grupo de jóvenes sanos y un grupo de adultos mayores. Esta medición se hizo *ex vivo* (Figura 5a) y después de la estimulación *in vitro* con agonistas de TLRs (Pam3CSK, LPS, Poly I:C y CPG) durante 24 horas (Figura 5y Figura 6). Adicionalmente, la respuesta al estímulo con los agonistas se midió en términos de la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, cuantificadas en los sobrenadantes mediante el uso de un estuche comercial (CBA-inflamación). Cuando se estimula el TLR4 se evidencia una mayor respuesta en términos de la expresión positiva en los jóvenes que en los adultos mayores, tanto en los monocitos totales como en las subpoblaciones de monocitos (Figura 5). Sin embargo, el estímulo de monocitos con agonistas para TLR2, TLR3 y TLR9, no evidenció diferencias significativas entre los grupos de individuos (Figura 6 y Figura suplementaria 1, Figura suplementaria 2, Figura suplementaria 3, respectivamente) con excepción de los monocitos intermedios estimulados con Poly I:C que mostraron un mayor cambio en la expresión en el grupo de jóvenes comparado con los adultos mayores. En conjunto estos resultados muestran que mientras se detecta una deficiencia en los monocitos del adulto mayor para regular al alta la expresión del TLR4 en respuesta a LPS, no se identificaron diferencias en la expresión de los TLRs 2, 3 y 9 en monocitos de los dos grupos de voluntarios.



**Figura 5. Cambios en la expresión del TLR4 después de la estimulación con LPS.**

**a.** Gráfica de puntos que muestra el porcentaje de monocitos que expresan TLR4 aislados de un grupo de 10 jóvenes sanos contra un grupo de 10 adultos mayores sanos. **b.** Gráficas de símbolos y líneas que muestra el cambio en la expresión de TLR4 (MFI intensidad media de fluorescencia) con la estimulación con LPS 100 ng/ml en el grupo joven. **c.** En el grupo adulto mayor. **d. e. f.** Gráficas de símbolos y líneas que muestra cambios en la expresión de TLR4 con la estimulación en los dos grupos de estudio, en las diferentes subpoblaciones de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. **g.** Gráfica de barras que muestra el *fold change* de la expresión de TLR4 en las subpoblaciones de monocitos con la estimulación. Una prueba *t* no paramétrica, *wilcoxon test* para datos pareados se aplicó en **b, c, d, e y f**. Los valores en todos los paneles son la media  $\pm$  SEM. Una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* fue aplicada en **a y g**. (\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) ( $n = 10$ ).

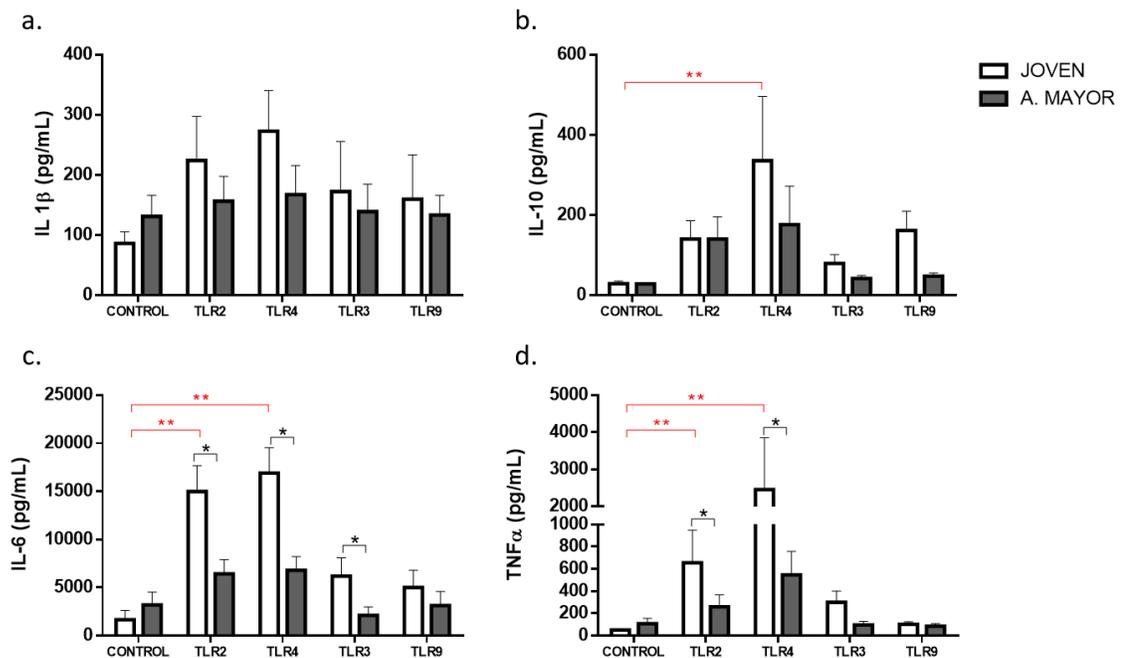


**Figura 6. Cambios en la expresión de TLRs después de la estimulación de monocitos con los agonistas de TLR2, TLR3 y TLR9.**

**a.** Gráfica de barras que muestra el *fold change* de la expresión de TLR2, **b.** TLR3 y **c.** TLR9 en las subpoblaciones de monocitos con la estimulación en un grupo de 10 jóvenes y en grupo de 10 adultos mayores. Los valores en todos los paneles son la media  $\pm$  SEM. Se aplicó una prueba *t* no paramétrica, *Mann-Whitney test* un valor *p* significativo  $\leq 0,05$ .

### **1.3.3 Los monocitos de los adultos mayores producen una menor cantidad de citoquinas cuando son estimulados con agonistas de TLRs.**

Una vez se ha dado el reconocimiento de PAMP y DAMP por los TLRs, estos receptores reclutan proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR como MyD88 y TRIF, que inducen la actividad de vías de transducción de señales que culminan en la activación de NF- $\kappa$ B, IRF o MAP quinasas que regulan la producción de citoquinas, quimiocinas e interferones tipo I. Esta producción temprana de mensajeros químicos (citoquinas y quimiocinas) es un componente esencial de la respuesta inmune contra la infección microbiana (116). Sin embargo, ha sido descrito que el envejecimiento está asociado a una disminución en la capacidad de los monocitos de producir citoquinas en respuesta a la estimulación de los TLRs y a un patrón de inflamación crónica de bajo grado y en consecuencia, son más susceptibles a desarrollar infecciones graves y/o a generar procesos autoinmunes (115). En este contexto, para evaluar si en esta muestra de adultos mayores se detecta una disminución en la producción de citoquinas, después de la estimulación *in vitro* de los monocitos con los diferentes agonistas de TLRs, se midió en los sobrenadantes de los monocitos estimulados la producción de citoquinas por CBA y se comparó entre jóvenes y adultos mayores luego del estímulo. Estos análisis mostraron que los adultos mayores exhiben la tendencia a un nivel basal de citoquinas proinflamatorias mayor que el de los jóvenes (Figura 7a, c y d) lo cual está acorde con lo descrito en la literatura (42). No obstante, después de la estimulación, los monocitos de los jóvenes producen una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias comparados con los monocitos de los adultos mayores, esto es especialmente cierto cuando se estimulan con agonistas del TLR2 y el TLR4. Además de lo anterior, llama la atención la elevada producción de IL-10 en células de los jóvenes después de su estimulación con un agonista del TLR4 (Figura 7b).

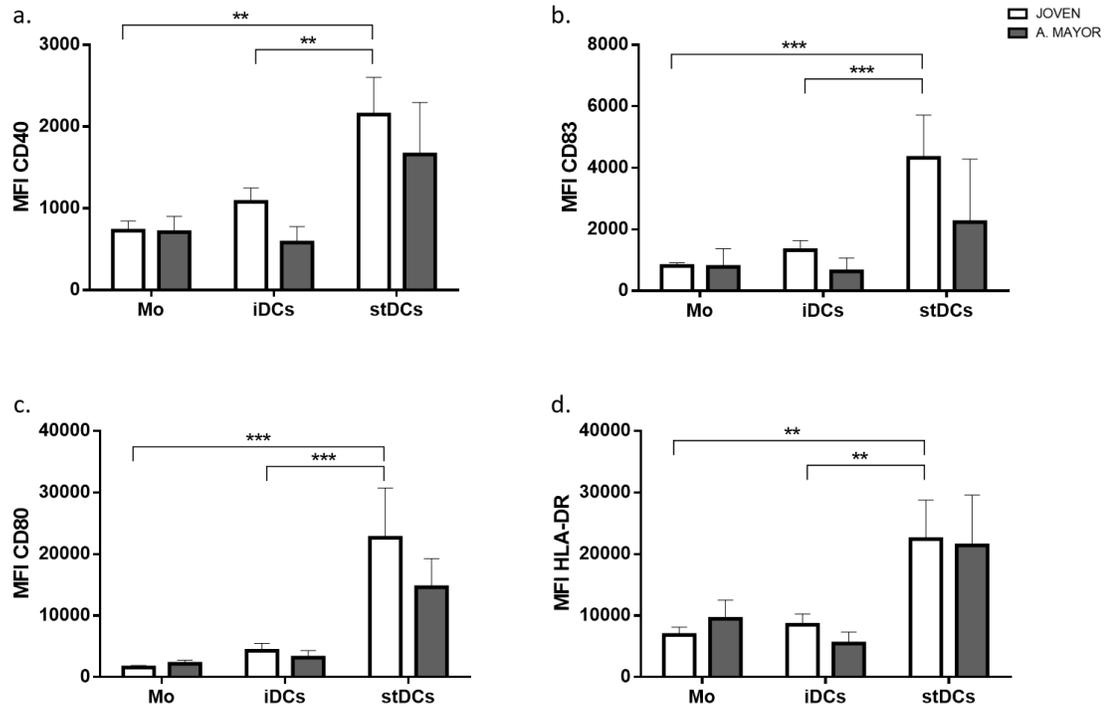


**Figura 7. Los monocitos de adultos mayores son menos respondedores a la estimulación de los TLRs.** Las barras indican la cantidad de citoquinas medidas en el sobrenadante de los cultivos después de 24 horas de estimulación con LPS 100ng/ml, Pam3CSK 100ng/ml, Poly I:C 5 ug/ml y CPG 5 ug/ml individualmente. La medición se realizó con CBA (Human inflammatory cytokine kit). **a.** Interleuquina 1beta, **b.** Interleuquina 10, **c.** Interleuquina 6 y **d.** Factor de Necrosis tumoral alfa. Se realizó una ANOVA de dos vías, (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ). Los valores en todos los paneles son la media  $\pm$  SEM. El n en todos los experimentos fue 10 por grupo.

### 1.3.4 Se detectan diferencias asociadas a la edad en la respuesta a un estímulo proinflamatorio de DCs inmaduras.

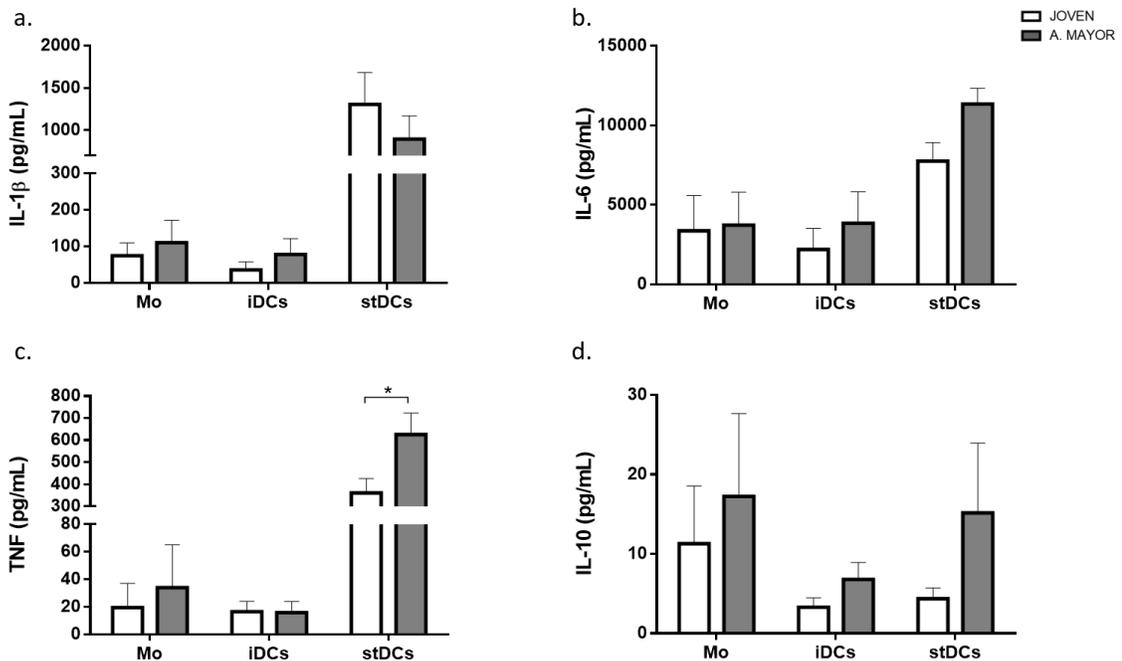
Por su capacidad para procesar y presentar el antígeno y otras funciones, las DCs han sido utilizadas ampliamente para la inmunoterapia de distintos tipos de cáncer (117). En este sentido, el grupo de investigación de Inmunología y Medicina Traslacional (I&MT) ha venido implementando en nuestro medio el uso de DCs obtenidas de monocitos de sangre periférica para la inmunoterapia del cáncer. Diferentes protocolos de maduración de DCs para su uso en inmunoterapia han sido descritos, los cuales originan DCs con diferentes fenotipos y capacidades para estimular distintos tipos de respuesta de los linfocitos T. Una variedad de cocteles manejados para maduración utilizan diferentes citoquinas y factores como agonistas de los TLRs como estímulo proinflamatorio (118). Teniendo en cuenta que con frecuencia los pacientes con cáncer son individuos de edad avanzada y que los monocitos de sangre periférica son base de la generación de DCs (moDCs), en este trabajo se consideró importante comparar el desempeño de monocitos de personas de edad

avanzada con los de individuos jóvenes como base de la generación de moDCs. De acuerdo con los cambios descritos previamente en las subpoblaciones de monocitos y la mayor expresión del TLR4 en monocitos de individuos jóvenes cuando estos son estimulados con LPS, se consideró importante evaluar si este tipo de diferencia pudiese también evidenciarse en la capacidad de maduración *in vitro* de DCs cuando estas son expuestas a un estímulo proinflamatorio. Por lo tanto, se aislaron monocitos de personas sanas jóvenes y mayores de 60 años y luego de su cultivo con GM-CSF e IL-4 se indujo la maduración a células dendríticas mediante el tratamiento con un coctel de maduración que contenía TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE-2 (coctel de citoquinas que origina DC maduras conocidas como DC-estandar (stDCs)). Si bien las células dendríticas maduras de individuos jóvenes muestran una tendencia a expresar en mayor proporción los marcadores de maduración cuando se les compara con las DCs maduras de los adultos mayores, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (lo cual pudo obedecer al bajo número de muestras analizadas por grupo (n=10), Figura 8). Sin embargo, con respecto al nivel de expresión de los marcadores en monocitos y DCs inmaduras, las DCs maduras de los jóvenes experimentaron un aumento significativo de los marcadores de maduración en respuesta al estímulo proinflamatorio lo cual no pudo ser evidenciado en DCs maduras de adultos mayores. A pesar de la menor respuesta al coctel de maduración de las DCs inmaduras en los adultos mayores la cuantificación de citoquinas en el sobrenadante mostró que las DCs maduras de adultos mayores secretaron una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias comparadas con las DCs maduras de los jóvenes, especialmente TNF $\alpha$  (Figura 9c). Esto último puede estar asociado con una mayor frecuencia de monocitos proinflamatorios presentes en los adultos mayores como se demostró en la Figura 4b, los cuales tienen en la capacidad de secretar altos niveles de TNF $\alpha$ , una de sus propiedades más características (119). No obstante, aunque las DCs maduras de los adultos mayores secretaron una mayor cantidad de TNF $\alpha$ , estas células también secretaron una mayor cantidad de IL-10 (una citoquina que participa en la inducción de tolerancia de linfocitos T).



**Figura 8. Cambios en la expresión de marcadores de maduración de las DCs.**

Gráficas de barras que muestran el cambio en la expresión de marcadores de maduración en tres condiciones diferentes Mo: Monocitos, iDCs: Células dendríticas inmaduras (GM-CSF + IL-4) y stDCs: células dendríticas estándar (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE-2) en los dos grupos de comparación jóvenes (barras blancas) y adultos mayores (Barras grises). MFI (intensidad media de fluorescencia) de **a.** CD40, **b.** CD83, **c.** CD80 y **d.** HLA-DR. Los valores en todos los paneles son la media  $\pm$  SEM. Se aplicó una ANOVA de 2 vías. (\*\*\*) $p$ <0.001; (\*\*) $p$ <0.01; (\*) $p$ <0.05) (n=10).

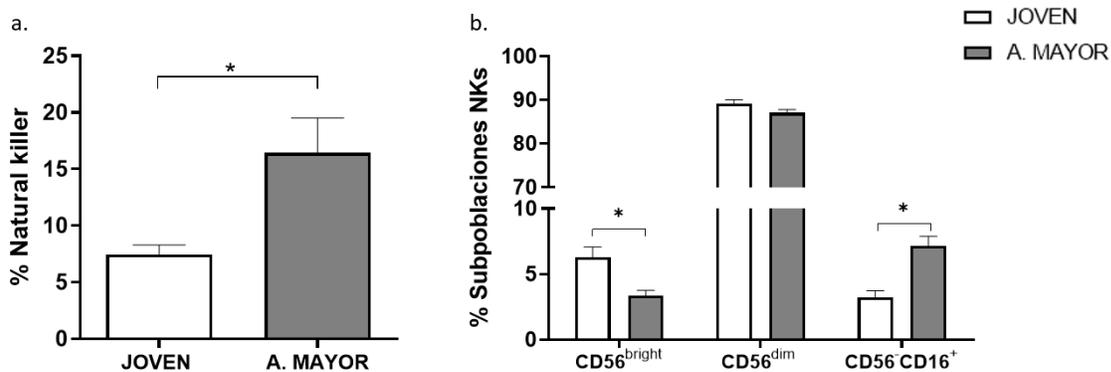


### Figura 9. Cambios en la secreción de citoquinas en células dendríticas maduras de jóvenes y adultos mayores.

Las gráficas de barras indican la cantidad de citoquinas en pg/ml medidas en el sobrenadante de las tres condiciones de cultivo Mo: Monocitos, iDCs: Células dendríticas inmaduras (GM-CSF + IL-4) y stDCs: células dendríticas estándar (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE-2) en los dos grupos de comparación jóvenes (barras blancas) y adultos mayores (Barras grises). La medición se realizó con CBA (Human inflammatory cytokine kit). **a.** Interleuquina 1beta (IL-1B), **b.** Interleuquina 6 (IL-6) **c.** Factor de Necrosis tumoral (TNF) y **d.** Interleuquina 10 (IL-10). Se realizó una prueba *t* no paramétrica, *Mann-Whitney test*. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) (n=10). Los valores en todos los paneles son la media  $\pm$  SEM.

### 1.3.5 Incremento de las células natural killer (NK) circulantes en los adultos mayores.

Las NKs son células del sistema inmune innato encargadas de eliminar las células infectadas, malignas o senescentes, representan cerca del 5 al 20% del total de linfocitos periféricos (120). En humanos, las subpoblaciones de NKs se clasifican de acuerdo con el nivel de expresión del marcador de citotoxicidad CD56 (23). Se han descrito principalmente dos subpoblaciones de NKs, la primera comprende el 90% de las NKs circulantes son CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> y altamente citotóxicas y las segundas, son CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> productoras de citoquinas como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (120). Se ha reportado una población adicional que es CD56<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>, que se encuentra principalmente en pacientes con infecciones latentes por virus (121). El envejecimiento afecta el número, la distribución de las subpoblaciones y la función de las NKs; en línea con lo anterior, a través de un panel multicolor se evaluó los cambios en estas células en nuestra muestra de voluntarios. Como resultado de estos análisis se evidenció que los adultos mayores tienen una mayor cantidad de células NKs circulantes en sangre periférica en comparación con los jóvenes (Figura 10a). Además, se encontró una disminución en las subpoblaciones de CD56<sup>bright</sup> y una expansión en las células CD56<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>, (Figura 10b).



### Figura 10. Cambios en células NKs asociados a la edad.

**a.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de NKs totales circulantes en los grupos de estudio. **b.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de las tres subpoblaciones principales. Se aplicó una prueba *t* no

paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* (\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) ( $n=10$ ). Los valores representados son la media  $\pm$  SEM.

### 1.3.6 Cambios en la expresión de receptores de NKs con la edad.

La funcionalidad de las NKs depende de un equilibrio entre las señales de activación e inhibición detectadas por los receptores de citotoxicidad (NKp30, NKp46, NKp44 y NKG2D) y los receptores inhibitorios tipo KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*) (120), y el envejecimiento puede afectar la expresión de estos receptores de NKs. En tal sentido, se ha descrito una disminución con el envejecimiento en la expresión de receptores de citotoxicidad natural como NKp30 y NKp46 (122), y un incremento en la expresión de receptores inhibitorios tipo KIR (123). Adicionalmente, una mayor expresión de CD57 con la edad se ha asociado con NKs maduras (23). No obstante, este aumento en la expresión de CD57 se presenta también en infecciones virales crónicas (123). A pesar de la cantidad de investigaciones al respecto aún hay discrepancias frente al comportamiento de los receptores con la edad. De acuerdo con estos antecedentes realizamos la evaluación de la expresión de NKG2D, NKp30, KLRG1 y CD57 en las diferentes subpoblaciones de NKs en nuestros grupos de estudio. Con la edad encontramos una disminución en la expresión de NKp30 y KLRG1, y un aumento en la expresión de CD57 principalmente en las subpoblaciones CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>neg</sup> (Figura 11).

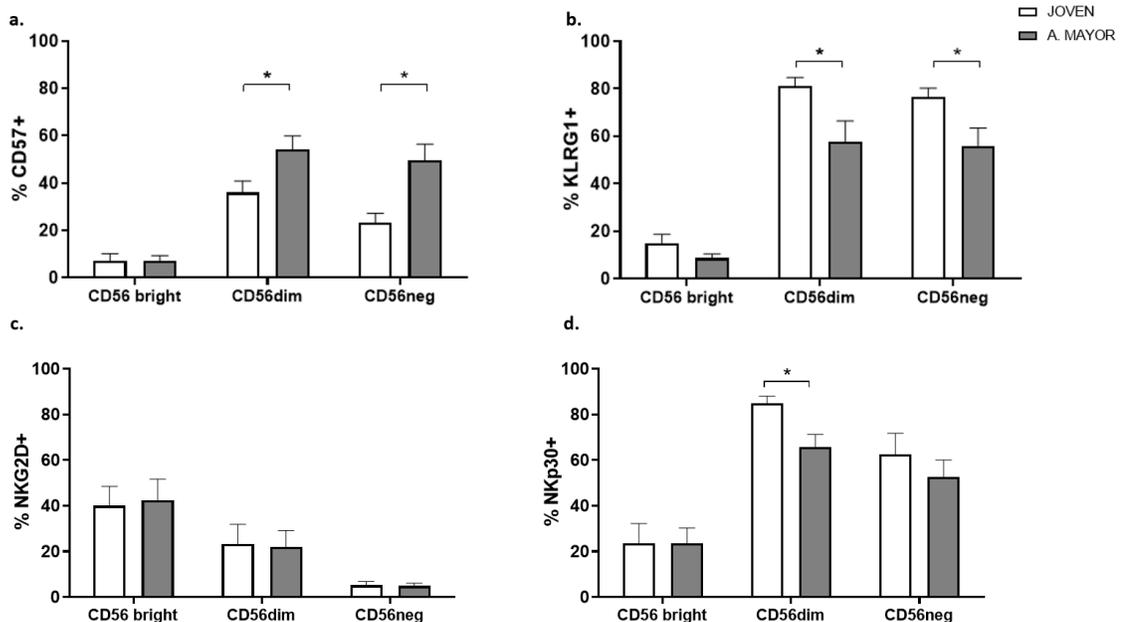


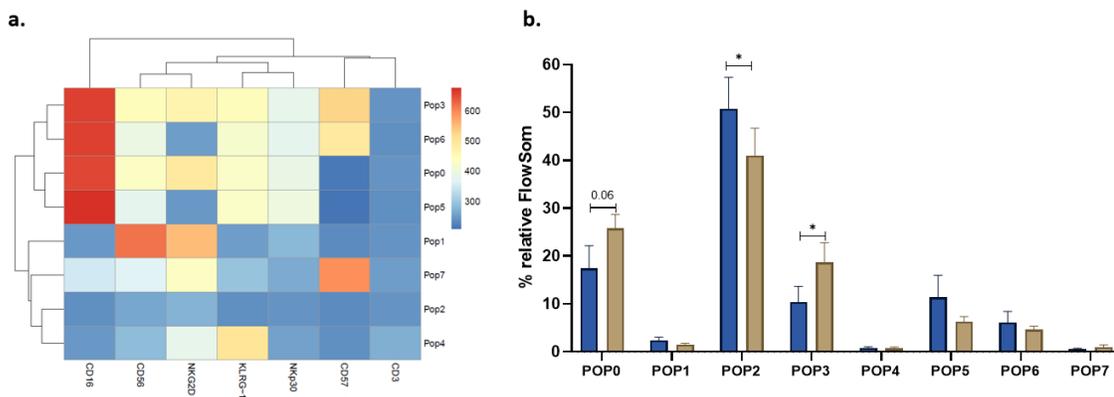
Figura 11. Jóvenes y adultos mayores exhiben diferencias en la expresión de receptores en subpoblaciones de NKs.

a. Gráfica de barras que muestra el porcentaje de NKs que expresan CD57, b. KLRG1, c. NKG2D y d. NKp30 en las diferentes subpoblaciones de NKs. Barras blancas (Jóvenes) y barras grises (adultos mayores). Se aplicó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* (\*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10). Los valores representados son la media ± SEM.

### 1.3.7 El análisis multidimensional evidenció diferencias en la distribución de poblaciones de NKs entre adultos mayores y jóvenes.

En la actualidad, la mayoría de los experimentos en citometría de flujo utilizan paneles multicolor con más de siete fluorocromos, cuya co-expresión se dificulta mediante el análisis manual. FlowSOM (*SOM: self-organizing map*) (124) es una herramienta para el análisis automatizado no supervisado de agrupamiento y reducción de la dimensionalidad que reduce la complejidad de la distribución de células marcadas presente en una muestra a gráficos en dos dimensiones. En estos, la distribución de eventos obedece a la distribución de poblaciones celulares que co-expresan los marcadores evaluados y permite establecer - de manera jerárquica - la distribución semicuantitativa de subpoblaciones de células que co-expresan todos los marcadores, algo difícil de establecer mediante el análisis manual. El algoritmo consta de cuatro pasos: (i) lectura de los datos, (ii) la construcción de un mapa autoorganizado, (iii) la construcción de un árbol de expansión mínima y (iv) la computación de un meta-agrupamiento. FlowSOM se puede utilizar como punto de partida para un análisis de datos o se puede utilizar después de que se haya realizado un análisis manual, para confirmar y visualizar los resultados (124).

En este contexto, el análisis por FlowSOM de NKs en las muestras analizadas (marcadas con anticuerpos contra siete distintos receptores de membrana marcados con fluorocromos distintos como se describe en materiales y métodos), permitió acorde con la expresión diferencial de estos receptores identificar ocho subpoblaciones de NKs. Comparando las diferentes subpoblaciones, la población dos es una población negativa para todos los marcadores incluidos en el panel la cual se encuentra significativamente aumentada en los jóvenes (Figura 12); por su parte, la población 0 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>++</sup>CD57<sup>-</sup>KLRG1<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>NKp30<sup>Low</sup>) y la población 3 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>++</sup>CD57<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>NKp30<sup>Low</sup>) que corresponden a subpoblaciones de NKs citotóxicas con fenotipo maduro se encontraron incrementadas en los adultos mayores.



**Figura 12. Análisis de subpoblaciones de NKs por FlowSOM.**

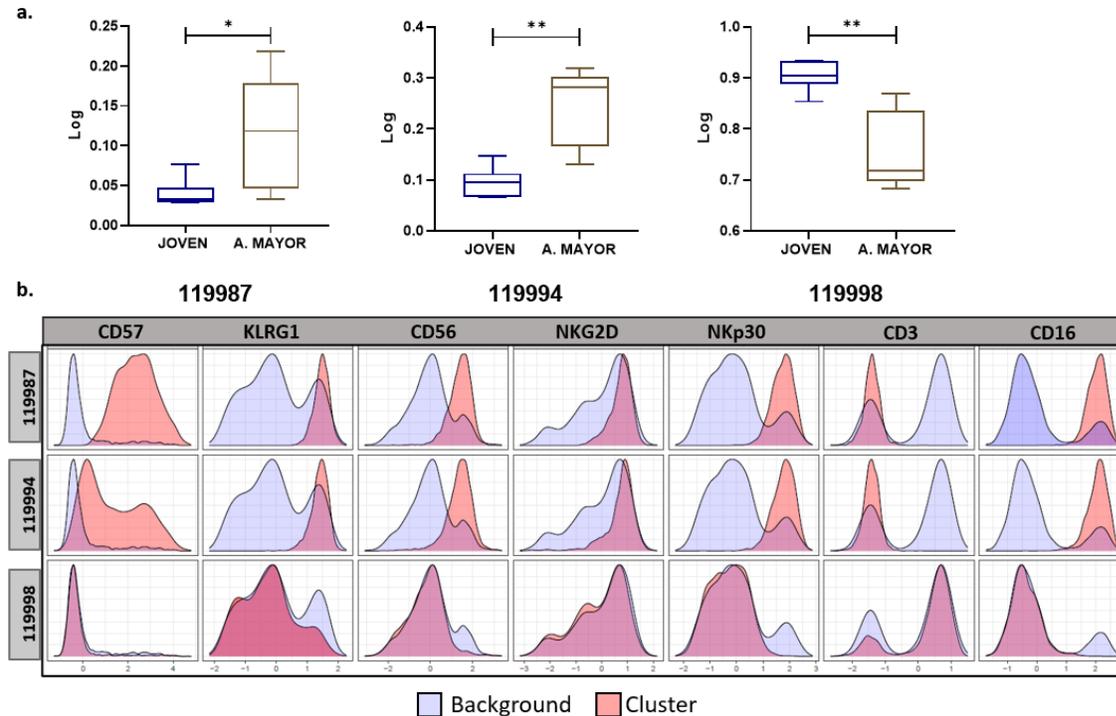
**a.** Mapa de calor que muestra el perfil de expresión relativa de cada marcador en los ocho *clústeres* identificados en el archivo concatenado de las muestras analizadas (n=10). **b.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de células NKs en cada grupo en los principales *clústeres* identificados por FlowSOM. Jóvenes (Azul oscuro), adultos mayores (Marrón). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test*. Barra de error indica SEM. (\**p*<0.05) (n=10).

### 1.3.8 Las poblaciones identificadas en FlowSOM se confirmaron en el análisis automatizado con CITRUS.

Un algoritmo adicional para el análisis de los datos de citometría de flujo generados en PBMCs marcados con paneles multicolor fue Citrus (*cluster identification, characterization, and regression*) (125). Citrus realiza de manera no supervisada la identificación y la estratificación de subpoblaciones celulares presentes en una muestra como resultado del procesamiento del conjunto de datos obtenidos de muestras de células marcadas con un panel multicolor y analizadas por citometría de flujo. Citrus aplica el agrupamiento jerárquico para la identificación de clúster de células dentro de un conjunto de datos, calcula las características descriptivas de cada clúster y luego aplica métodos de aprendizaje no supervisado regularizado con el fin de determinar como punto final de análisis en la muestra, no solo los subconjuntos de células más representativos de cada muestra sino que además permite establecer comparaciones acerca de la presencia relativa de las subpoblaciones de células representativa de cada muestra entre grupos de individuos analizados, en nuestro caso entre jóvenes y adultos mayores. En consecuencia, citrus permite identificar poblaciones de células cuyo comportamiento es predictivo de criterios de valoración clínicos y/o experimentales (125).

Al procesar por citrus los datos de las muestras de los dos grupos de análisis en nuestro estudio (jóvenes y adultos mayores), citrus permitió identificar tres clústeres de NKs que exhiben expresión diferencial entre los dos grupos. Mientras que los clústeres 119987 y

119994 con un perfil de expresión de marcadores similar al de las poblaciones 0 y 3 establecido por FlowSOM (Figura 12) tuvieron una expresión significativamente mayor en los adultos mayores, el clúster 119998 (caracterizado por una expresión negativa de todos los marcadores), se encontró significativamente disminuido en los adultos mayores (Figura 13).



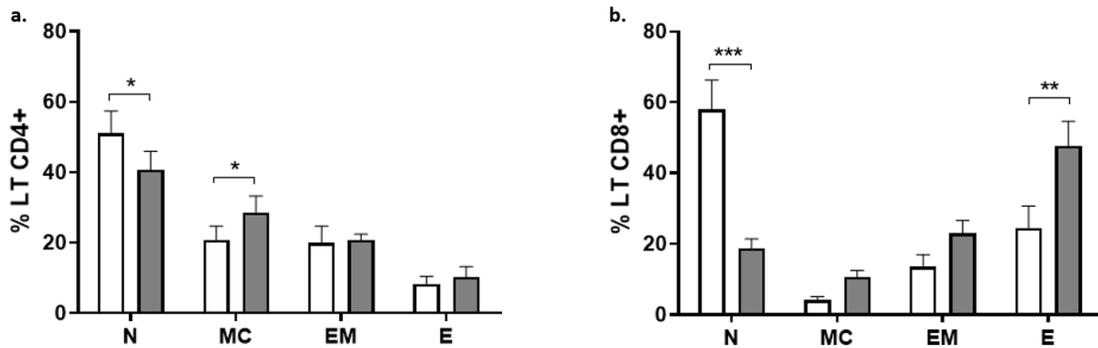
**Figura 13. Fenotipo y abundancia de los clústeres asociados al fenotipo NKs en jóvenes y adultos mayores.**

Cada corrida de Citrus se realizó con 10.000 eventos por muestra, el número mínimo de células para considerar un grupo fue de 2.500 células. Los gráficos de caja y bigotes representan la abundancia de un grupo en términos de porcentaje del total de eventos (\*\* $p < 0.01$ ). Los histogramas muestran la expresión de los marcadores celulares considerados en el panel multicolor analizado (CD57, KLRG1, CD56, NKG2D, NKp30, CD3, CD16) en la muestra global (histograma azul: fondo, histograma rojo: expresión de grupo). **a.** clúster 1 y **b.** clúster 2, incrementados en adultos mayores. **c.** Clúster 3 negativo para todos los marcadores aumentado en jóvenes. Se realizó una prueba  $t$  no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los jóvenes y los adultos mayores. Barra de error indica SEM ( $n=10$ ).

### 1.3.9 Disminución de las subpoblaciones vírgenes de LT en los adultos mayores

La involución tímica que se produce a lo largo de la vida genera una disminución en el recambio de LT; en consecuencia, con el envejecimiento se hace evidente una disminución importante del pool de LT vírgenes y una expansión significativa de las poblaciones de LT terminalmente diferenciadas con características senescentes. El fenotipo senescente de

LT se caracteriza por el aumento en superficie de la expresión de marcadores de maduración CD57 y KLRG1 (32, 57) y la disminución en la capacidad de respuesta del TCR al antígeno (58). Evaluando las poblaciones de LT en la muestra analizada encontramos que efectivamente estos cambios se encuentran asociados a la edad avanzada principalmente en LT CD8+ que muestran una disminución significativa de la subpoblación de LT vírgenes (N) y un incremento significativo de la subpoblación efectora (E). Por su parte, en los LT CD4+ los principales cambios asociados a la edad avanzada fueron la disminución de la subpoblación de LT vírgenes (N) y el aumento de los LT de memoria central (MC) (Figura 14).

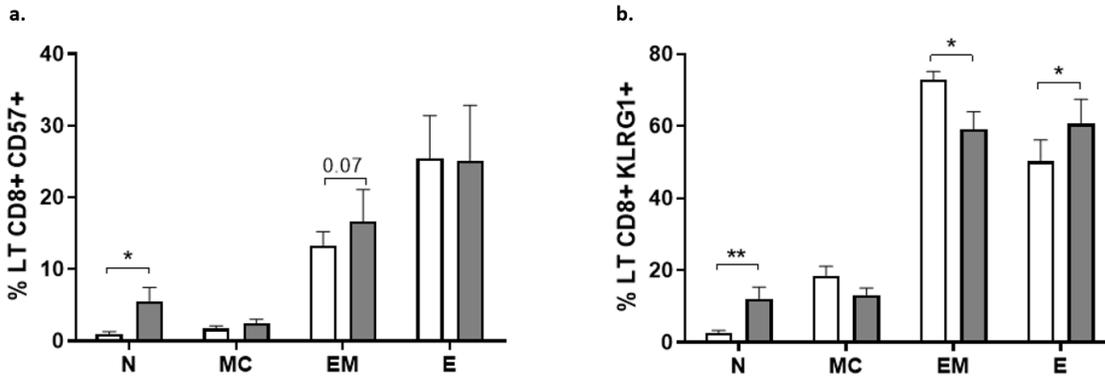


**Figura 14. Cambios en las poblaciones de memoria de LT con el envejecimiento.**

Gráfica de barras que muestra el porcentaje de cada subpoblación de LT vírgenes (N), de memoria central (MC) de memoria efectora (EM) y efectoras terminales (E) en los dos grupos de individuos en estudio jóvenes (barras blancas) y adultos mayores (barras grises) tanto en LT CD4+ *ex vivo* (a) como en LT CD8 *ex vivo* (b). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los grupos. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.001; \*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10/grupo).

### 1.3.10 Los LT CD8 vírgenes expresan marcadores de senescencia.

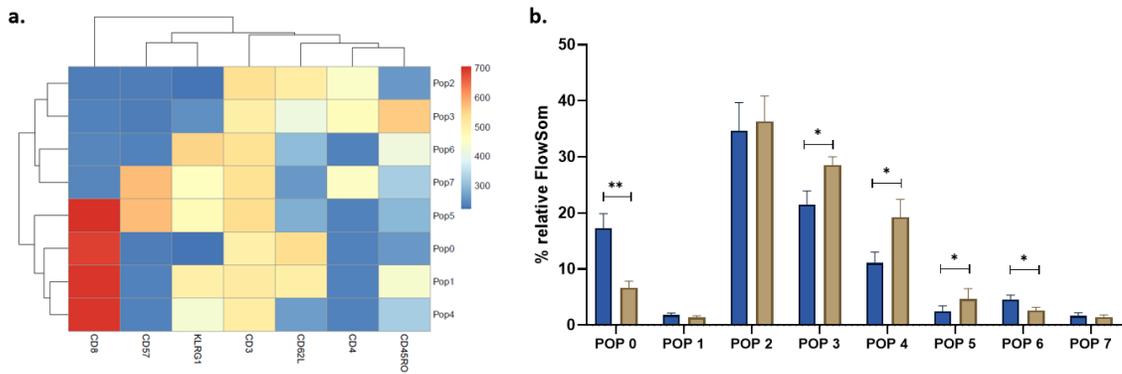
Al comparar la expresión diferencial de marcadores de senescencia (CD57 y KLRG1) entre LT de adultos mayores y jóvenes, encontramos un incremento significativo de la expresión de estos marcadores en la subpoblación de LT CD8+ vírgenes en los individuos adultos mayores (Figura 15). En contraste con lo encontrado en LT CD8+ no encontramos cambios significativos en la expresión de estos marcadores en las subpoblaciones de LT CD4+ entre jóvenes y adultos mayores (Figura suplementaria 4).



**Figura 15. Expresión de marcadores de senescencia en las poblaciones de memoria de LT CD8+.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT CD8+ que expresan CD57 (a.) y KLRG1 (b.) en la superficie de distintas subpoblaciones de LT CD8+: vírgenes (N), de memoria central (MC), memoria efectora (EM) y efectoras terminales (E), en los dos grupos de estudio jóvenes (barras blancas), adultos mayores (barras grises). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los grupos. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.001; \*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10/grupo).

### 1.3.11 Análisis automatizado de subpoblaciones de LT por FlowSOM y CITRUS

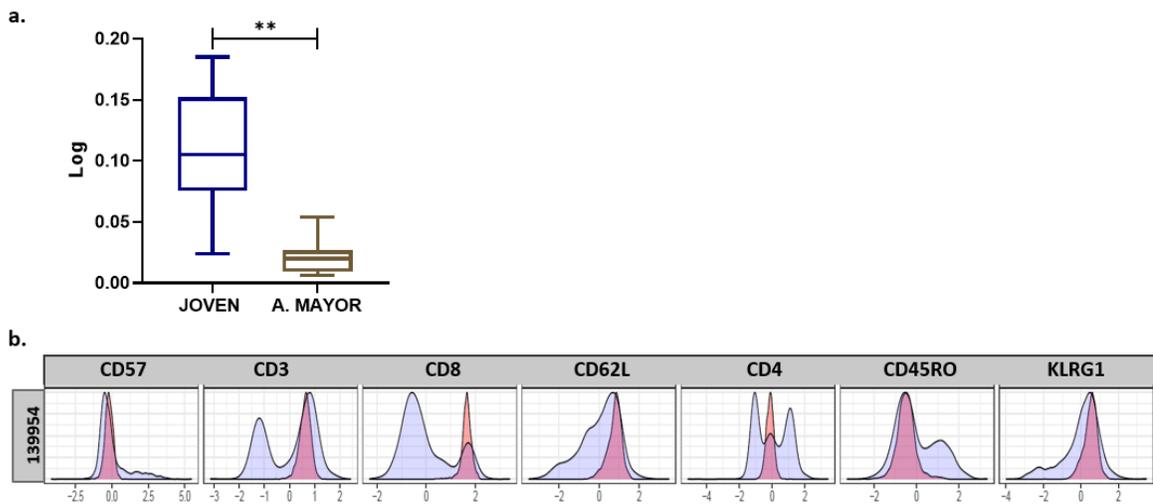
Para confirmar los hallazgos del análisis manual, se realizó el análisis automatizado del panel multicolor de LT mediante FlowSOM, se encontraron cuatro clústeres aumentados en los adultos mayores. (i) La población 3 (Pop3: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62<sup>low</sup>) que corresponde a una población de LT CD4<sup>+</sup> de memoria efectora que no expresa marcadores de senescencia, (ii) la población 4 (Pop4: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup>) que corresponde a una población de LT CD8<sup>+</sup> efectores terminalmente diferenciados que expresan KLRG1, (iii) la población 5 (Pop5: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>) que corresponde a una población terminalmente diferenciada que expresa los dos marcadores de senescencia y (iv) la población 6 (Pop6: CD3<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup> negativa para CD4<sup>+</sup> y CD8). Mientras los hallazgos de las poblaciones 4 y 5 coinciden con lo encontrado en el análisis manual (Figura 15), la población 6 podría corresponder a una población NKT excluida en dicho análisis. En contraste con el aumento de estos cuatro clústeres celulares de manera selectiva en el adulto mayor, un clúster de LT CD8<sup>+</sup> (pop0 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), resultado aumentado selectivamente en los jóvenes. El aumento de esta población de LT CD8<sup>+</sup> virgen detectada por FlowSOM en los jóvenes coincide con el incremento significativo de esta población encontrado en el grupo de individuos jóvenes en el análisis manual (Figura 14).



**Figura 16. Análisis automatizado de LT por Flow SOM.**

**a.** Mapa de calor que muestra el perfil de expresión de cada marcador en los 8 clústeres identificados en el archivo concatenado de las 10 muestras. **b.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT de cada grupo en los principales clústeres identificados por FlowSOM. Jóvenes (Azul oscuro), adultos mayores (Marrón). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test*. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.001; \**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10/grupo).

A diferencia de lo encontrado en FlowSOM, Citrus identificó principalmente un clúster que esta significativamente aumentado en los jóvenes (Figura 17), que tiene características en común con la población 0 (pop0 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) identificada en FlowSOM la cual también esta incrementada en los jóvenes (Figura 16). En conjunto estos resultados sugieren que el cambio más representativo en LT asociado al envejecimiento es la disminución de la subpoblación de LT CD8<sup>+</sup> vírgenes.



**Figura 17. Fenotipo y abundancia del clúster identificado en LT.**

Cada corrida de Citrus se realizó con 10.000 eventos por muestra, el número mínimo de células para considerar un grupo fue de 2.500 células. Los gráficos de caja y bigotes representan la abundancia de un grupo en términos de porcentaje del total de eventos (\*\**p*<0.01). **a.** Grafica de cajas y bigotes que muestra la diferencia del clúster entre los grupos. **b.** Los histogramas muestran la expresión de los marcadores celulares considerados en el panel multicolor analizado (CD57, CD3, CD8, CD62L, CD4, CD45RO, KLRG1) en la muestra global (histograma azul: fondo, histograma rojo: expresión de grupo). Se realizó una prueba *t* no

paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los jóvenes y los adultos mayores. Barra de error indica SEM (n=10).

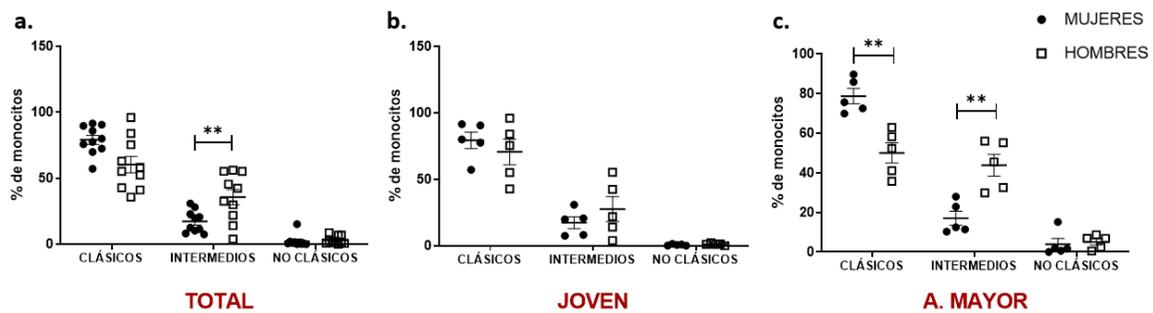
### **1.3.12 Influencia de las diferencias sexuales en la distribución de diferentes poblaciones de leucocitos.**

Mujeres y hombres difieren en varios aspectos fisiológicos, incluyendo la respuesta inmune. Estas diferencias pueden estar relacionadas con las hormonas esteroideas sexuales (estrógenos, progesterona y testosterona), genética (efecto del cromosoma X) y factores medioambientales (126). La evidencia epidemiológica muestra que mientras los hombres mayores son más susceptibles a padecer enfermedades infecciosas complicadas, y a la muerte por cáncer (127), las mujeres mayores tienden a generar una respuesta inmune más vigorosa que favorece una mayor incidencia de autoinmunidad (128). Las diferencias entre mujeres y hombres pueden identificarse en muchos niveles de la respuesta inmune. Sin embargo, la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, el cáncer y la autoinmunidad históricamente han sido analizadas desde el punto de vista biológico subestimando el papel que el género pueda jugar como factor que predispone a algunas enfermedades (126). Estas diferencias en la respuesta inmune entre hombres y mujeres pueden obedecer a cambios en la distribución de poblaciones de leucocitos, y la producción de citoquinas. Algunos estudios han mostrado, por ejemplo, que el porcentaje de NKs es mayor en hombres que en mujeres (122). Otros estudios han mostrado aumentos de la producción de citoquinas proinflamatorias tanto en hombres como en mujeres, con resultados no concluyentes (126). Un análisis completo del efecto de las diferencias sexuales en la respuesta inmune es un tema difícil y complejo de estudiar en una muestra pequeña de individuos y a pesar de que esta observación no estaba dentro del alcance de los objetivos de la presente investigación, en este trabajo evaluamos entre hombres y mujeres diferencias en la distribución en sangre periférica de subpoblaciones de monocitos, NK y LTs cuantificables por citometría de flujo.

- **Los hombres adultos mayores tienen un mayor porcentaje de monocitos intermedios que las mujeres.**

Utilizando la misma estrategia de selección de la Figura 4, se comparó entre hombres y mujeres la distribución de las subpoblaciones de monocitos definidas a partir de la expresión diferencial de CD14 y CD16 en una muestra de monocitos de hombres jóvenes y de edad avanzada Vs. monocitos de mujeres jóvenes y de edad avanzada, total (Figura 18) y separados de acuerdo con la edad (jóvenes Figura 18b y adultos mayores Figura

18c). A nivel de monocitos totales (jóvenes y adultos mayores sumados), se encontró que los hombres tienen un porcentaje significativamente mayor de monocitos intermedios que las mujeres (Figura 16a) y esta diferencia es probablemente atribuible al porcentaje significativamente mayor de esta subpoblación de monocitos detectada en la sangre de hombres adultos mayores cuando se compara con los porcentajes de esta subpoblación de células presente en la sangre de mujeres adultas mayores. Es de anotar que también se detectó una disminución significativa de los monocitos clásicos en la sangre de hombres adultos mayores con respecto a los niveles de estos monocitos detectados en mujeres adultas mayores.

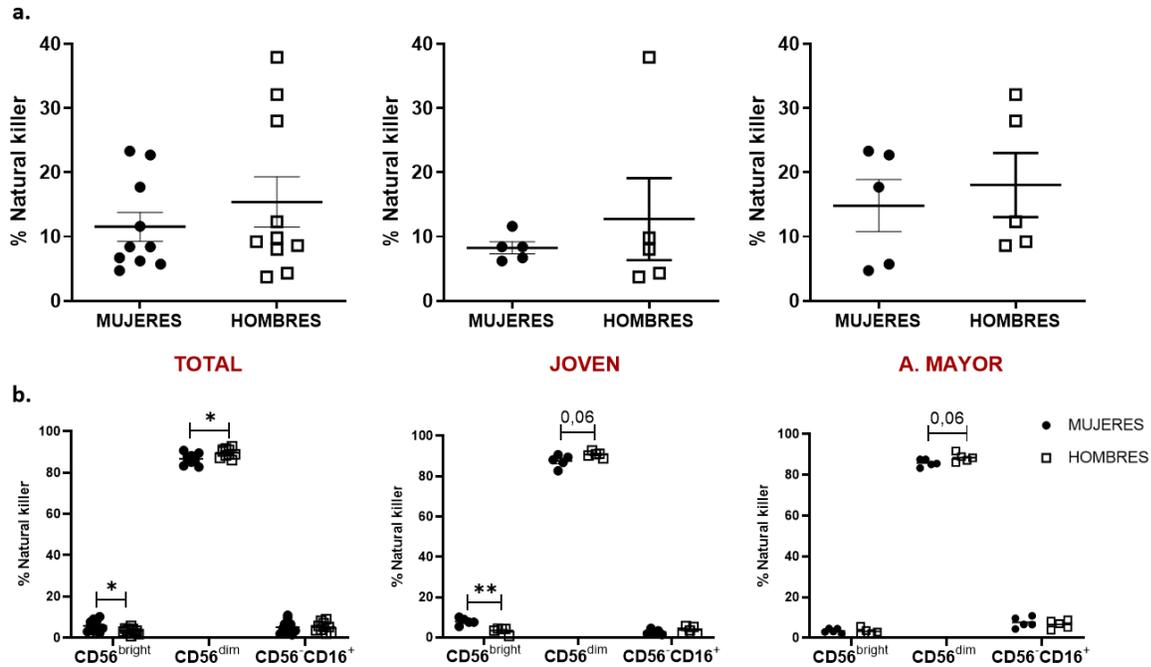


**Figura 18. Los hombres adultos mayores tienen un mayor porcentaje de monocitos intermedios en comparación con las mujeres de edad avanzada.**

a. Gráfica de puntos de dispersión que muestra el porcentaje de las subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos en los dos grupos mujeres (círculos negros) y hombres (cuadrados blancos) muestra total (n=10) b. grupo joven (n=5) y c. Grupo adulto mayor (n=5). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* (\*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ). Los valores representados son la media  $\pm$  DS.

#### ▪ Influencia de las diferencias de sexo en los porcentajes de células NK detectados en sangre.

Utilizando la misma estrategia de selección de la Figura 10, se comparó el porcentaje de NKs totales circulantes y la distribución de las subpoblaciones  $CD56^{bright}$ ,  $CD56^{dim}$  y  $CD56^{neg}$  entre hombres y mujeres participantes en la muestra total y separando los jóvenes de los adultos mayores. No se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres en el porcentaje total de NKs circulantes; tampoco se detectaron diferencias al separar los hombres y mujeres por edad (Figura 19a). El análisis de las subpoblaciones de NKs, reveló una tendencia al incremento de la subpoblación  $CD56^{dim}$  en los hombres tanto jóvenes como adultos mayores y una disminución significativa de la subpoblación  $CD56^{bright}$  principalmente en los hombres jóvenes.

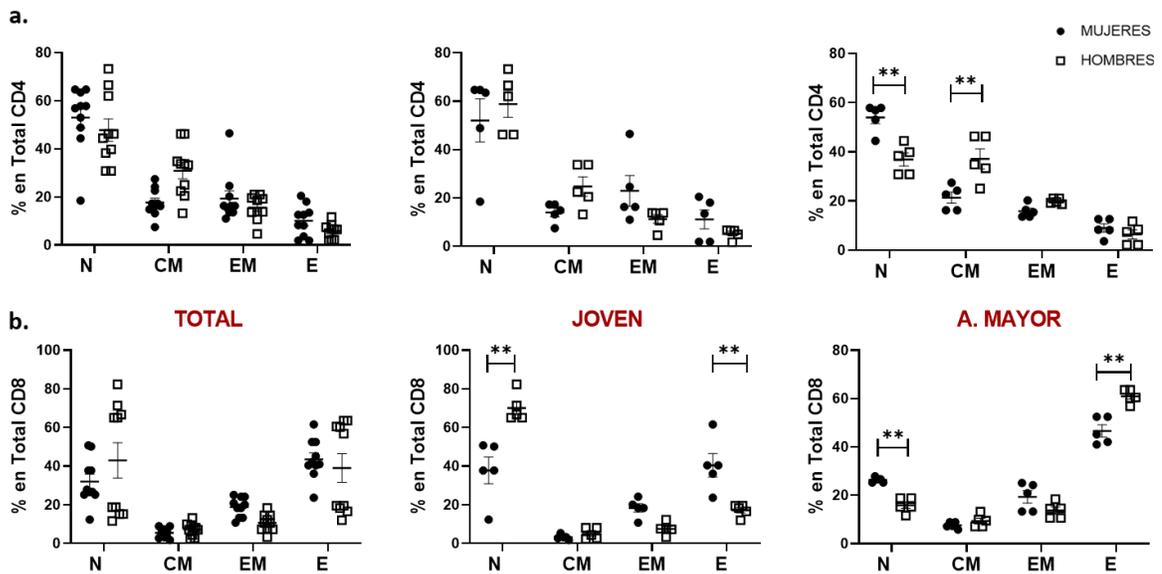


**Figura 19. Hombres y mujeres exhiben diferencias en el porcentaje de células NKs.**

**a.** Gráfica de puntos de dispersión que muestra el porcentaje de NKs totales circulantes en mujeres (círculos) y hombres (cuadrados) en la muestra total, grupo joven y grupo adulto mayor. **b.** Gráfica de puntos de dispersión que muestra el porcentaje de las tres subpoblaciones de NKs CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>neg</sup> en mujeres (círculos negros) y hombres (cuadrados blancos) en la muestra total, grupo joven y grupo adulto mayor. Se aplicó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* (\*\**p*<0.01; \**p*<0.05). Los valores representados son la media ± DS.

#### ▪ Análisis de la distribución de subpoblaciones de LT en hombres y mujeres.

La distribución porcentual de las distintas subpoblaciones de LT CD4+ y de LT CD8+ fue comparada entre hombres y mujeres participantes en el estudio. Este análisis reveló porcentajes similares de cada una de las subpoblaciones tanto de LT CD4+ como de LT CD8+ en las muestras de hombres y mujeres analizadas (Figura 20a y b). Sin embargo, al comparar hombres y mujeres en el grupo de adultos mayores encontramos que mientras las mujeres tenían un porcentaje significativamente mayor tanto de LT CD4+ como LT CD8+ vírgenes (Figura 20a y b, panel A. MAYOR), los hombres tenían un aumento significativo tanto de LT CD4+ de memoria central como de LT CD8+ efectores (Figura 20a y b, respectivamente).



**Figura 20. Diferencias asociadas al sexo y a la edad en la distribución de distintas poblaciones de LT.** Gráfica de dispersión de puntos donde se muestra el porcentaje de cada subpoblación de células vírgenes y de memoria en mujeres (círculos negros) y hombres (cuadrados blancos) detectada *ex vivo* en la muestra total, grupo de individuos jóvenes y grupo de adultos mayores en LT CD4+ (a) y en LT CD8 (b) Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los grupos. (\*\*p<0.01; \*p<0.05). Los valores representados son la media ± DS.

## 1.4 Discusión

El envejecimiento es un proceso caracterizado por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas, fisiológicas y metabólicas que conlleva, en la mayoría de los casos, a un incremento de la susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares e inflamatorias crónicas (129). Este proceso se traduce a nivel celular en la disminución de la capacidad proliferativa, arresto del ciclo celular, expresión de marcadores asociados con senescencia/agotamiento y acumulación de células senescentes. Para analizar el efecto del envejecimiento a nivel celular, se determinó mediante citometría de flujo multiparamétrica el perfil fenotípico y funcional de diferentes subpoblaciones leucocitos a partir de PBMCs en un grupo de individuos sanos. Dentro de las poblaciones celulares presentes en sangre, los monocitos, células esenciales en la respuesta inmune por su capacidad fagocítica útil para el procesamiento y presentación del antígeno y para la producción de citoquinas, resultan ser células claves en la disfunción inmune relacionada con la edad (119). En nuestro estudio, se observó que los adultos mayores presentan una disminución de monocitos clásicos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> y un incremento de monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Los monocitos intermedios son células proinflamatorias productoras de citoquinas como TNF $\alpha$  e IL-6. Estas citoquinas juegan un papel importante

en el envejecimiento de origen inflamatorio o *inflammaging* (130). Además, algunos estudios han encontrado asociación entre la variación en las subpoblaciones de monocitos circulantes y el desarrollo de enfermedad coronaria (131) y varios tipos de cáncer (130).

Del mismo modo que otras células del sistema inmune, los monocitos se activan por el reconocimiento de agentes extraños a través de los TLRs. En este trabajo se evaluó la respuesta de los monocitos a distintos estímulos inflamatorios utilizando agonistas de TLRs. Si bien, los adultos mayores tienen una mayor expresión *ex vivo* de TLR4, fue en los adultos jóvenes donde se observó una mayor variación en la expresión de este receptor en todas las subpoblaciones de monocitos luego de la estimulación con LPS. Además, se encontró que los monocitos de los adultos jóvenes producen una mayor cantidad de citoquinas como IL-6, TNF $\alpha$  e IL-10 que los adultos mayores. Esto puede deberse a alteraciones en la reprogramación metabólica asociada a la edad, ya que la activación de los monocitos en respuesta a LPS requiere un incremento importante en la producción de ATP (131). Distintos estudios han mostrado que la edad disminuye la capacidad respiratoria mitocondrial de los monocitos e induce cambios en las modificaciones de histonas que afectan su capacidad transcripcional y de respuesta a la estimulación (129, 130). En cuanto a la estimulación con otros agonistas de TLRs no se observó un cambio significativo en la expresión de los receptores evaluados entre los dos grupos de edad, pero sí una disminución significativa en la producción de IL-6 y TNF $\alpha$  en individuos mayores de 60 años, resultados coincidentes con estudios previos en los cuales se evaluó la producción de estas citoquinas después de la estimulación de monocitos de adultos mayores con Pam3CSK4 (34).

Dado el papel clave que tienen las DCs en la inducción de una respuesta inmune específica, desde hace más de 30 años se viene trabajando en estrategias de inmunoterapia basadas en este tipo de células para el tratamiento de distintas patologías, en particular el cáncer (118). Teniendo en cuenta que en estos pacientes el microambiente tumoral afecta la funcionalidad de las DCs naturales, la terapia celular basada en DCs autólogas obtenidas *ex vivo* resulta ser una estrategia prometedora (117). No obstante, la efectividad de este enfoque de inmunoterapia de obtener una respuesta clínica favorable y de regresión tumoral es tan solo del 10 al 15% (132). Esta limitada eficacia se ha asociado a una maduración incompleta de las DCs autólogas (118). En línea con estas observaciones, en este trabajo se evaluó la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD83 en respuesta al estímulo de maduración con un coctel proinflamatorio

de citoquinas estándar (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE2) en DCs inmaduras derivadas de monocitos en los dos grupos de edad. Si bien las DCs derivadas de los adultos jóvenes tienden a expresar un mayor porcentaje de moléculas co-estimuladoras que las células derivadas de los adultos mayores, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se debe tener en cuenta que la óptima maduración de las DCs depende de su capacidad de reprogramación en respuesta al estímulo proinflamatorio. Por ejemplo, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE2 se unen a diferentes receptores, pero sus cascadas de señalización confluyen en la activación del complejo NF- $\kappa$ B Re1A/B. Taveniers y cols 2020, mostraron que la activación de los monocitos dependiente de NF- $\kappa$ B tras la estimulación con LPS o TNF $\alpha$  se encuentra afectada en adultos mayores, lo que podría alterar su capacidad de generar respuestas inmunes efectivas. No obstante, llama la atención que las DCs de los adultos mayores producen una mayor cantidad de TNF $\alpha$  que puede favorecer su actividad proinflamatoria. A pesar de que muchos estudios han evaluado distintos cocteles de citoquinas con el fin de mejorar la calidad de la maduración de las células dendríticas, muy pocos han tenido en cuenta la influencia del envejecimiento en los pacientes de donde se obtienen estas células. Para obtener resultados concluyentes al respecto, es necesario realizar estudios con una muestra más amplia e incluir análisis del perfil transcripcional y ensayos funcionales.

Las NKs son células polifuncionales y entre las muchas tareas que realizan tienen a cargo la eliminación de células senescentes, infectadas por virus, de controlar la inflamación y activar la respuesta inmune adaptativa (120). Cerca del 90% de las NKs circulantes son CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>, células maduras y citotóxicas; el 10% restante CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> son productoras de citoquinas como el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  (120). Recientemente se ha descrito una tercera subpoblación CD56<sup>neg</sup> CD16<sup>+</sup> asociada a la respuesta crónica contra infecciones virales por CMV y HIV (133, 134). Teniendo en cuenta que el 80% de los adultos mayores analizados en nuestro estudio tuvieron serología positiva para CMV+ y que el envejecimiento puede afectar la función y la distribución de las subpoblaciones de NKs (23), se determinó por citometría de flujo la distribución de las distintas subpoblaciones de NKs en dicha muestra poblacional. Se evidenció un aumento significativo del total de NKs circulantes, un incremento de las células CD56<sup>neg</sup>, mayor expresión de CD57 y una disminución significativa de las células CD56<sup>bright</sup> en los adultos mayores. Estos hallazgos coinciden con estudios previos de envejecimiento del sistema inmune donde se observa una disminución de las NKs inmaduras y un incremento de las CD56<sup>dim</sup> con expresión de

CD57 (23, 66, 133, 134). Müller y cols. encontraron que estas células CD56<sup>neg</sup> son menos funcionales en términos de citotoxicidad, capacidad de degranulación y producción de IFN $\gamma$  cuando se compara con las CD56<sup>dim</sup> especialmente en personas CMV<sup>+</sup> (133). Este remodelamiento de las subpoblaciones de NKs, la disminución de células inmaduras y la acumulación de células maduras con expresión de CD57 pueden explicar algunos cambios funcionales observados en individuos de la tercera edad (120). En resumen, en nuestro grupo de adultos mayores se observaron cambios en las principales subpoblaciones de NKs, dados especialmente por una expansión de células CD56<sup>neg</sup> que pueden contribuir a la disfunción inmune durante el envejecimiento.

El equilibrio entre los receptores de activación e inhibición determina el correcto funcionamiento de las NKs (66). En este estudio se evaluó la expresión de los receptores NKG2D, NKp30, CD57 y KLRG1. Se encontró una disminución en la expresión de KLRG1 y NKp30 en las células CD56<sup>dim</sup> de los adultos mayores, pero no se observaron cambios en la expresión de NKG2D en ninguno de los dos grupos evaluados. La expresión de KLRG1 está correlacionada con la disminución en la capacidad proliferativa, en la secreción de IFN $\gamma$  y el incremento de la apoptosis de las células NK (135). Müller y cols. encontraron además, que una mayor expresión de KLRG1 en NKs de adultos mayores incrementa su umbral de activación y atenúa la función efectora (66). Aunque este puede ser un mecanismo de tolerancia periférica, también puede aumentar la susceptibilidad a la infección y al cáncer (66). Es probable que el aumento de KLRG1 en nuestro grupo de individuos jóvenes pueda estar relacionado con su estado CMV<sup>+</sup>. Estudios han encontrado que la infección por CMV puede modular la función de las NKs, afectando la expresión de receptores inhibitorios y de receptores de activación (136). Por otro lado, Hayhoe y cols. encontraron una disminución en la expresión de KLRG1 en los adultos mayores y argumentan que dicho cambio puede ser el resultado de compensación funcional a células más citotóxicas, productoras de citoquinas, cuyo efecto inmunomodulador contrarrestaría la disminución de células productoras de citoquinas CD56<sup>bright</sup> (137).

La literatura no es concluyente en lo que respecta a la expresión de receptores KIR. Se necesitan estudios comparativos que consideren distintos grupos de edad y el estado de infección por CMV para determinar la influencia de KLRG1 en nuestra población. La expresión de NKp30 en los individuos evaluados coincide con lo reportado en la literatura. Si bien con el envejecimiento hay una disminución en la expresión de receptores de citotoxicidad natural que disminuye la citotoxicidad contra blancos clásicos de NKs, la

citotoxicidad dependiente de anticuerpos se encuentra intacta (122). Se realizó un análisis multidimensional automatizado de NKs y se encontró la expansión de dos poblaciones maduras  $CD56^{dim}CD16^+ CD57^+$  y  $CD56^{dim}CD16^+ CD57^-$  las cuales expresan  $NKp30^{low}$  y  $KLRG1$ . La población  $CD57^+$  ha sido descrita como células maduras disfuncionales que expanden durante infecciones virales crónicas como el CMV (120). Por el contrario, la población  $CD57^-$  puede indicar un aumento en la reactividad, siendo células altamente adaptadas para combatir la reactivación del CMV (138). Si bien la infección por CMV es un factor confusional importante en los estudios de correlación inmune y envejecimiento, es necesario realizar más estudios con una muestra de individuos mayor que permita diferenciar el efecto del CMV vs. el del envejecimiento fisiológico sobre el sistema inmune.

Los efectos del envejecimiento son especialmente evidentes en el compartimento de las subpoblaciones de memoria de los LT, asociados a una menor capacidad de respuesta a nuevos antígenos y una disminución en la inducción de memoria a largo plazo (13). La capacidad de generar y mantener LT de memoria antígeno-específicos es esencial para la protección inmune a largo plazo (139). Se han descrito cuatro grandes subpoblaciones de LT (Vírgenes (N), memoria central (CM), memoria efectora (EM) y efectores terminalmente diferenciados (E) de acuerdo con la expresión diferencial de moléculas de superficie como  $CCR7$ ,  $CD45RA/RO$ ,  $CD27$ ,  $CD28$ ,  $CD62L$  y  $CD95$  (72, 73). Con base en la expresión diferencial de  $CD62L$  y  $CD45RO$  en este trabajo se determinó la distribución de las subpoblaciones de memoria en PBMCs de los individuos analizados. Se encontró una disminución significativa en la subpoblación de células vírgenes tanto de los LT  $CD4^+$  como en los  $CD8^+$  en el grupo de los adultos mayores. A pesar de que el número total de LT permanece relativamente constante con el envejecimiento, la disminución de la población virgen es una característica clave de la inmunosenescencia (140). En una revisión sistemática de la literatura sobre marcadores de inmunosenescencia de LT realizada por el grupo de Inmunología y Medicina Traslacional, encontramos 36 artículos que comparaban la distribución de las poblaciones de memoria entre jóvenes y adultos mayores (85). Estos estudios encontraron una disminución significativa de LT vírgenes tanto en  $CD4^+$  (75-81) como en  $CD8$  (75-79, 82-84). La disminución de las poblaciones vírgenes puede explicar parcialmente el incremento de la susceptibilidad de los adultos mayores a enfermedades infecciosas, crónicas inflamatorias y al cáncer (141, 142).

Así mismo, en nuestra muestra poblacional encontramos un incremento significativo de los LT CD8+ efectores terminalmente diferenciados en los adultos mayores. El aumento de LT CD8 efectores ha sido descrito tanto en envejecimiento como en infecciones crónicas como el CMV (86). En la revisión sistemática arriba mencionada, solo una tercera parte de los estudios incluían la serología de CMV como una variable de análisis (80, 87-90). Acorde con estos estudios el presente trabajo evidenció un incremento en las subpoblaciones EM y E en los adultos mayores CMV+ en comparación con el grupo de adultos jóvenes CMV+ (80, 88). Y en tanto que en los individuos CMV- no se observa dicho aumento de los LT E se puede concluir que la infección por CMV promueve un mayor grado de diferenciación con la edad como ha sido descrito por otros (80, 88, 90).

En la literatura se han reportado distintos marcadores para evaluar la inmunosenescencia de LT. Dentro de ellos, dos de los más aceptados son CD57, un marcador de diferenciación terminal cuya expresión se incrementa con la edad en los LT (32), y KLRG1, un receptor de membrana inhibitorio (58). En este trabajo se encontró que la expresión de ambos marcadores se incrementa significativamente con la edad, especialmente en las subpoblaciones EM y E. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura donde la población de LT CD57<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup> se encuentra incrementada en los adultos mayores (57, 59, 82, 87, 91, 94). Mediante un análisis multidimensional con FlowSOM se identificó que los adultos mayores exhiben un mayor porcentaje de LT CD8 terminalmente diferenciados que expresan marcadores de senescencia, soportando de este modo la evidencia que sugiere que estos marcadores reflejan un fenotipo de LT inmunosenescente. Por otro lado, el análisis por CITRUS permitió identificar un clúster de LT vírgenes que sólo se encuentra aumentado en los adultos jóvenes, resultado que apoya la disminución de los LT vírgenes como característica clave de la inmunosenescencia.

Discrepancias entre los sexos contribuyen a las diferencias en la función inmune que determinan el estado de salud-enfermedad y la esperanza de vida (143). Las mujeres, por ejemplo, inducen respuestas inmunes más fuertes que los hombres, lo que se traduce en un aclaramiento más rápido de los patógenos en las infecciones agudas y una mejor respuesta a la vacunación; no obstante, también presentan mayor susceptibilidad a enfermedades inflamatorias y autoinmunes (128). Estas diferencias se han asociado a las hormonas esteroides sexuales y a factores genéticos como la influencia del cromosoma X (126). Aun así, no se ha elucidado completamente si el envejecimiento afecta diferencialmente las células del sistema inmune de mujeres y hombres. Para intentar dar

respuesta a este interrogante, en este trabajo se analizaron los cambios en las subpoblaciones de monocitos, células NKs y LT en la muestra total y por grupos de edad de los voluntarios sanos según su sexo. Se encontró un incremento de la subpoblación de monocitos intermedios en los hombres adultos jóvenes y mayores. Estudios han observado que los hombres tienen un mayor porcentaje de monocitos clásicos que las mujeres y una mayor expresión de genes asociados a vías inflamatorias, sugiriendo una significativa susceptibilidad a enfermedades inflamatorias crónicas como la aterosclerosis y la fragilidad durante el envejecimiento (127, 143).

Respecto a las células NK, no se encontraron diferencias asociadas al sexo en el total de NKs circulantes; pero sí se evidenció que las mujeres exhiben un mayor porcentaje de la subpoblación CD56<sup>bright</sup> y menor frecuencia de CD56<sup>dim</sup> que los hombres. Estos resultados coinciden con lo reportado por Al-Attar y cols (127). Estos investigadores encontraron también, que las células CD56<sup>dim</sup> de las mujeres muestran una capacidad citotóxica mucho más potente que las de los hombres.

En relación con las subpoblaciones de memoria de LT, se encontró una disminución del componente virgen tanto en LT CD4+ como en LT CD8+ en los hombres respecto a las mujeres. Esto puede explicarse porque las mujeres tienen una elevada actividad tímica comparada con los hombres en todos los grupos de edad (143). Se observó además, un mayor porcentaje de LT CD4+ de memoria central en los hombres, lo cual puede sugerir una mayor capacidad de respuestas antígeno-específicas respecto a las mujeres (127). En resumen, a pesar de la disminución de las hormonas sexuales con las edad, las PBMCs de los hombres difieren significativamente de las de las mujeres después de los 65 años (143). Nuestros hallazgos indican que el sexo tiene un rol clave en el envejecimiento diferencial del sistema inmune. Se necesitan más estudios que permitan identificar factores de correlación entre el envejecimiento, el sexo y las enfermedades crónicas.



# Capítulo 2. Respuesta a la vacunación de linfocitos T CD4+ Foliculares Helper (LTfh) en individuos adultos mayores sanos.

## 1.5 Estado del arte

El envejecimiento del sistema inmune se caracteriza por: (i) la disminución de la habilidad para responder a nuevos agentes infecciosos, (ii) alteraciones en la respuesta de linfocitos T y B de memoria, (iii) mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes y (iv) inflamación crónica de bajo grado (6). Estas alteraciones, aumentan la susceptibilidad de adultos mayores a infecciones graves y a la muerte causada por agentes infecciosos (144). Una de las principales consecuencias de la inmunosenescencia es la deficiente respuesta a las vacunas (67). En la actualidad, se recomiendan cuatro vacunas para prevenir infecciones que afectan gravemente la salud de individuos de la tercera edad causadas por varios agentes infecciosos: Influenza, herpes zoster, neumococo, y tétanos y difteria (13). Pese a los programas de inmunización, esta población continúa estando dentro del grupo de alto riesgo para el desarrollo de estas enfermedades. Por lo anterior, resulta importante conocer el impacto que la inmunosenescencia tiene en la respuesta a las vacunas lo cual puede contribuir a descubrir nuevos adyuvantes y vacunas.

La efectividad de la mayoría de las vacunas depende de la inducción de anticuerpos protectores contra antígeno-específicos mediada por LB y células plasmáticas que brinden protección a largo plazo (144). La generación de células productoras de anticuerpos de larga duración es esencial para una eficiente respuesta a las vacunas (145). Para esto, los LB deben someterse a recombinación de cambio de clase, hipermutación somática y diferenciación a células plasmáticas de larga vida. Estos procesos que requieren la cooperación de una subpoblación de LT CD4+ especializado, denominado LTfh (Linfocitos T Foliculares Helper) (144).

### 1.5.1 Linfocitos T Foliculares Helper (LTfh)

Los LTfh son una subpoblación de LT CD4+ que se especializa en brindar ayuda a los LB foliculares dentro de los centros germinales (GC), donde se establece la respuesta de LB de alta afinidad y cambio de clase característica de LB de memoria y células plasmáticas secretoras de anticuerpos (146). La diferenciación de los LTfh se produce en tres fases principales: (i) cebado extra folicular, (ii) maduración folicular; y (iii) desarrollo de GC (144). El proceso de diferenciación comienza con la interacción de un LT CD4+ virgen con una célula dendrítica y un LB a través de un microambiente propicio de señales específicas de receptor-ligando, incluidas las citoquinas y sus receptores (147). En conjunto, estas señales inducen la expresión de factores de transcripción que provocan la diferenciación del LT CD4+ hacia el fenotipo LTfh (144). Las moléculas principales que regulan la formación de LTfh son: CD28, ICOS, CD40L, SAP y STAT3, y citoquinas como IL-6 e IL-21 que activan la expresión de factores de transcripción maestros de la diferenciación TFH como Bcl-6, cMAF, y BATF (148). Los LTfh pueden identificarse a partir de otros LT CD4+ por la expresión de CXCR5, ICOS y PD1; además de la expresión de Bcl-6 y por la producción de IL-21. Por lo tanto, el fenotipo de LTfh se define como LT CD4+ CXCR5<sup>hi</sup>PD1<sup>hi</sup>ICOS<sup>hi</sup>Bcl-6<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> (148).

Los LTfh interactúan con los LB mediante la secreción de factores solubles y el contacto directo célula a célula (147). La IL-21 es la principal citoquina secretada por los LTfh, promueve el cambio de clase de los LB y su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (149). Los LTfh secretan otras citoquinas como IL-9, IL-10, IL-4, IL-17 e IFN- $\gamma$ , que pueden alterar la calidad y magnitud de la respuesta de LB (147). Mientras que la expresión de CD40L, molécula que interactúa con el receptor CD40 en el LB y proporciona señales necesarias para el cambio y la diferenciación de clase (144). La expresión de ICOS y PD1 induce la producción de IL-21, citoquina que juega un rol clave en la activación y/o tolerancia de LT respectivamente, PD1 regula la interacción con el LB a través del bloqueo de la señalización del TCR (150-153).

Los LTfh son una población heterogénea, que consta de diferentes poblaciones fenotípicas y funcionales (Tfh1, Tfh2, Tfh17 y Tfh reguladoras) (154). Estos subconjuntos se distinguen por la expresión diferencial de receptores de superficie como CXCR3, CCR6 y CCR4, que se correlacionan estrechamente con los perfiles de secreción de citoquinas (154). Las subpoblaciones de LTfh varían en su capacidad para proporcionar ayuda a los LB; por

ejemplo, los linfocitos Tfh2 y Tfh17 tienen la capacidad funcional de ayudar a los LB en la producción de anticuerpos mientras que los linfocitos Tfh1 no lo hacen (144, 154). Los LTfh son importantes en la inmunidad a la tuberculosis (155) y al VIH (151); y expanden en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico e influenza (151, 156). No obstante, también están asociados con numerosas inmunopatologías que se caracterizan por respuestas inmunes humorales aberrantes. Estas incluyen inmunodeficiencias primarias y adquiridas, enfermedades autoinmunes y neoplasias malignas de LT (148).

Por su importancia para desarrollar la inmunidad humoral a largo plazo, los LTfh son un área de investigación de gran interés para monitorear la respuesta inmune inducida por las vacunas. Los LTfh pueden salir del GC y convertirse en LTfh de memoria circulantes, que potencialmente reflejan la inducción de respuestas inmunes antígeno-específicas y pueden ser un biomarcador accesible para determinar el éxito de las vacunas (144). Estos LT CXCR5<sup>+</sup> circulantes expresan bajos niveles de ICOS comparados con sus semejantes del CG y carecen de la expresión de Bcl-6 como regulador maestro (156). Este grupo celular constituyen entre el 15 y 25% de los LT de memoria en humanos (151, 157-159). Sin embargo, aunque compartan la expresión de CXCR5, otros marcadores tienen un perfil de expresión bastante distinto. La gran mayoría de LTfh circulantes expresan CD62L y CCR7 (similares a LT de memoria central) (160, 161) lo que probablemente permite su tránsito por órganos linfoides secundarios. Por el contrario, los LTfh del CG regulan a la baja CCR7 cuando migran hacia el folículo linfóide B (162). Varios grupos de investigación han demostrado que las frecuencias de los LTfh circulantes (LTfhc) predicen positivamente las respuestas antígeno-específicas (163, 164). Por lo tanto, el estudio de la frecuencia y el estado de activación de las células LTfhc en sangre periférica pueden ser una opción para evaluar la eficacia de múltiples tipos de vacunas.

### **1.5.2 LTfhc y la respuesta a las vacunas durante la vejez**

Los adultos mayores exhiben una disminución en las respuestas a las vacunas caracterizada por una menor producción de anticuerpos antígeno-específicos (144, 164). Esta reducción puede estar asociada con alteraciones en el compartimento LTfhc (144). De hecho, los estudios han encontrado que los adultos mayores no logran aumentar los LTfhc activados después de la vacunación contra la influenza, mientras que los adultos más jóvenes tienen un aumento significativo en esta subpoblación que se correlaciona

directamente con la producción de anticuerpos específicos contra la influenza (163, 164). La magnitud del cambio en el compartimento LTfhc después de la vacunación puede ser una variable para el seguimiento de la respuesta inmune en los adultos mayores. La falta de expansión de poblaciones de LTfhc después de la vacunación en personas mayores sugiere que el desarrollo de LTfh en el folículo o la activación de LTfh dentro del GC se ve comprometida durante el envejecimiento (144).

Diferentes mecanismos pueden estar contribuyendo a la disminución de la respuesta inmune de LT a la vacunación con la edad (6). La disminución de poblaciones vírgenes, la pérdida de la capacidad proliferativa, la disminución de la función y diversidad de TCR son factores determinantes (58). Infecciones virales crónicas causadas por CMV y el virus de Epstein-Barr (EBV) tienen un impacto significativo en la inmunosenescencia porque favorecen el remodelamiento de las subpoblaciones de memoria aumentando el porcentaje de LT terminalmente diferenciados con capacidad proliferativa reducida y características de senescencia replicativa (85). La subpoblación de LT CD4+ vírgenes es particularmente sensible a los cambios descritos con la inmunosenescencia, lo que puede afectar la diferenciación de LTfh y su funcionalidad durante el envejecimiento (144). Los LT CD4+ activados exhiben una menor expresión de ICOS y CD40L (163). También muestran un sesgo de diferenciación a subpoblaciones inflamatorias en lugar de TFH; estas alteraciones pueden influir en el detrimento de las respuestas a las vacunas durante el envejecimiento (144).

Durante la vejez hay una acumulación LB de memoria, mientras que la subpoblación de LB vírgenes disminuye progresivamente, sesgando el repertorio de LB y limitando el número de clones disponibles para responder a nuevos antígenos (165). Funcionalmente, los LB disminuyen su capacidad proliferativa y de diferenciación en células plasmáticas antígeno-específicas (166). Varios estudios han demostrado que los adultos mayores tienen respuestas de anticuerpos más bajas después de la vacunación en comparación con los adultos más jóvenes (164). Defectos intrínsecos de los LB, como la alteración en la hipermutación somática y el cambio de isotipo, así como el menor número de células plasmáticas explican parcialmente la menor eficacia de la vacunación durante la vejez (13, 165).

En Colombia, los adultos mayores de 60 años son un grupo que padece alta morbilidad por influenza y representan el 90% de las muertes asociadas (12). La vacuna contra la

influenza se ha establecido como la primera línea de defensa frente a las temporadas anuales de gripe y representa una importante herramienta de prevención dentro de las políticas de salud pública a nivel mundial (167, 168). Sin embargo, se estima que la eficiencia de la vacuna es de solo un 9%, probablemente consecuencia de un sistema inmune senescente (169). Dentro de las vacunas recomendadas durante la vejez están las vacunas contra el tétano y la difteria. Sin embargo, al igual como se ha descrito para la influenza, la respuesta inmune a esta vacuna también es subóptima (13, 163). Además de la menor concentración de anticuerpos, la protección es de corta duración y un segundo refuerzo después de 5 años no genera una inmunidad duradera en personas mayores (170). En general, las respuestas inmunitarias a las vacunas recomendadas actualmente no son eficaces en las personas mayores. La mayoría de las vacunas disponibles no logran provocar respuestas inmunes duraderas ni desencadenar inmunidad celular eficiente (13).

Con el fin de evaluar si el envejecimiento modula el fenotipo del componente de LTfh, en estudios previos del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional (I&MT) se comparó la respuesta a la vacuna contra toxoide tetánico (TT) entre un grupo de individuos adultos jóvenes sanos y un grupo de adultos mayores de 65 años. Los resultados mostraron que el día 0 de la vacunación no habían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expansión de LTfh entre los dos grupos de individuos (14). Sin embargo, a los días 11 y 21 (post-vacunación) - dos puntos tiempo en que estudios de vacunación con TT y otros antígenos modelo han evidenciado respectivamente un pico de expansión y otro de contracción de estas células - nuestros resultados evidenciaron que los LTfh de los individuos jóvenes experimentaron un cambio en respuesta a la vacunación con TT tanto en la frecuencia inicial como en su fenotipo. En efecto, los adultos jóvenes mostraron una expansión de los LTfh asociada a la expresión de ICOS el día 11 después de la vacunación la cual ha sido asociada por otros autores a la expresión de CXCR5 e IL-21 mediado por C-Maf en estas células (171). Por el contrario, en adultos mayores no se observó una expansión clara de LTfh en el día 11 y la expresión de ICOS fue más bien sostenida a lo largo del tiempo. Este patrón diferente de expresión de ICOS puede ser un reflejo de una población de LTfh más plástica en la juventud, capaz de diferenciarse en respuesta al antígeno (172) frente a un grupo más diferenciado de células LTfh en individuos mayores de 65 años propio de un sistema inmune senescente.

Para evaluar la respuesta de los LTfh a un segundo encuentro con el antígeno y la expansión de distintas subpoblaciones de células T. Lalinde y cols.(14), realizaron ensayos de estimulación *in vitro* de las PBMC con TT y cuantificaron la frecuencia de cada subpoblación de memoria. Los adultos mayores, no mostraron diferencias en los perfiles de memoria entre el análisis *ex vivo* e *in vitro*, mostrando una vez más un predominio de las poblaciones de memoria (CM y EM) en comparación con la población virgen y E. Por el contrario, los adultos jóvenes mostraron una distribución mucho más dinámica de las diferentes subpoblaciones cuando se les estimulaba con TT. En el día 0 y 21, la población EM exhibió una frecuencia más alta, mientras que en el día 11 hubo una expansión dramática de la población virgen. Si bien la reducción del fenotipo EM en sangre periférica en la respuesta máxima podría explicarse por la migración de estas células a órganos linfoides secundarios debido a la regulación positiva de CXCR5 vinculada a la señalización ICOS (171), su predominio en el día 0 y 21 pueden ser característicos de un sistema inmune activo con células T altamente receptivas en términos de expresión de CD40L, formación sostenida de CG en nódulos linfoides y producción de IL-21 en respuesta a antígenos que ayudan eficazmente a las células B a secretar anticuerpos de alta afinidad.

Uno de los hallazgos más sorprendentes de este trabajo fue el aumento significativo de la población con fenotipo virgen en adultos jóvenes en el día 11 después de la vacunación. Aunque se sabe que la población virgen es altamente proliferativa, al cebarse con el antígeno, estas células se diferencian en poblaciones de células T de memoria y efectoras (CM> EM> E). Recientemente, en pacientes con cáncer, en respuesta a la vacuna contra la fiebre amarilla y en respuesta a otros patógenos se ha descrito una subpoblación de células denominada células T de memoria con fenotipo de célula madre (Tscm) (173, 174). En respuesta inducida por la vacuna contra el virus de la fiebre amarilla. Estas células, que tienen un fenotipo virgen (CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) son capaces de mantener las capacidades proliferativas de las células vírgenes, evitar la diferenciación a través de un proceso de autorrenovación, expandirse de una manera dependiente de IL-15 y expresar marcadores de células madre tales como CD95 y CD58 (175). En consecuencia, nuevos hallazgos demuestran que estas células Tscm responden a IL-21 y llevó al grupo a proponer que una fracción de las células de fenotipo virgen en el compartimento LTfh puede pertenecer a esta población Tscm en términos de su expansión acelerada en individuos jóvenes, pero no en individuos mayores, y también a su alta producción de IL-21 (15). Mientras que, en

los adultos mayores, la gran abundancia de células de memoria y la alta expresión de PD1 en células vírgenes inhibieron la formación de este fenotipo Tscm.

Si bien hay creciente evidencia a favor de que la disfunción de LTfh explica parcialmente la pobre respuesta a la vacunación durante el envejecimiento. Aún no han sido completamente elucidados los cambios celulares y moleculares que le imprimen a estos linfocitos los entornos tisulares envejecidos (144). Entender cómo los adultos mayores reducen sus respuestas inmunes protectoras a la infección y a la vacunación es esencial para diseñar intervenciones efectivas para prevenir la morbi-mortalidad por infecciones en la población adulta mayor. Por consiguiente, en este capítulo se presentan los resultados de la evaluación de la respuesta de LT CD4+ a la vacunación con toxoide de una cohorte de individuos adultos mayores de 65 años.

## 1.6 Materiales y métodos

### 1.6.1 Participantes

Para participar en este estudio los individuos cumplían los siguientes *criterios de inclusión*: tener entre 18 y 30 años para ser clasificado como adulto joven o mayor de 65 años para clasificarse como adulto mayor, residir en la ciudad de Bogotá, no padecer de enfermedades metabólicas, autoinmunes, cardiovasculares o renales y ninguna otra que condicione inmunosupresión. Se excluyeron del estudio aquellos individuos que hubieran recibido la vacuna contra el tétanos en los últimos diez años, que presentaran alguna infección aguda reciente, consumo de antibióticos en las 3 semanas previas a la toma de la muestra, el consumo de medicamentos antiinflamatorios y esteroideos, y aquellos con enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, cáncer, diabetes mellitus en tratamiento farmacológico, cirrosis, alcoholismo y/o tabaquismo. Condiciones para la preparación y toma de la muestra: los participantes firmaron el consentimiento informado y se abstuvieron de realizar actividad física extenuante 24 horas antes de la toma de la muestra. Las muestras de sangre se obtuvieron antes de la vacunación (día0) y al día 11 y 21 post vacunación. Se utilizó la vacuna TETAVAX, fabricante Sanofi Pasteur. Este proyecto de investigación se rige según la resolución No. 008430 de 1993 por la cual se establecen las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud”. Se realizo

de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

### 1.6.2 Separación de PBMCs

Previa asepsia y antisepsia se obtuvo de cada participante una muestra de 20 ml de sangre periférica en tubos heparinizados. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional de la Facultad de Medicina. La obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se realizó mediante separación por gradiente de densidad (*Ficoll®paque*, *Sigma Aldrich*). Las PBMCs obtenidas se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 y se crio-preservaron a una densidad de  $1 \times 10^7$  células/ml en medio de congelación (50% de RPMI-1640 + 40% de suero fetal bovino (SFB) + dimetil sulfoxido al 10% (DMSO)). Se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante las primeras 24 horas y luego se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

### 1.6.3 Evaluación de LTfh

La evaluación de los LTfh se realizó los días 0, 11 y 21 post vacunación. Para ello, se sembraron  $5 \times 10^5$  PBMCS/pozo en platos de 96 pozos fondo en U. Las células se estimularon con  $20\mu\text{g}/\text{mL}$  de Toxoide Tetánico (*Statens Serum Institute*) durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , como control positivo se utilizó la estimulación con  $25\text{ng}/\text{mL}$  de PMA (*Sigma Aldrich*) y  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  de Ionomicina (*Sigma Aldrich*) durante 6 horas, y como control negativo no se usó ningún estímulo. Se adicionó PE anti-CD40L (24-31) en los pozos de TT y PMA+Ionomicina desde el momento de inicio de la estimulación. Finalizado el tiempo de estimulación las células se cosecharon y se lavaron con PBS. Para la marcación se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales extracelulares de Biolegend: Pacific blue<sup>TM</sup> anti-CD3 (HIT3a), Brilliant violet 510<sup>TM</sup> anti-CD4+ (SK3), APC/Cy7 anti-CD45RA (HI100), FITC anti-CCR7 (G043H7), Alexa fluor 647 anti-CD95 (Dx2), Alexa fluor 700 anti-ICOS (C398.4A), PerCP/Cy5.5 anti-PD1 (EH12.2H7), PE/Cy7 anti-CXCR5 (J252D4), Brilliant violet 650 anti-CXCR3 (G025H7), se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Para la marcación intracelular con PE/Dazzle594 anti-Bcl-6 (7D1), se utilizó el kit de fijación y permeabilización de DAKO según las instrucciones del fabricante.

### 1.6.4 Citometría de flujo

Las células fijadas y permeabilizadas se analizaron por citometría de flujo. El equipo utilizado fue el BD ARIA FACS III. Se obtuvieron al menos 100.000 eventos/tubo y el análisis se realizó con el software FlowJo V10 (BD).

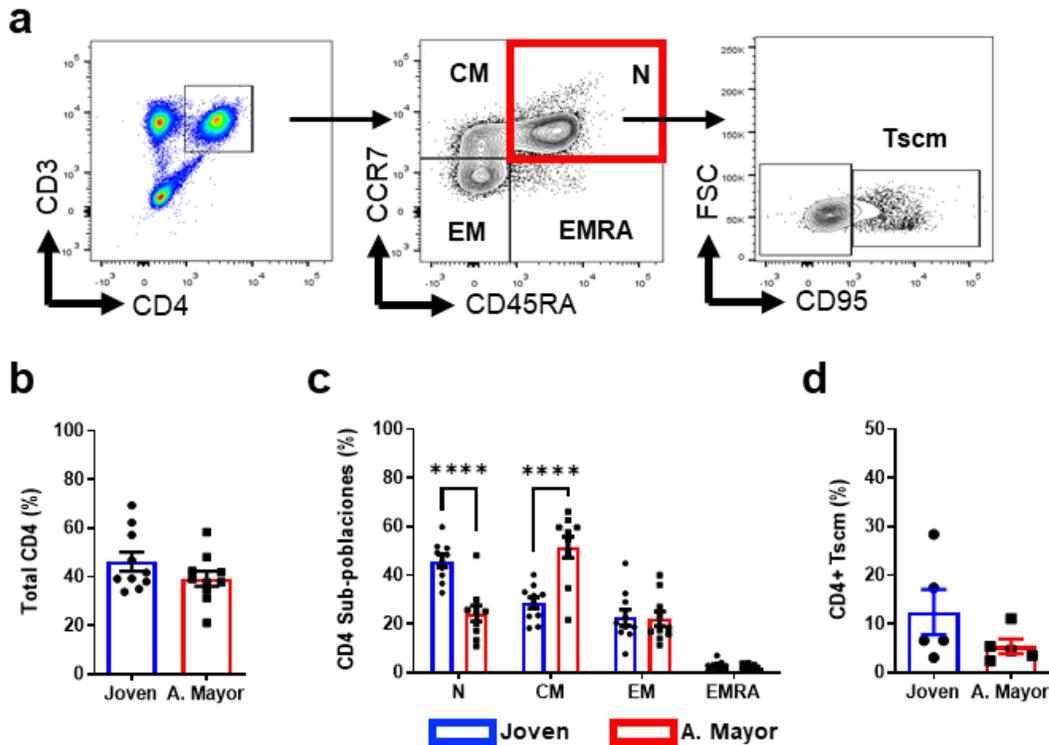
### 1.6.5 Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism (v9.0), para encontrar diferencias entre los grupos se aplicó una prueba de t de Student's (prueba no paramétrica de Mann-Whitney) con valores de "p" < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## 1.7 Resultados

### 1.7.1 Disminución de los LT vírgenes CD4+ en los adultos mayores

Como se mencionó antes, la capacidad de diferenciación de LT CD4+ a LT<sub>fh</sub> depende de la población inicial de LT vírgenes. Para evaluar el componente de LT CD4+ en nuestra muestra, se realizó el análisis *ex vivo* de las subpoblaciones de memoria de LT CD4+ el día cero de la vacunación (Figura 21a). No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje total de CD4+ entre jóvenes y adultos mayores (Figura 21b). No obstante, se observa una disminución significativa de la subpoblación de LT CD4+ virgen y un aumento significativo de las células de memoria central en los adultos mayores respecto a lo encontrado en los jóvenes (Figura 21c). Asimismo, para identificar células T de memoria con fenotipo de célula madre (T<sub>scm</sub>) en la población CD4+ virgen, se midió la expresión de CD95. Aunque no es significativo, se observa una disminución de los linfocitos LT<sub>scm</sub> CD4+ en los adultos mayores respecto al grupo de adultos jóvenes (Figura 21d).



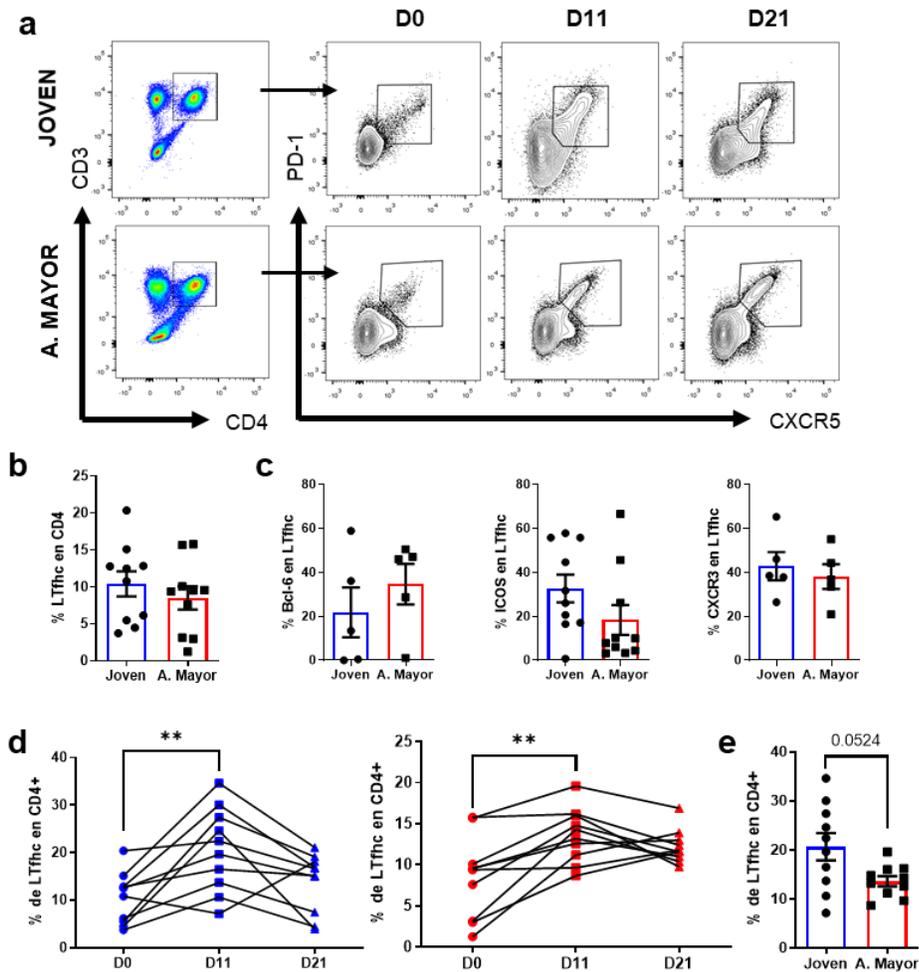
**Figura 21. Estado del componente CD4+ en adultos mayores.**

**a.** Ejemplo representativo del análisis *ex vivo* de LT. Se definió la población de linfocitos con base en sus características de tamaño y complejidad utilizando los parámetros (FSC-A y SSC-A), se delimitó la región de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, seguido del análisis de la expresión de CCR7 y CD45RA para las poblaciones de memoria N (Naïve: CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>), CM (Memoria central CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>), EM (efectoras de memoria: CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup>) y E (Efectoras: CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>). En la población virgen (Naïve: CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>), se seleccionaron los LT CD95<sup>+</sup> como LT<sub>scm</sub>. **b.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> total en cada grupo de estudio. **c.** Gráfica de barras que muestra cada subpoblación de memoria en los dos grupos de estudio Jóvenes (barras azules) y adultos mayores (barras rojas) en LT CD4<sup>+</sup> *ex vivo* y **d.** Porcentaje de LT<sub>scm</sub>. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los jóvenes y los adultos mayores. (\*\*\*\**p*<0.0001, \*\*\**p*<0.001) (n=10/grupo). Los valores representados son la media ± SEM.

### 1.7.2 Expansión de LT<sub>fhc</sub> después de la vacunación con Toxoide tetánico

Diferentes estudios han descrito una menor expansión de LT<sub>fhc</sub> circulantes en los adultos mayores después de la vacunación (163). En línea con estos resultados, al evaluar el componente de LT<sub>fhc</sub> en nuestra muestra definidos por la expresión de CXCR5 y PD1 (Figura 22a), el día 0 de la vacunación no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia basal de LT<sub>fhc</sub>, ni en la expresión de ICOS, CXCR3 y Bcl-6 entre los grupos evaluados (Figura 22b). Sin embargo, con respecto al día 0, los LT<sub>fhc</sub> de ambos grupos evaluados tienen una capacidad de expansión significativa al día 11 post vacunación. Estos resultados también mostraron que las células de los adultos jóvenes tienden a

expandir más que las de los adultos mayores, y que la capacidad de expansión de estas células disminuye en ambos grupos y en todos los individuos evaluados después del día 11 de vacunación (Figura 22c).



**Figura 22. Estado componente LTfhc en respuesta a la vacunación.**

**a.** Ejemplo representativo de la estrategia de análisis ex vivo de LTfhc. Se definió la población de linfocitos con base en sus características de tamaño y complejidad utilizando los parámetros (FSC-A y SSC-A), se delimitó la región de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, seguido del análisis de la expresión de PD1 y CXCR5, la población LTfhc identificada como PD<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> al día cero (D0), once (D11) y veintiuno (D21) de la vacunación con toxoide tetánico (TT). **b.** Gráficas de barras que muestran el porcentaje de LTfhc ex vivo al D0 de la vacunación **c.** Porcentaje de células LTfhc expresando de ICOS, Bcl-6 y CXCR3 respectivamente. **d.** Gráficas de símbolos y líneas que muestran el porcentaje ex vivo de LTfhc al D0, D11 y D21 de la vacunación en el grupo de jóvenes (●), adultos mayores (●). **e.** La gráfica de barras muestra el porcentaje de expansión de LTfhc ex vivo al día 11 de la vacunación en los dos grupos de estudio Jóvenes (barras azules) y adultos mayores (barras rojas) en LT CD4<sup>+</sup> ex vivo. En **b**, **c** y **d**. se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los jóvenes y los adultos mayores. En **c**. se realizó un ANOVA de múltiples comparaciones. Barra de error indica SEM. (\*\*\*\**p*<0.0001, \*\*\**p*<0.001; \*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10/grupo).

### 1.7.3 Los LTfhc de jóvenes tienen una mayor expansión en comparación con los adultos mayores cuando se aplica un segundo estímulo *in vitro*.

Los LTfhc pueden ser utilizados como marcadores para evaluar la respuesta a la vacunación (171). Algunos estudios han mostrado que la disminución en la producción de anticuerpos se asocia con una menor expansión de LTfhc (164). Por esta razón, se evaluó la expansión antígeno-específica de estos LTfhc con un segundo estímulo *in vitro* con toxoide tetánico. Se observa que los adultos jóvenes exhiben una expansión de LTfhc significativamente mayor que los adultos mayores al D11 post vacunación (Figura 23a). De igual forma, se encontró que después del D11 los LTfhc de adultos jóvenes tienen una mayor expresión del factor de transcripción Bcl-6 y del receptor de quimioquinas CXCR3 (Figura 23b). En concordancia con resultados previos reportados por Lalinde y cols. (14). En este nuevo set de experimentos se pudo comprobar que los LTfhc de jóvenes tienen una mayor expresión de CD40L y no hay diferencias significativas en el porcentaje de células positivas por la detección intracelular de IL-21 (Figura 23c).

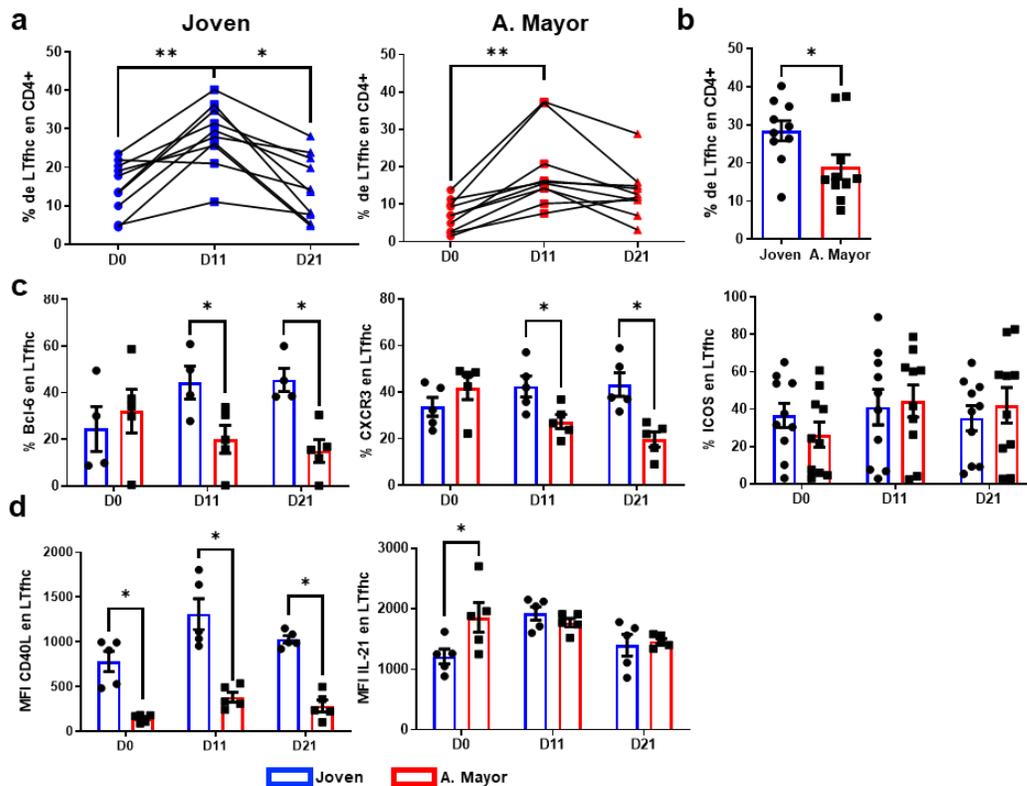
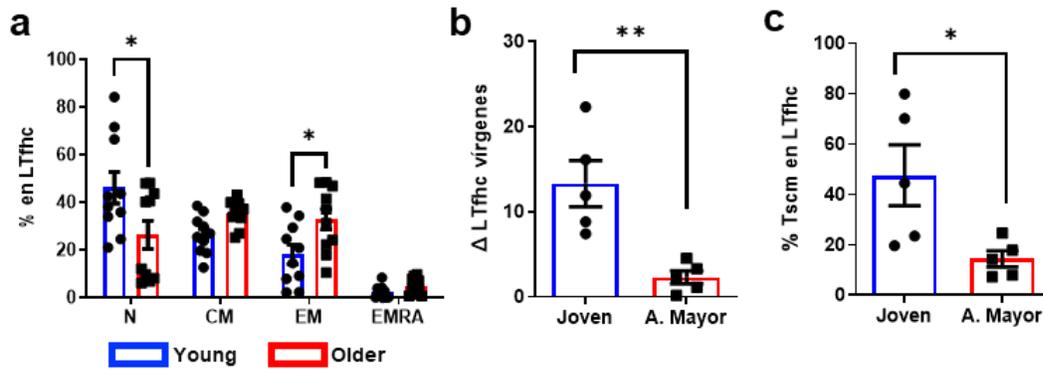


Figura 23. Después de la vacunación con toxoide los LTfhc incrementan la expresión de Bcl-6 y CXCR3 en jóvenes, pero no en adultos mayores.

a. Gráficas de símbolos y líneas que muestran el porcentaje de LTfhc al D0, D11 y D21 de la vacunación en el grupo de jóvenes (●) y adultos mayores (●), después de un segundo estímulo *in-vitro* con toxoide tetánico (TT). b. La gráfica de barras muestra el porcentaje de expansión de LTfhc al día 11 en los dos grupos después del estímulo *in vitro* (n=10/grupo). c. Gráficas de barras que muestran el porcentaje de LTfhc expresando Bcl-6, CXCR3 y ICOS después de un segundo estímulo *in vitro* con TT al día cero (D0), once (D11) y veintiuno (D21) de la vacunación (n=5) d. Gráficas de barras que muestran el MFI de CD40L e IL-21 en LTfhc después de un segundo estímulo *in vitro* con TT al día cero (D0), once (D11) y veintiuno (D21) de la vacunación, Jóvenes (barras negras) y adultos mayores (barras grises) (n=5). Se realizó un ANOVA de múltiples comparaciones. Barra de error indica SEM. (\*\*p<0.01; \*p<0.05).

### 1.7.4 Los LTfhc vírgenes expanden en respuesta a la estimulación con el antígeno en adultos jóvenes, pero no en adultos mayores.

Como se mencionó previamente, la disminución de los LT vírgenes es una de las características de inmunosenescencia (67). El análisis de subpoblaciones celulares de LT CD4+ evidenció en los adultos mayores una disminución significativa de LT CD4+ vírgenes (Figura 21b) y una menor capacidad de expansión de LTfhc en respuesta a la estimulación con el antígeno (Figura 23a). Teniendo en cuenta que la limitada capacidad de expansión podría estar directamente relacionada con el perfil de memoria en los adultos mayores, Lalinde y cols. reportaron previamente en adultos jóvenes un aumento en la frecuencia tanto de LT vírgenes como de CM, y en los adultos mayores no encontraron cambios significativos en la distribución de las subpoblaciones. Esta expansión del fenotipo CM en la juventud puede sugerir que los LT CD4+ vírgenes específicas de TT comienzan a proliferar en respuesta a la vacunación y se diferencian en células CM el día 11 y posteriormente migran a GC o se convierten en células EM, que son el fenotipo más abundante el día 21 (Figura suplementaria 5). Con estos hallazgos anteriores del grupo, se planteó la hipótesis de que hay diferencias en la subpoblación de LTfhc vírgenes que puede estar además compuesta de LT<sub>scm</sub>. En consecuencia, en este estudio se realizó un análisis de las subpoblaciones de memoria del conjunto de LTfhc evaluando el perfil de expresión diferencial de los marcadores CCR7 y CD45RA. De acuerdo con la hipótesis planteada, se evidenció un aumento significativo de la subpoblación de LTfhc vírgenes en los adultos jóvenes en comparación con los adultos mayores (Figura 24a). Y dentro de estas células se detectó una mayor proporción de CD95<sup>+</sup> (T<sub>scm</sub>) que en las vírgenes de los adultos jóvenes (Figura 24b).

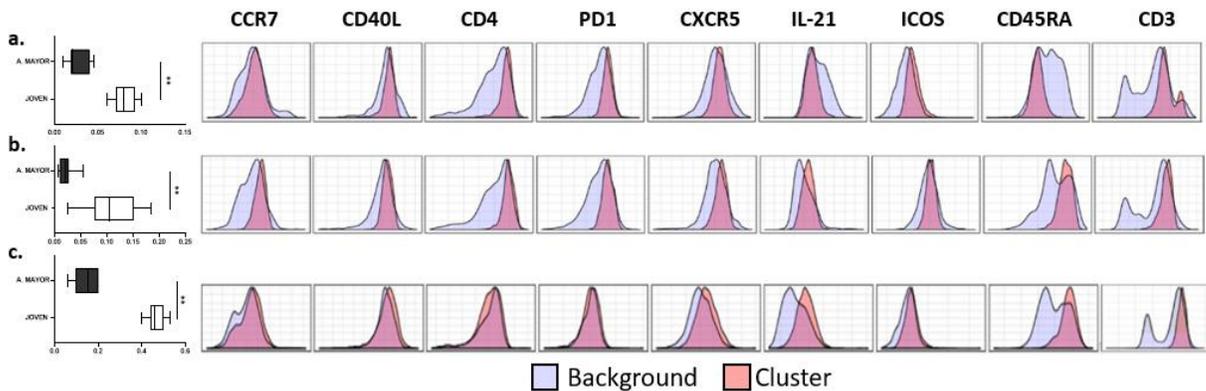


**Figura 24. Expansión de LTfhc vírgenes en jóvenes después de la vacunación.**

**a.** Gráfica de cajas y bigotes que muestra el porcentaje de las subpoblaciones de memoria N (Naïve: CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>), CM (Memoria central CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>), EM (efectoras de memoria: CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup>) y E (Efectoras: CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>), en el compartimento de LTfhc al D11 de la vacunación en el grupo de jóvenes (Azules) y adultos mayores (Rojas), después de la estimulación *in-vitro* con toxoide tetánico (TT). Se realizó una ANOVA de múltiples comparaciones. (\* $p < 0.05$ ). (n=10/grupo). **b.** Gráficas de barras que muestran el delta de cambio en los LTfhc vírgenes entre el D0 y el D11 en jóvenes vs adultos mayores. **c.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de células CD95<sup>+</sup> (T<sub>scm</sub>) en LTfhc vírgenes después de un segundo estímulo *in vitro* con TT D11. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los jóvenes y los adultos mayores. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. (n=5).

### 1.7.5 Análisis automatizado utilizando CITRUS confirmó la expansión de LTfhc vírgenes en jóvenes.

Mediante el análisis automatizado se identificaron tres poblaciones celulares que se encuentran aumentadas selectivamente en los jóvenes más no en los adultos mayores. Mientras que el D0 *ex vivo* se encontró un clúster con un fenotipo CM (Figura 25a), el día 11 *ex vivo* se identificó un clúster con fenotipo virgen (Figura 25b) ambas poblaciones incrementadas en los adultos jóvenes. El tercer clúster en el día 11 estimulado *in vitro* mostró una mayor abundancia de LTfhc vírgenes con altos niveles de expresión de CD40L e IL-21, lo cual sugiere que esta población celular quizás tenga un importante papel en la respuesta inmune a la vacunación con TT. Los modelos de error se muestran en la Figura suplementaria 6.

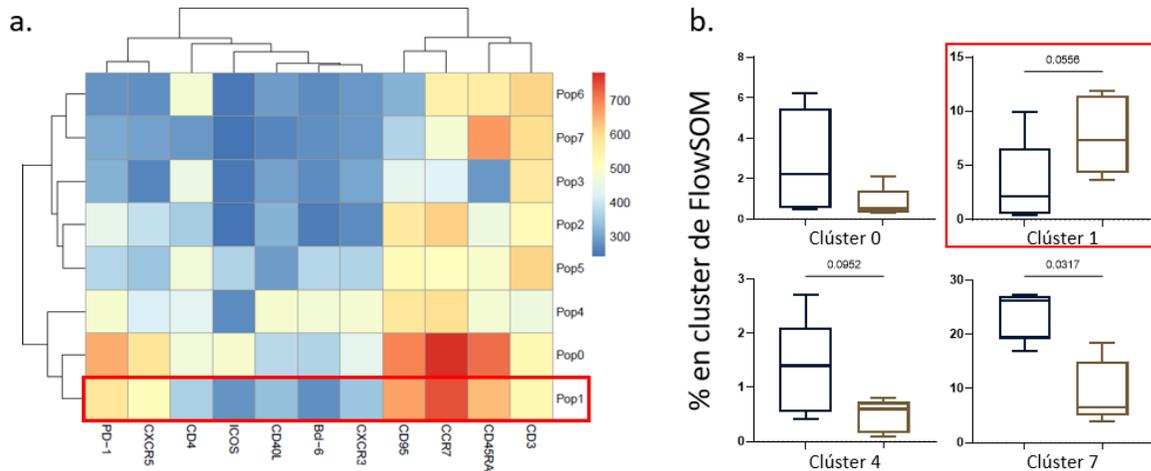


**Figura 25. Fenotipo y abundancia de los clústeres asociados al fenotipo LTfhc en jóvenes y adultos mayores.**

Cada corrida de Citrus se realizó con 10.000 eventos por muestra, el número mínimo de células para considerar un grupo fue de 2.500 células. Los gráficos de caja y bigotes representan la abundancia de un grupo en términos de porcentaje del total de eventos (\*\* $p < 0.01$ ). Los histogramas muestran la expresión de los marcadores celulares considerados en el panel multicolor analizado (CCR7, CD40L, CD4, PD1, CXCR5, IL-21, ICOS, CD45RA, CD3) en la muestra global (histograma azul: fondo, histograma rojo: expresión de grupo). **a.** Clúster D0 antes de la vacunación entre adultos jóvenes y ancianos. **b.** Clúster D11 ex vivo después de la vacunación. **d.** Clúster D11 estimulado in vitro con TT. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los jóvenes y los adultos mayores. Barra de error indica SEM ( $n=5$ ).

### 1.7.6 Análisis multidimensional con FlowSOM identifica una población folicular que está aumentada en los adultos mayores.

Realizamos el análisis de la segunda cohorte con FlowSOM y confirmamos el hallazgo del clúster de LTfhc con fenotipo virgen CD95<sup>+</sup> que está aumentado en los jóvenes, pero no en los adultos mayores (POP0). Un clúster (POP4) con fenotipo LTfhc que expresan CXCR3, ICOS y Bcl-6 y un clúster 7 que no es CD4<sup>+</sup> TFH, que se encuentran aumentados en los jóvenes (Figura 26). No obstante, llama la atención un clúster (POP1) que no habíamos encontrado en el análisis manual, ni por citrus que se encuentra significativamente aumento en los adultos mayores con un fenotipo de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CCR7<sup>++</sup>CD45RA<sup>++</sup>PD1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>.



**Figura 26. Identificación de un clúster LTfhc CD4- que esta aumentado en los adultos mayores.**

**a.** Mapa de calor que muestra el perfil de expresión de cada marcador en los 8 clúster identificados en el archivo concatenado de las 10 muestras. **b.** Gráfica de cajas y bigotes que muestra el porcentaje de LT de cada grupo en los principales clústeres identificados en FlowSOM. Jóvenes (Azul oscuro), adultos mayores (Marrón). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test*. Barra de error indica SEM. (\* $p < 0.05$ ) ( $n = 5$ ).

## 1.8 Discusión

Uno de los efectos que más se asocia a la inmunosenescencia es la pobre respuesta a la vacunación (13). Si bien, la mayoría de los estudios describen que en los individuos inmunosenescentes la producción de anticuerpos en respuesta a las vacunas es mucho menor que en los adultos jóvenes (164); es probable que una variedad de cambios en las células del sistema inmune contribuyan a disminuir la eficacia de las vacunas con la edad.

Particularmente, los LT CD4+ juegan un papel importante en la generación de respuestas inmunes robustas y de alta calidad después de la vacunación (164). La inmunosenescencia que ocurre con el envejecimiento, compromete la habilidad de estos linfocitos de diferenciarse en las distintas subpoblaciones efectoras, lo que genera un retraso en el aclaramiento viral y prolonga la respuesta inflamatoria (mayor severidad de la patología) (176). Nuestro estudio encontró que los adultos mayores analizados tienen un porcentaje de LT CD4+ vírgenes significativamente menor que el de los jóvenes, lo que sugiere un compartimento de LT senescente. Algunos estudios han reportado que los LT CD4+ vírgenes de los adultos mayores no solo disminuyen en número, sino que también presentan una disminución en la activación del TCR y un sesgo de diferenciación hacia fenotipos inflamatorios (144, 177). Estos defectos pueden comprometer las respuestas inmunitarias a infecciones nuevas, como las provocadas por el virus de la influenza H1N1 o el SARS CoV-2 y la respuesta a las vacunas en los adultos mayores. De igual manera

se encontró un aumento en la subpoblación de CM en LT CD4+ comparado con los jóvenes. Durante el envejecimiento la respuesta a las vacunas es dependiente de la memoria inmunológica preexistente, derivada principalmente de las células de memoria central antígeno específicas que pueden ser reclutadas en órganos linfoides secundarios y que bajo las señales específicas se activan y diferencian para cumplir su función efectora (144). No obstante, se ha descrito también que los LT CD4+ de memoria central de los adultos mayores después de la vacunación tienen una mayor expresión de moléculas DUSP4 que se correlaciona negativamente con la expresión de ICOS y CD40L. Cambios que pueden afectar la diferenciación a LT<sub>fhc</sub> y su capacidad de interacción con los LB para promover respuestas humorales (177). Por otra parte, también es conocido que la población de LT CD4+ vírgenes puede ser repoblada por LT de memoria que readquieren el fenotipo naïve (174). Los LT<sub>SCM</sub> se pueden identificar desde el compartimento virgen por la expresión de CD95 (173). Aunque dentro de la población de linfocitos T CD4+ vírgenes de la muestra analizada se encontró una menor frecuencia de LT CD95+ en los adultos mayores que en los jóvenes, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

En la evaluación del componente folicular *ex-vivo* al día cero de la vacunación con TT, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de LT<sub>fhc</sub> entre los jóvenes y los adultos mayores; así como tampoco en la expresión de ICOS, CXCR3 y Bcl-6. Si bien se evidenció una expansión significativa de los LT<sub>fhc</sub> al día 11 después de la vacunación en ambos grupos de estudio, el porcentaje de expansión fue mucho mayor en los adultos jóvenes que en los adultos mayores. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que sugieren que la disminución en la frecuencia de LT<sub>fhc</sub> durante el envejecimiento se asocia a alteraciones de la respuesta GC-TFH con la edad y explican parcialmente la pobre respuesta a la vacunación en los adultos mayores (163, 164).

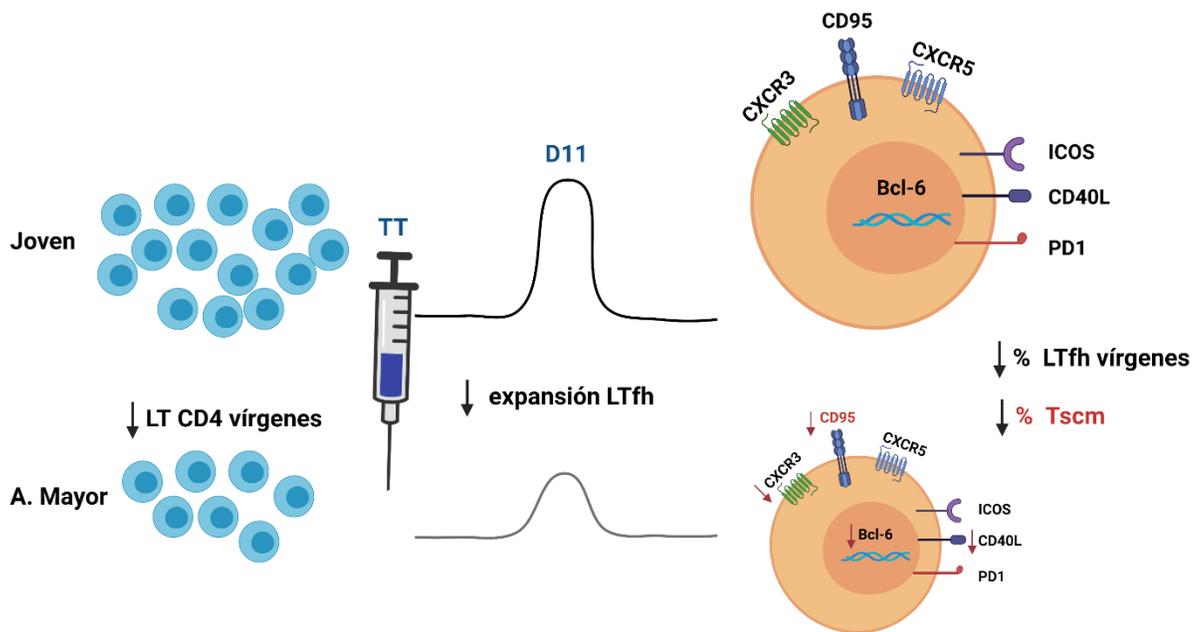
El análisis del componente de LT<sub>fhc</sub> se realizó mediante un segundo estímulo *in-vitro* con TT para evaluar la especificidad de la respuesta. Se encontró que los adultos jóvenes tienen una expansión significativamente mayor de LT<sub>fhc</sub> al día 11 que la de los adultos mayores, con un porcentaje de LT<sub>fhc</sub> mucho mayor. Las células de esta población de LT<sub>fhc</sub> expresan niveles más altos de Bcl-6, CXCR3 y CD40L. Como se describió anteriormente, estas moléculas son importantes en la diferenciación de LT<sub>fh</sub> y su interacción en los CG con los LB (147, 148). Estas diferencias en la cantidad y calidad de la respuesta folicular helper confirma nuestra hipótesis de estudio que plantea que los adultos mayores

presentan defectos en la respuesta celular inmune asociados a la inmunosenescencia, particularmente en el compartimento de LT CD4+. Las alteraciones en la subpoblación virgen de estos linfocitos alteran su capacidad de activación y diferenciación hacia el fenotipo folicular helper y como consecuencia se evidencia un detrimento de la función colaboradora en los centros germinales para la inducción de respuestas humorales eficaces y sostenidas en respuesta a la vacunación.

En el compartimento LT<sub>fhc</sub> se evaluó la diversidad del repertorio de memoria a partir de la expresión diferencial de CCR7 y CD45RA. Se evidenció que los adultos jóvenes tienen un porcentaje de LT<sub>fhc</sub> vírgenes significativamente mayor que los adultos mayores al D11 post vacunación con TT. El análisis posterior por CITRUS identificó que los adultos jóvenes presentan un clúster de LT CD4+ con fenotipo TFH y expresión al alza de CD40 e IL-21. Esta disminución en la expresión CD40L y la producción de IL-21 en los adultos mayores, además de comprometer la creación de centros germinales, también está relacionada con alteración de los procesos de hipermutación somática y cambio de isotipo. Por lo tanto, estos adultos mayores, que tuvieron una menor expresión de CD40L, podrían estar generando anticuerpos de corta vida (IgM) y con una afinidad menor que los adultos jóvenes. Estas diferencias pueden explicar parcialmente por qué la pobre respuesta antígeno-específica de las vacunas en los adultos mayores se debe a una disminución de células vírgenes y a la acumulación de células de memoria del compartimento de LT<sub>fhc</sub> con la edad (144). El adecuado funcionamiento de las subpoblaciones de LT de memoria está relacionado con su capacidad de reprogramación metabólica que depende a su vez de una serie de vías de señalización que regulan concomitantemente procesos como la biogénesis mitocondrial, la traducción de proteínas y las vías de glicosilación, así como, el transporte de proteínas y la autofagia (178). Estos procesos se han encontrado alterados en los adultos mayores y como resultado, se generan respuestas efectoras de baja calidad que, en comparación con las de individuos más jóvenes, son menos potentes y funcionales. mTOR es uno de los reguladores maestros del metabolismo y las vías de señalización que convergen en él han sido asociadas con el envejecimiento. Aunque algunos estudios han mostrado que la inhibición de este regulador maestro es capaz de revertir el proceso de inmunosenescencia en modelos animales, y otras investigaciones en humanos soportan que la regulación de mTOR mejora la respuesta a la vacunación en adultos mayores (179). Son necesarios más estudios que justifiquen la utilidad de

inhibidores de mTOR como agonistas de la vacunación en adultos mayores, así como estudios enfocados en el fenotipo y la función de LTfh durante el envejecimiento.

Finalmente, mediante análisis multidimensional no supervisado con FlowSOM, se identificó una población con un fenotipo de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CCR7<sup>++</sup>CD45RA<sup>++</sup>PD1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>, que no se había encontrado en el análisis manual y que se encuentra significativamente aumentada en los adultos mayores. En un reciente estudio se describió una población de LT CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> productora de IL-21, capaz de regular la respuesta autoinmune de los LB y la producción de autoanticuerpos (180). Estos LTfhc CD8<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> pueden controlar la producción de anticuerpos autorreactivos, pero no son muy potentes ayudando a respuestas antígeno-específicas (180). Sin embargo, estos estudios se han hecho en modelo de ratón y son necesarios más estudios que permitan confirmar la presencia de esta población en los adultos mayores y su influencia en la mayor susceptibilidad de enfermedades autoinmunes.



**Figura 27. Modelo de la respuesta de adultos mayores a la vacuna con Toxoide tetánico.**

Los adultos mayores tienen un menor compartimento de LT CD4<sup>+</sup> vírgenes, en respuesta a la vacunación con TT muestran una menor expansión de LTfh que además expresan a la baja moléculas importantes en la interacción con el LB como CXCR3, CD40L y Bcl-6. Adicionalmente esta expansión de LTfh vírgenes tienen un menor porcentaje de células CD95<sup>+</sup> definidas como stem cell like (Tscm). Creado en Biorender.com

# **Capítulo 3. Deficiencia funcional de Linfocitos T (LT) y células presentadoras de antígeno (APC) en mujeres con cáncer de mama con un fenotipo inmunosenescente y su respuesta a la terapia neoadyuvante.**

## **1.9 Estado del arte**

En el mundo, en 2018 cerca de 2,1 millones de casos de cáncer de mama fueron diagnosticados, lo que representa casi uno de cada cuatro casos de cáncer entre las mujeres (181). En Colombia, el cáncer de mama es el de mayor incidencia y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres (12%) (16). La incidencia incrementa linealmente con la edad después de los 45 años, teniendo las tasas más altas después de los 60 años (182). El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea, la supervivencia está directamente relacionada con el diagnóstico temprano (183). Sin embargo, en Colombia a pesar de las políticas de salud pública de detección temprana, aun se detecta el cáncer en estadios avanzados III y IV (182). Evidencia reciente indica que la obesidad y la inflamación incrementan el riesgo del cáncer de mama (182). El exceso de grasa corporal afecta la reprogramación metabólica de las células inmunes, en consecuencia son células con una inmunovigilancia alterada (184). Así mismo, estudios sugieren un vínculo entre cáncer y envejecimiento, es probable que los eventos genéticos (mutaciones oncogénicas) y epigenéticos (acumulación de células senescentes) sean responsables en parte del aumento exponencial del cáncer que ocurre con el envejecimiento (185). Las células senescentes que se acumulan con el envejecimiento generan el ambiente propicio en el cual las células tumorales pueden proliferar (186). La respuesta inmune en el desarrollo del cáncer es dinámica, la inmunovigilancia del tumor permite en muchas ocasiones la erradicación completa del tumor (187) y se ha observado un mejor pronóstico en los tipos de cáncer que tienen una mayor infiltración por LT

citotóxicos (188). Sin embargo, el sistema inmune también puede facilitar el crecimiento tumoral a través de la inflamación crónica, el favorecimiento de la infiltración por células supresoras (Tregs y MDSC) (189) o a través de la disminución en la capacidad de las células de remover o destruir células tumorales (186).

### 1.9.1 Senescencia celular

Durante el proceso de envejecimiento los tejidos tienden a acumular células que albergan focos de daño al ADN (5). En los últimos años, ha tomado fuerza la hipótesis de que la acumulación de células senescentes puede inducir cambios en las células vecinas que favorecen el desarrollo de enfermedades como el cáncer (190). No es claro aún, qué determina que las células se sometan a senescencia y resistan la apoptosis, es posible que sea resultado de cambios en la expresión de proteínas que inhiben, promueven o activan la apoptosis (191). Se ha identificado que las señales que inducen senescencia, incluyendo las que disparan la respuesta al daño del ADN (DDR), así como muchos otros tipos de estrés, usualmente emplean dos vías de supresores tumorales p53 y p16-pRB (11): (i) *La senescencia dependiente de p53*: estímulos genotóxicos que activan las vías de DDR promueven la senescencia a través de p53, que activado induce la expresión de p21 un inhibidor de CDK que inhibe la fosforilación de pRB, la disminución en la fosforilación de pRB promueve el arresto del crecimiento y la senescencia. P53 es regulado negativamente por HDM2 el cual facilita su degradación y HDM2 es regulado negativamente por ARF. (ii) *La senescencia dependiente de la vía p16-pRB*: estímulos de estrés celular inducen la expresión de p16 otro inhibidor de CDK que previene la fosforilación de pRB y su inactivación. pRB detiene la proliferación celular por supresión de la actividad de E2F, un factor de transcripción que estimula la expresión de genes que son requeridos para la progresión del ciclo celular (11, 191). E2F puede disminuir la proliferación induciendo la expresión de ARF, el cual emplea la vía p53. Por lo tanto, se puede decir que hay una regulación recíproca entre p53 y p16-pRB. Interacciones entre ARF, HDM2, p53, p21, CDKs, pRB y E2F también ocurren en otros contextos celulares. Por ejemplo, durante la DDR y el arresto reversible del crecimiento (191). La senescencia celular por p16 se ha encontrado en características típicas del envejecimiento como la disminución de la neurogénesis, la disminución en la hematopoyesis y la función pancreática, sugiriendo una función pro-envejecimiento de p16 mientras que, su delección en modelos experimentales de ratón, se asocia con muerte prematura por cáncer (192).

De igual manera, se ha visto aumento en el número de células senescentes en los tejidos asociados con enfermedades crónicas relacionadas con la edad como la artritis y la arterioesclerosis; y aunque las células senescentes por sí mismas no desarrollan cáncer, adquieren un fenotipo secretor que favorece la transformación maligna de las células vecinas (193).

La adquisición de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), convierte a los fibroblastos senescentes en células proinflamatorias con la capacidad de promover la progresión tumoral (194). La célula senescente es metabólicamente activa, presenta cambios en la expresión y la secreción de proteínas, que favorecen el desarrollo del SASP. Los factores que componen el SASP se pueden dividir en: factores solubles (interleuquinas, quimiocinas y factores de crecimiento), factores insolubles (componentes de la matriz extracelular (ECM)) y proteasas secretadas (194). Los diferentes factores que componen el SASP tienen diversas actividades biológicas como: optimización de la reparación de tejidos, estimulación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), estimulación de la angiogénesis, estimulación o inhibición de la proliferación celular, inflamación crónica, quimio resistencia y alteraciones de la renovación y/o diferenciación de las células madre. Todas estas funciones son dependientes del contexto fisiológico (195). En consecuencia, se puede plantear que las enfermedades degenerativas e hiperplásicas del envejecimiento comparten la senescencia celular como característica común. Por un lado, disminuye la regeneración y reparación celular y por el otro, promueve la inflamación, la EMT y alteraciones en las células madre.

Las células senescentes experimentan cambios morfológicos y moleculares específicos, se vuelven planas y agrandadas, y acumulan gránulos de estrés y vacuolas. Así mismo, las células senescentes muestran una mayor actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos (196). Las células senescentes en tejidos se han identificado por la expresión de proteínas asociadas a la DDR y el aumento en la actividad lisosomal de la  $\beta$ -galactosidasa con incremento de la masa lisosomal (196, 197). El método más utilizado y marcador confiable para caracterizar las células senescentes consiste en teñir cultivos celulares para visualizar células que expresan la  $\beta$ -galactosidasa. Este método se ha utilizado para demostrar que las células senescentes se acumulan en los tejidos con la edad (195).

### 1.9.2 Inmunovigilancia e inmunoedición del cáncer

Existe evidencia que soporta el papel del sistema inmune en la prevención y control de la formación de los tumores (inmunovigilancia) (198). Pero el sistema inmune tiene una función variable ya que también puede promover el desarrollo de los tumores a partir de un mecanismo de escape inmunológico (199). La doble acción del sistema inmune en los tumores ha dado lugar al concepto moderno de inmunoedición del cáncer que incluye tres fases (las tres E) de eliminación, equilibrio y escape. (i) fase de eliminación (inmunovigilancia), el sistema inmune es capaz de destruir las células tumorales mediante un ataque inmunológico antitumoral eficaz, que inicia con la participación de células innatas (NK, NKT y LT  $\gamma\delta$ ) que reconocen las células malignas, se activan y producen IFN $\gamma$ . La cascada de activación del IFN $\gamma$  induce: la producción de quimioquinas (CXCL10, CXCL9 y CXCL11) que bloquean la neovascularización del tumor; una acción anti-proliferativa sobre el tumor y estimula la actividad citolítica de macrófagos y NKs; estos eventos dan como resultado la muerte de las células tumorales, en ese momento las DCs pueden fagocitar las células cancerígenas y presentar los antígenos tumorales a los LT CD4+ y CD8+ en los nodos linfáticos. El tumor se mantiene bajo control por la actividad citolítica de las NKs y de los LT antígeno-específicos que pueden destruir las células que expresan estos antígenos distintivos del tumor (199). Sin embargo, durante (ii) la fase de equilibrio, de los tumores heterogéneos surgen nuevas células con una mayor cantidad de mutaciones que favorecen una mejor resistencia a la inmunidad. La plasticidad del genoma de las células cancerosas es consecuencia de varios tipos de inestabilidad genética, incluyendo la inestabilidad por reparación de la escisión de nucleótidos, estabilidad de microsatélites e inestabilidad cromosómica; estas células mutantes pueden permanecer ocultas en nichos especializados dentro de los tejidos durante largos períodos (200); aunque el sistema inmune no puede erradicarlos, los mantiene bajo control. Finalmente, (iii) fase de escape, el crecimiento del tumor continúa sin restricciones del sistema inmune, a partir de las células tumorales editadas que sobreviven a la fase de equilibrio y son capaces de eludir las defensas inmunes tanto innatas como adaptativas. Mediante una inestabilidad genómica cada vez mayor, el tumor crece, hace metástasis y se vuelve clínicamente evidente (199, 201). La edición inmune del tumor es específica de cada tejido. Por lo tanto, las metástasis pueden tener procesos de edición diferentes a los sitios de origen porque la presión inmune varía en cada sitio (200). Adicionalmente, la inmunoedición puede estar

directamente influenciada por los defectos inmunológicos descritos durante el envejecimiento.

### 1.9.3 Inmunosenescencia y cáncer

Las tasas de morbilidad y mortalidad de distintos tipos de cáncer aumentan con la edad (202). De ahí la asociación del cáncer con el envejecimiento, a pesar de que la senescencia celular ha sido considerada como un mecanismo supresor tumoral, eventos como la acumulación de células senescentes y la mayor exposición al daño del ADN con la edad favorecen la carcinogénesis (203). El sistema inmune tiene un papel ambiguo en el cáncer, por un lado, está encargado de la inmunovigilancia de las células malignas y por otro, puede favorecer el inicio y la progresión de los tumores (203). La relación entre el envejecimiento del sistema inmune y el desarrollo del cáncer no está completamente elucidada, en especial preguntas como: ¿Por qué las células senescentes se acumulan si normalmente son removidas a través de mecanismos del huésped como el sistema inmune?, ¿cómo el sistema inmune reconoce a las células senescentes? y ¿el mecanismo de reconocimiento cambia con la edad o en enfermedades relacionadas con el envejecimiento? Son preguntas que no han sido completamente esclarecidas (191). Es posible hipotetizar que el envejecimiento del sistema inmune está asociado con la menor remoción de células senescentes, el desarrollo de enfermedades crónicas de la vejez y una mayor susceptibilidad al cáncer. Por otro lado, al parecer las células senescentes a través del SASP pueden evadir el aclaramiento por parte del sistema inmune, influyendo sobre la capacidad de reconocimiento y las vías de señalización que activan o inhiben la función de los macrófagos, NK y LT (204).

Ha sido descrito que el sistema inmune tiene la capacidad de remover las células senescentes. No obstante, los LT con la diferenciación y la edad pierden la capacidad de proliferar y alcanzan la senescencia replicativa, resultado del acortamiento de los telómeros y la inactividad de la telomerasa (27). Con la senescencia replicativa los LT son menos eficientes en la remoción de células senescentes y además pueden adquirir un fenotipo proinflamatorio que contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas e hiperplásicas (26, 27, 190). Se han reportado en la literatura diversos mecanismos por los cuales el microambiente tumoral impacta la función y el fenotipo de los LT, que puede conducir a células con características de anergia, agotamiento y/o senescencia (205). Los LT anérgicos, son células con reducida expresión de moléculas co-estimuladoras y alta

señalización co-inhibitoria, no responden a la activación y producen limitada cantidad de IL-2 (205). Los LT agotados, son células efectoras que han perdido su función y la expresión de citoquinas, debido a la estimulación constante, y expresan varios receptores reguladores (70). Las células T senescentes, son células terminalmente diferenciadas con disminución en la expresión de CD28 y TCR (205, 206).

Los LT senescentes y los LT agotados tienen semejanzas en algunos aspectos funcionales. No obstante, se han encontrado diferentes características fenotípicas. Los LT senescentes expresan los marcadores CD57 y KLRG1, indicadores de senescencia replicativa, son capaces de producir grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias, similar a un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), y son células que con frecuencia se encuentran en las subpoblaciones de memoria terminalmente diferenciadas (EM y E). Por el contrario, los LT agotados, expresan PD1, LAG3, TIM3 y CTLA4, son incapaces de proliferar y no producen citoquinas, estos LT agotados la mayoría se encuentran en las subpoblaciones de memoria (CM y EM) (70).

La supresión tumoral se traduce en una disfunción de los LT cuyo origen es multifactorial. La mayoría de los pacientes con cáncer tienen repertorios de LT con un número bajo de precursores que expresan TCRs con baja avidéz y limitada respuesta antitumoral. La baja avidéz de complejos MHC:TCR y la baja coestimulación afectan la función efectora, la proliferación y la tendencia a la anergia de los LT. El agotamiento celular resultado de la estimulación antigénica crónica y la deficiente coestimulación generan LT con perfiles epigénéticos y transcripcionales alterados (207). Las células T senescentes pueden adoptar un fenotipo proinflamatorio y comparten algunas características de fibroblastos senescentes, pero los estímulos y vías de señalización son diferentes. Actualmente se desconoce si las vías de senescencia celular son comunes a todos los tipos de células inmunes y este es un campo de activa investigación (70).

Se ha propuesto también, que la senescencia replicativa es irreversible, mientras que el agotamiento celular si puede ser susceptible de revertir. Estudios han mejorado la producción de citoquinas en LT después de bloquear PD1(208). Así mismo, se han desarrollado algunas estrategias de inmunoterapia orientadas a restaurar y modular la respuesta inmune contra los tumores utilizando el bloqueo de los puntos de control inmunológico (el desarrollo de anticuerpos monoclonales que bloquean PD1 y CTLA4), ensayos clínicos que han sido exitosos mejorando la tasa de supervivencia a 5 años (209).Por

ejemplo, en un estudio realizado por Lanna y cols. (2014) al inducir la fosforilación de p38 vía AMPK y Tab1, se inhibe la actividad de los telómeros y se genera células senescentes, al bloquear esta vía se restaura la capacidad proliferativa de las células senescentes (50).

La posibilidad de revertir la senescencia es importante en el contexto del envejecimiento, mientras que revertir el agotamiento es importante en el contexto de enfermedad. Los marcadores del agotamiento y la senescencia pueden ser co-expresados en los LT (Tabla 8), es decir que la célula puede ser senescente y agotada a la vez. El proceso no está completamente elucidado, es posible que una célula senescente sea más susceptible de agotarse o viceversa (70).

**Tabla 8. Comparación de las características de los LT agotados y senescentes.**

Categoría	Agotamiento	Senescencia
Causa	Estimulación antigénica crónica	Repetida estimulación, daño al ADN y señales de estrés
Característica	↓ Actividad proliferativa Arresto del ciclo celular: ↑p27, p15; ↓ciclina E-Cdk2, Cdc25A	↓Actividad proliferativa Arresto del ciclo celular: ↑ p16, p21, p53 ↑Moléculas asociadas al daño del ADN ↓Longitud de los telómeros y actividad de la telomerasa ↑ Actividad de la SA-β-gal
Marcador de superficie	↑ PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, BTLA, TIGIT, CD244, CD160, CD39 Y 4-1BB	↓CD27, CD28, ↑ CD57, KLRG1, TIM3, TIGIT, CD45RA
Maquinaria de señalización del TCR	↓ Lck, ZAP70	↓ Lck, ZAP70, DLG1, Lat, SLP-76
Perfil de citoquinas	Estadio temprano: ↓IL-2, Estadio intermedio: ↓TNF Estadio terminal: ↓IFN-γ, quimioquinas-β	SASP Citoquinas proinflamatorias: ↑ IL-6, IL-8, IFN-γ, TNF Citoquinas antiinflamatorias: ↑ IL-10, TGF-β
Perfil transcripcional	↑NFAT, Nr4a, Blimp-1, BATF, FoxP3 Progenitores: T-bet <sup>high</sup> Eomes <sup>low</sup> PD1 <sup>int</sup> Terminales: T-bet <sup>low</sup> Eomes <sup>high</sup> PD1 <sup>high</sup>	↑FoxP3
Cambio epigenético	Programas de metilación del ADN asociados a agotamiento	↑ SAHF
Alteración Metabólica	↓Glicolisis ↓ Biogénesis Mitocondrial ↑ ROS	↑Glicolisis ↓Biogénesis Mitocondrial ↑ROS
Alteración funcional	↓Actividad citotóxica ↓ Moléculas efectoras: ↓ granzima B	↓ Actividad citotóxica ↑ Funciones supresoras Moléculas efectoras: ↓ perforina y granzima B

Tomada de Zhao y cols (2020) (210).

Evidencia reciente sugiere que la inducción de LT senescentes es un mecanismo alternativo de evasión inmune utilizado por los tumores (211). Los LT agotados y senescentes coexisten en el microambiente tumoral (TME) lo que favorece la progresión de las células tumorales (210). Los LT agotados expresan al alta receptores inhibitorios que desregulan su respuesta efectora y favorecen un ambiente supresor, al aumento de estos LT agotados en pacientes con cáncer se ha relacionado con pobre pronóstico en varios tipos de cáncer (212). Así mismo, los LT senescentes se han encontrado en el TME de pacientes con diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, células como los

LTregs derivados de tumor pueden inducir la senescencia de los LT (211). Estos LT senescentes tienen una menor capacidad antitumoral asociada a la baja expresión de moléculas co-estimuladoras (CD27 y CD28), regulación al alza de moléculas inhibitorias como TIM3 y baja producción de moléculas citotóxicas como granzima y perforina (213). Los LT senescentes pueden desregular la función de otras células inmunes mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 y TGF- $\beta$  que induce un ambiente inmunosupresor que colabora en el escape tumoral (203). Un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la generación y regulación funcional de la senescencia y el agotamiento de los LT en el TME debería abrir nuevas vías para la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer (210).

#### **1.9.4 Quimioterapia neoadyuvante e inmunovigilancia**

A pesar de los avances en inmunooncología, la quimioterapia sigue siendo un pilar para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer en diferentes etapas de la enfermedad (214). La quimioterapia neoadyuvante es la principal elección de tratamiento seguro y a menudo eficaz para el manejo del cáncer de mama. Dentro de sus principales ventajas esta la reducción de la etapa de la enfermedad, disminución de la extensión de la cirugía y que permite evaluar la eficacia de la terapia (215). Los regímenes de quimioterapia neoadyuvante se componen tradicionalmente de una antraciclina (doxorrubicina) en combinación o administrada secuencialmente con taxanos (paclitaxel o docetaxel). Los regímenes basados en antraciclinas también suelen incluir ciclofosfamida (215). Ensayos clínicos que evalúan la quimioterapia neoadyuvante en subgrupos sugieren que el grado de tumor y la edad pueden identificar poblaciones de pacientes que tienen un mayor beneficio de la quimioterapia neoadyuvante (216).

Existe evidencia de que la efectividad de la quimioterapia no solo involucra los efectos citotóxicos sobre las células tumorales, sino que también se basa en la activación del sistema inmune (214). La eficacia de fármacos antineoplásicos como las antraciclinas, taxanos y algunos derivados del platino entre otros para lograr remisiones clínicas a largo plazo en pacientes con cáncer, se basa, al menos parcialmente, en el estímulo de estos compuestos a las células inmunes innatas y adaptativas. La activación del sistema inmune por estos fármacos se explica, por un lado, por su capacidad de revertir diferentes mecanismos inmunosupresores que actúan en el infiltrado tumoral como son: alteraciones

en la maduración de las DCs, el aumento de las poblaciones de LTreg y MDSCs, el deterioro en la funciones citotóxicas de NKs y la disfunción de los LT (217, 218), y por otro, la capacidad de inducir una muerte celular inmunogénica, que se caracteriza por la exposición superficial de chaperonas (calreticulina y HSP) y la liberación de HMBG1. La expresión de estas moléculas en la superficie de las células tumorales activa las DCs y favorece la presentación de antígenos tumorales a los LT citotóxicos que pueden destruir estas células cancerígenas (219, 220).

De acuerdo con el proceso de inmunoedición, el crecimiento tumoral es resultado de la falta de vigilancia inmunitaria de las células tumorales (198-200). En un estudio reciente, Bernal y cols. diseñaron un sistema *in vitro* para monitorear en PBMCs de pacientes con cáncer de mama la respuesta antitumoral específica antes y después de la quimioterapia neoadyuvante, reportaron que la respuesta clínica favorable se correlaciona positivamente con la capacidad de respuesta de los LT específicos de tumor inducida por la terapia antitumoral (19).

Para generar evidencia clínica de que los agentes quimioterapéuticos restauran la inmunovigilancia de los compartimentos de LT y APC, Bernal y cols. estudiaron un grupo de pacientes con cáncer de mama que recibieron terapia neoadyuvante con doxorubicina y ciclofosfamida (A/C) con respuesta clínica favorable. Mediante citometría de flujo multicolor, monitorearon varias poblaciones celulares como LTregs, MDSC y LT CD4+ (Th1, Th2 Th17) y correlacionaron los niveles de estas poblaciones celulares y la quimio modulación inducida por agentes antineoplásicos de la función de DCs con la carga tumoral residual (19, 20). Concluyeron que la capacidad de respuesta de los compartimentos de LT y APC después de la terapia y la respuesta tumoral permiten argumentar que la terapia neoadyuvante restablece la comunicación entre los LT y las APC y que esto se correlaciona con la recuperación de la vigilancia inmunitaria tumoral (19, 20).

De acuerdo con este contexto, en el que diferentes fenotipos inmunosupresores en células inmunes asociados con senescencia pueden estar relacionados con la pérdida de la inmunovigilancia y el desarrollo del cáncer; este trabajo evaluó diferentes subpoblaciones de células inmunes de pacientes con cáncer de mama y la capacidad de revertir cualquiera de los fenotipos con el efecto inmunomodulador de la quimioterapia.

## 1.10 Materiales y métodos

### 1.10.1 Tipo de estudio y diseño experimental

Es una investigación biomédica de carácter preclínico con un diseño experimental comparativo (22). En este estudio, mediante muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y contrapartes sanas, se utilizaron PBMCs en ensayos *ex vivo* e *in vitro* en diferentes subpoblaciones de leucocitos con el fin de identificar posibles marcadores de inmunosenescencia en cáncer de mama y su respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.

### 1.10.2 Participantes

Para la selección de la cohorte de pacientes con cáncer de mama, se definieron los siguientes *criterios de inclusión*: Mujeres mayores de edad que no se encuentren en gestación ni en periodo de lactancia, con diagnóstico confirmado de carcinoma primario de mama de tipo ductal infiltrante o lobulillar, con clasificación TNM: IIA, IIB, IIIA o IIIB; a quienes como primera línea de manejo se les formuló quimioterapia neoadyuvante con Doxorubicina y Ciclofosfamida por un mínimo de 3 ciclos (esquema A/C). *Criterios de no inclusión*: Pacientes que hayan recibido algún tipo de terapia como tratamiento a su patología tumoral (radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia o terapia génica); pacientes con sarcomas mamarios, linfomas mamarios, sarcomas metaplásicos y coloides; enfermedad autoinmune activa requiriendo tratamiento o historia de enfermedad autoinmune, que podría ser exacerbada por el tratamiento; evidencia de una infección viral crónica o aguda; uso de inmunosupresores dentro de las 4 semanas anteriores al ensayo; pacientes esplenectomizadas y pacientes que no reciban el esquema de quimioterapia neoadyuvante con Doxorubicina y Ciclofosfamida por tres ciclos. Fueron invitadas a participar en el estudio 31 pacientes de la consulta de oncología del Instituto Nacional de Cancerología (INC), de las cuales 14 aceptaron participar con la firma del consentimiento informado, pero únicamente se logró obtener muestras antes y después del esquema con quimioterapia A/C a 10 de ellas. Los datos clínicos de las pacientes incluidas se muestran en la Tabla 9.

Este proyecto de investigación se rige según la resolución No. 008430 de 1993 por la cual se establecen las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en

Salud". Se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética del INC y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Todas las participantes firmaron el consentimiento informado.

**Tabla 9. Características clínicas de las pacientes.**

Característica clínica	Media/porcentaje
Edad	60,9 (42-84 años)
Estado tumoral	
I	0
II	4 (40%)
III	6 (60%)
Expresión de receptores	
ER o ER/PR positivo	8 (80%)
HER2 Positivo	4 (40%)
Triple-negativo	1 (1%)
Quimioterapia Neoadyuvante con A/C	10 (100%)
Expresión de Ki-67	8 (80%)

### 1.10.3 Separación de PBMCs

Se tomaron muestras de sangre periférica de aproximadamente 50ml/toma en tubos heparinizados previa asepsia y antisepsia. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Inmunología y Medicina traslacional de la Facultad de Medicina. La separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se realizó mediante separación por gradiente de densidad (*Lymphoprep*) por 40 minutos a 700g, el número de PBMCs obtenidas de la interfaz por muestra fue muy variable entre las pacientes. Posteriormente, las PBMCs se centrifugaron y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 (Gibco). Las células obtenidas se dispensaron en crio-viales a una densidad de  $1 \times 10^7$  células/ml en medio de congelación (50% de RPMI-1640 + 40% de suero fetal bovino (SFB) + dimetil sulfóxido al 10% (DMSO)) fueron crio-preservadas primero por 24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y luego en vapores de nitrógeno líquido.

### 1.10.4 Evaluación ex vivo de subpoblaciones

Aproximadamente, dos viales de las PBMCs de cada participante del estudio en los dos tiempos (antes y después de la quimioterapia) fueron descongelados y lavados en medio AIM-V (*Gibco, ThermoFisher*), para ser utilizados en todos los experimentos. Las subpoblaciones de monocitos y natural killer se evaluaron *ex vivo* así.  $1 \times 10^6$  células en

50 ul de PBS se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales marca biolegend: Monocitos con FITC anti-CD14 (M5E2), PE/Cy5 anti-CD16 (3G8), PE/Dazzle594 anti-HLA-DR (L243) y APC anti-PD-L1 (29E.2A3). Natural killer: Pacific blue™ anti-CD3, FITC anti-CD56 (5.1H11), APC anti-CD57 (HNK-1), APC/Fire750 anti-KLRG1(SA231A2), PECy7 anti-NKp30 (P30-15), PE anti-NKG2D (1D11). Se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad. Posteriormente se lavaron con 1ml de PBS y se resuspendieron en 50 ul de FACS Flow, al menos 50.000 eventos fueron leídos por muestra en el citómetro de flujo FACS Aria III.

### **1.10.5 Generación *in situ* de DCs maduras a partir de monocitos**

Se sembraron  $1 \times 10^6$ /pozo de PBMCs en placas de 96 pozos fondo plano, en medio AIM-V suplementadas con 750U/mL de IL.4 y 1000U/mL del factor estimulante de colonia granulocito macrófago (GM-CSF) (Cellgenix) a 37°C con atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas y un segundo estímulo con IL-4 + GM-CSF por 48 horas más. Posteriormente, para su maduración se estimularon con el coctel de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  10ng, TNF $\alpha$  1000 UI, IL6 1000 UI y PGE2 1 $\mu$ g), durante 48 horas. Para evaluar el grado de diferenciación de monocitos a DCs maduras, las PBMCs fueron cosechadas y marcadas con los siguientes anticuerpos monoclonales fluoro marcados: FITC anti-CD14 (M5E2), PE/Cy5 anti-CD16 (3G8), PECy7 anti-CD83, PE/Dazzle594 HLA-DR, PE anti-CD80 y APC anti-CD40.

### **1.10.6 Expresión de marcadores de agotamiento/senescencia en LT e internalización del CD3.**

Se sembraron  $1 \times 10^6$ /pozo de PBMCs en platos de 96 pozos fondo plano por 72 horas con una mezcla de perlas acopladas a anticuerpos contra CD3, CD28 y CD2 (Miltenyi Biotec) en una proporción 2:1 (PBMCs:perlas) cultivadas en medio AIM-V (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación las células se lavaron con PBS y se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales de biolegend: Pacific blue™ anti-CD3, Brilliant violet 510™ anti-CD4+ (SK3), PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), FITC anti-CD45RO (UCHL1), PerCP/Cy5.5 anti-PD1 (EH12.2H7), PE/Cy7 anti-CTLA4 (L3D10), PE anti-TIM3 (F38-2E2), y APC/Fire™750 anti-KLRG1(SA231A2). BD bioscience: BV711 anti-CD62L (DREG-56),

APC anti-CD57 (NK-1) y BV786 anti-LAG3 (T47-530). Se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad y luego del lavado, al menos 200.000 eventos fueron leídos por muestra.

### **1.10.7 Fosforilación de ZAP70 y expresión de Ki-67 en LT CD8**

Se sembraron  $1 \times 10^6$ /pozo de PBMCs en platos de 96 pozos fondo plano por cuatro días con una mezcla de perlas acopladas a anticuerpos contra CD3, CD28 y CD2 (Miltenyi Biotec) en una proporción 2:1 (PBMCs:perlas) cultivadas en medio AIM-V (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación las células se lavaron con PBS y se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales extracelulares de biolegend: PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), FITC anti-CD45RO (UCHL1), Alexafluor700 anti-CD62L (DREG-5b). La marcación intracelular se realizó siguiendo las instrucciones del Kit *intrastain* de DAKO para PE anti-Ki-67 (11F6) y Alexafluor647 anti-pZAP70 (1503310). Se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad, al menos 100.000 eventos fueron leídos por muestra.

### **1.10.8 Citoquinas intracelulares en LT CD8**

Se sembraron  $1 \times 10^6$ /pozo de PBMCs en platos de 96 pozos fondo plano por 24 horas con una mezcla de perlas acopladas a anticuerpos contra CD3, CD28 y CD2 (Miltenyi Biotec) en una proporción 2:1 (PBMCs:perlas) cultivadas en medio AIM-V (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación las células se lavaron con PBS y se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales extracelulares de biolegend: PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), APC anti-CD28, APC/Cy7 anti-CD27. Posteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron según el protocolo del kit *intrastain* de DAKO. Durante la permeabilización se marcaron los anticuerpos intracelulares: FITC anti-IL-2, BV605 anti-TNF y PE anti-IFN $\gamma$ . Se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad, al menos 150.000 eventos fueron leídos por muestra.

### **1.10.9 Expresión de p21, p16 y $\beta$ -galactosidasa en LT**

Las PBMCs de pacientes con cáncer de mama se cultivaron durante cuatro días con AIMV en platos de 96 pozos a una densidad promedio de  $1 \times 10^6$  células viables en 200  $\mu$ l, sin ninguna estimulación. Después de la incubación las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en tubos de citometría en 100  $\mu$ l de PBS con 1% de SFB. Las células se marcaron con los siguientes anticuerpos monoclonales extracelulares de Biolegend:

Brillant violet 510™ anti-CD4+ (SK3), PE/Dazzle594 anti-CD8 (SK1), APC anti-CD45RA y APC/Cy7 anti-CD27. Se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron durante 10 minutos con buffer de fijación (solución A, *Kit intrastain* de DAKO). Para la medición de la actividad de la  $\beta$ -gal, las células se lavaron con PBS con 1% de SFB y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución de trabajo (*Senescence green Flow cytometry assay kit*, ThermoFisher), se incubaron durante 2 horas a 37°C, sin CO<sub>2</sub>, protegidas de la luz. Después de la incubación se lavaron las células y se realizó la permeabilización celular (solución B, *Kit intrastain* de DAKO) y la marcación celular con PE anti-p16 (Biolegend) y Alexa405 anti-p21 (Santacruz). Se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad, al menos 200.000 eventos fueron leídos por muestra.

### 1.10.10 Citometría de flujo

Después de la marcación las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en líquido FACS, se leyeron en ARIA FACS III. En el programa FACS Diva posteriormente los datos fueron analizados en FlowJo V10 (BD).

### 1.10.11 Análisis estadístico

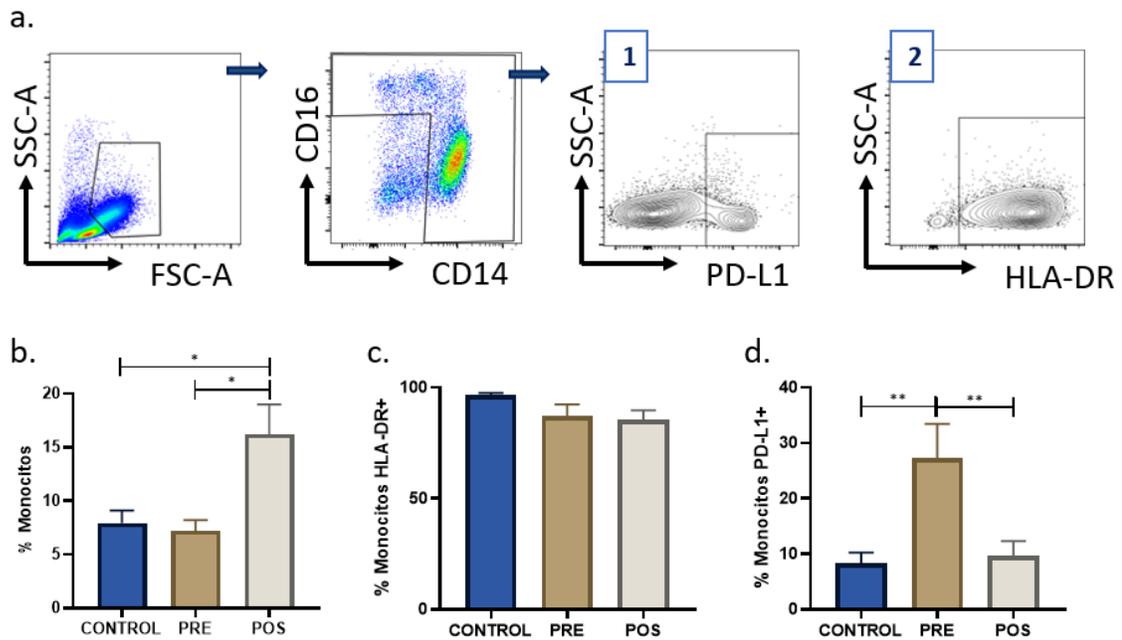
El análisis de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism (v9.0). Para determinar las diferencias entre los grupos se realizaron las pruebas estadísticas, *t* de Student's para comparación de 2 grupos (prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*) y análisis de subgrupos de acuerdo con los marcadores de expresión y las diferentes subpoblaciones a través de una ANOVA de dos vías (prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis*) para comparaciones múltiples.

## 1.11 Resultados

### 1.11.1 Poblaciones celulares de monocitos después de la quimioterapia neoadyuvante con esquema A/C.

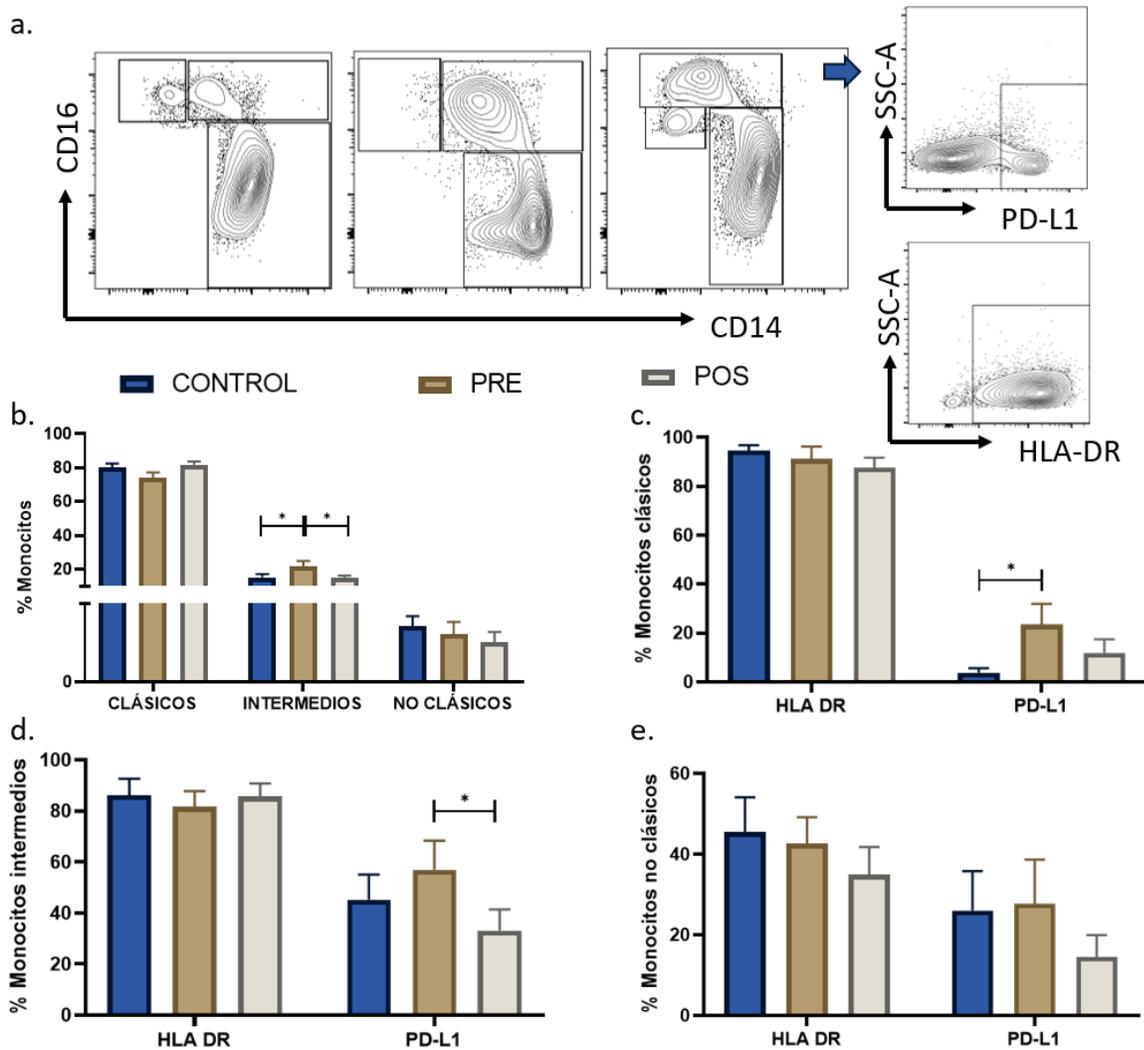
Los monocitos son células esenciales en la respuesta inmune por su capacidad fagocítica, presentación antigénica y producción de citoquinas, se clasifican en tres subpoblaciones según la expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16 (monocitos clásicos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, y no clásicos CD14<sup>Low/+</sup>CD16<sup>+</sup>) (221, 222) (Figura

28a). Las poblaciones de monocitos pueden cambiar en diferentes condiciones de salud y enfermedad, incluido el cáncer. Adicionalmente, se ha descrito que los monocitos de pacientes con cáncer pueden mostrar un fenotipo inmunosupresor caracterizado por: (i) Disminución en la expresión de la molécula HLA de clase II (HLA-DR) que es esencial para la presentación de péptidos a los linfocitos  $T_{\text{helper}}$  necesaria para desencadenar la respuesta inmune de estos linfocitos (223); y (ii) Aumento en la expresión de la proteína PD-L1 ligando del receptor PD1, que se asocia con la carga tumoral y el pronóstico de respuesta a la terapia (224, 225). En este contexto, se evaluó en la muestra de pacientes con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia la población de monocitos y se comparó este resultado con el de un grupo control de mujeres sanas de la misma edad. Las pacientes con cáncer de mama mostraron un aumento de la frecuencia total de monocitos después de la quimioterapia con A/C (Figura 28b). No se encontraron diferencias significativas entre el grado de expresión de HLA-DR en los monocitos totales (Figura 28c) ni en subpoblaciones de monocitos, al comparar entre las mujeres sanas y las pacientes antes y después de la quimioterapia (Figura 29c-e). Adicionalmente, el análisis de las subpoblaciones de monocitos evidenció por una parte, un aumento significativo de los monocitos intermedios en pacientes pre-quimioterapia comparadas con las controles y las pacientes posquimioterapia (Figura 29b); y por la otra, una expresión significativamente mayor de PD-L1 tanto en monocitos totales (Figura 28d) como en monocitos clásicos e intermedios solo en las muestras de las pacientes antes de la quimioterapia (Figura 29c-d),.



**Figura 28. Frecuencia de monocitos totales y expresión de HLA-DR y PD-L1 en mujeres con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia.**

**a.** Estrategia de análisis y determinación de subpoblaciones de monocitos definidas mediante la expresión de CD14/CD16, y grado de expresión de PD-L1 (1) y HLA-DR (2) en monocitos totales. **b.** Porcentaje de monocitos totales comparando entre grupos (controles: azul, pacientes pre-quimioterapia: Marrón y pacientes pos-quimioterapia: crema) **c.** Porcentaje de expresión de HLA-DR y **d.** PD-L1 en monocitos totales. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar controles y pacientes. Y una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.001; \*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10).



**Figura 29. Frecuencia de las subpoblaciones de monocitos y porcentaje de monocitos expresando HLA-DR y PD-L1 en mujeres con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia.**

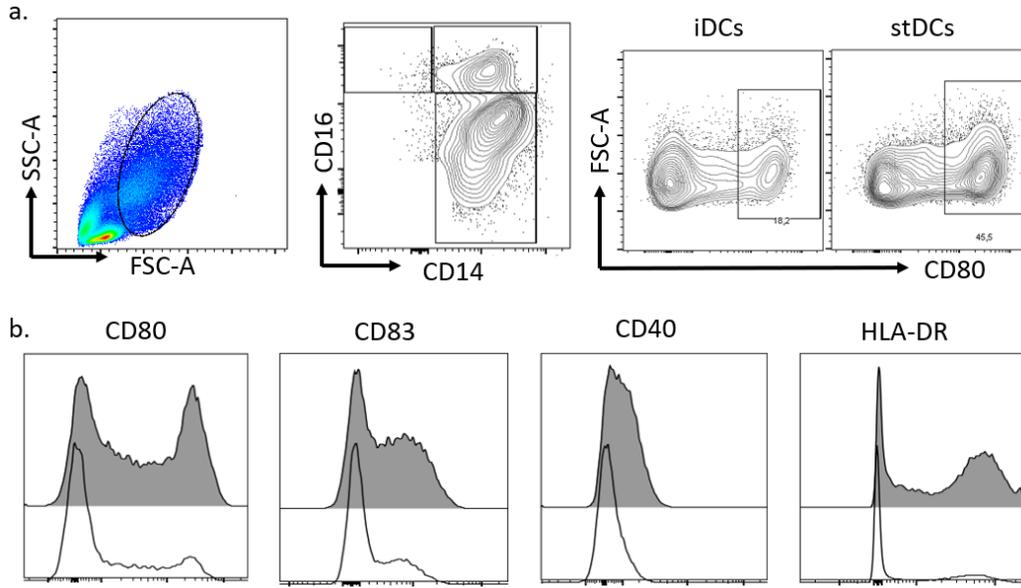
**a.** Estrategia de análisis para identificar las subpoblaciones de monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>Low/+</sup>CD16<sup>+</sup>) y expresión de PD-L1 y HLA-DR. **b.** Porcentaje de subpoblaciones de monocitos en controles, pre y posquimioterapia. **c.** Porcentaje de expresión de HLA-DR y PD-L1 en monocitos clásicos. **d.** Monocitos intermedios y **e.** no clásicos. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los grupos. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.001; \*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10).

En síntesis, luego de evaluar *ex vivo* en los tres grupos de muestras analizadas (mujeres controles sanas con las pacientes antes y después del tratamiento con A/C): (i) la distribución de las subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, y (ii) la expresión HLA-DR y PD-L1 tanto en monocitos totales como en las diferentes subpoblaciones de monocitos, nuestros resultados muestran que las pacientes con cáncer antes de la quimioterapia tienen un aumento significativo de monocitos intermedios y un aumento en la expresión de PD-L1 en monocitos totales, en monocitos clásicos e

intermedios comparadas con sus contrapartes sanas y que de manera notable estas diferencias tienden a desaparecer luego de la quimioterapia.

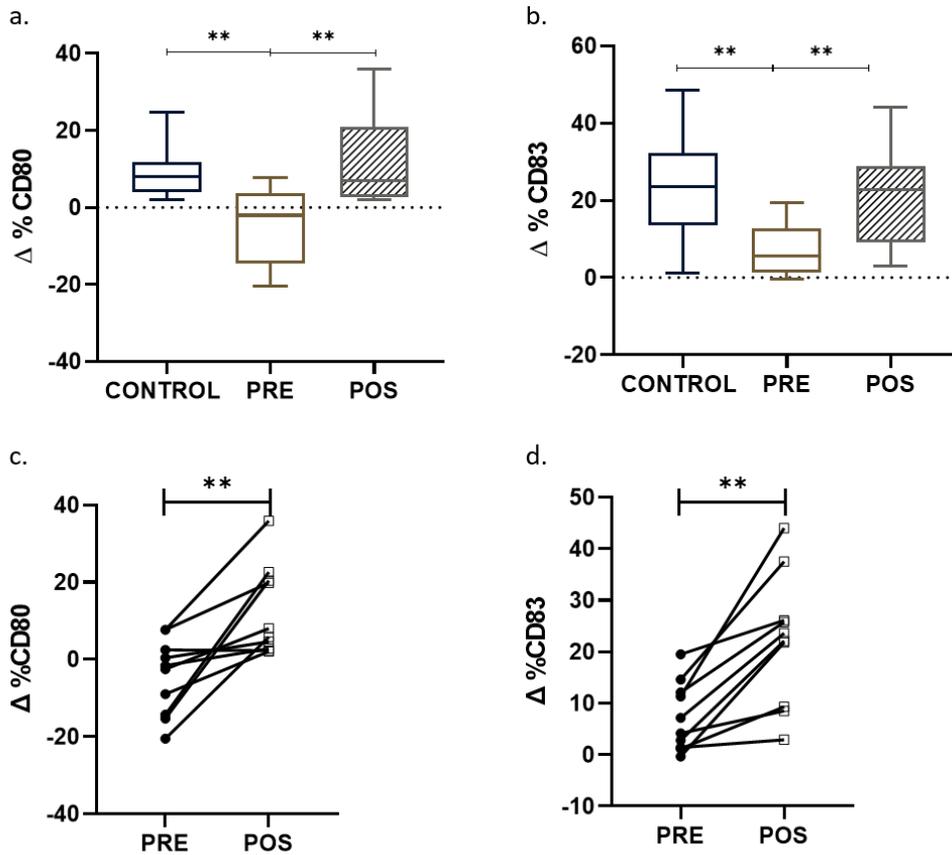
### **1.11.2 Maduración de células dendríticas derivadas de monocitos.**

Investigaciones previas del grupo de I&MT han permitido demostrar una deficiente capacidad de respuesta a un estímulo proinflamatorio de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos de mujeres con cáncer mama antes de la quimioterapia con A/C, la cual se reestablece después del tratamiento neoadyuvante (20). Con base en estos hallazgos, en este trabajo se derivaron y maduraron células dendríticas *in situ* a partir de monocitos presentes en PBMCs de las voluntarias sanas y de las pacientes antes y después de la quimioterapia cultivados en GM-CSF e IL-4 y tratados con un coctel de citoquinas proinflamatorias con el fin de cotejar, si la disminución en la capacidad de maduración observada antes de la quimioterapia está relacionada con el aumento de monocitos intermedios y la mayor expresión del PD-L1 encontrado en las pacientes pre-quimioterapia y de comparar el grado de respuesta al estímulo pro-inflamatorio antes y luego de la quimioterapia. Utilizando los mismos marcadores CD14 y CD16 para identificar las poblaciones de monocitos, se encontró que después de la maduración la distribución de células cambia y la mayor frecuencia de DCs son CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> y disminuye considerablemente el porcentaje de células que expresan CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>low/+</sup>CD16<sup>+</sup> (Figura 30a). En línea con los hallazgos previos del grupo, hay una menor capacidad de maduración de los monocitos de pacientes antes de la quimioterapia (Figura 31a). Estas DCs derivadas de monocitos exhiben una menor expresión de marcadores de maduración como CD80 y CD83. Sin embargo, después de la quimioterapia los monocitos recuperan parcialmente la capacidad de maduración a niveles similares a los encontrados en las muestras de las mujeres control sanas (Figura 31b).



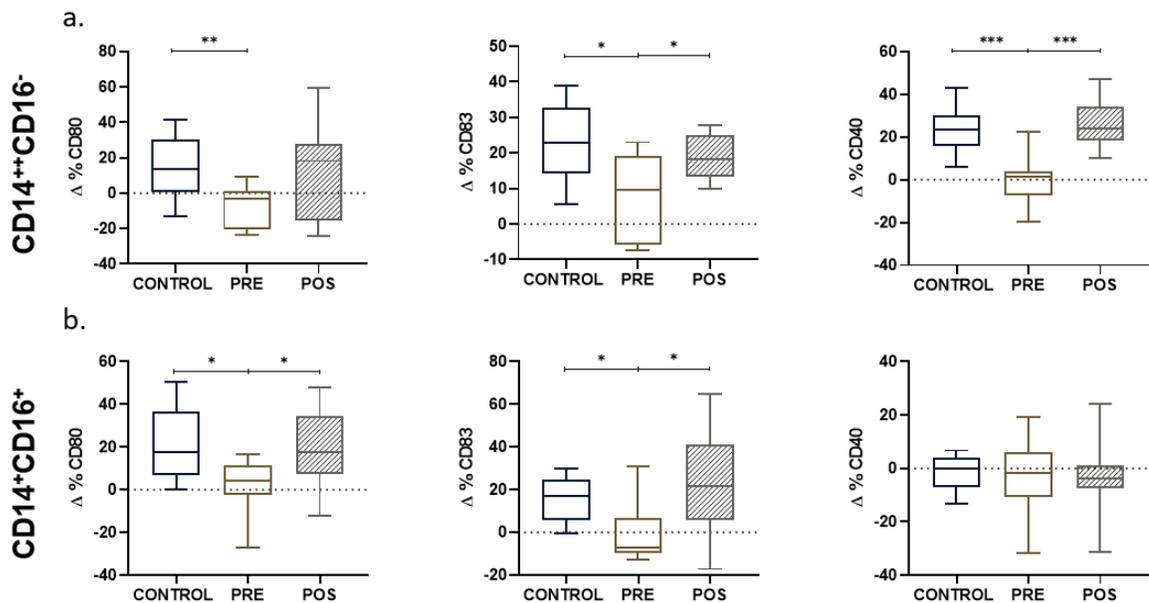
**Figura 30. Estrategia de análisis para la evaluación de la maduración de células dendríticas estándar derivadas de monocitos.**

**a.** Estrategia de análisis para identificar DCs derivadas de monocitos y la expresión de marcadores de maduración después de la maduración *in vitro* con el coctel estándar (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2). **b.** Representación de una voluntaria mostrando el cambio en la expresión después de inducir la maduración con el coctel de citoquinas para DCs estándar, DCs inmaduras (histograma vacío), DCs estándar (histograma gris).



**Figura 31. Las DCs derivadas de monocitos de las pacientes con cáncer de mama antes de la quimioterapia exhiben una limitada capacidad de maduración en respuesta a la estimulación *in vitro*.** El delta ( $\Delta\%$ ) del porcentaje de expresión de CD80 (a) y CD83 (b), corresponde a la diferencia de porcentaje de células positivas para cada marcador en DCs maduras menos el porcentaje de expresión en las DCs inmaduras. Análisis pareado de la respuesta a la maduración *in vitro* de las pacientes antes y después de la quimioterapia de CD80 (c) y (d). CD83. En a y b. se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los grupos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. En c y d. se realizó una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) (n=10).

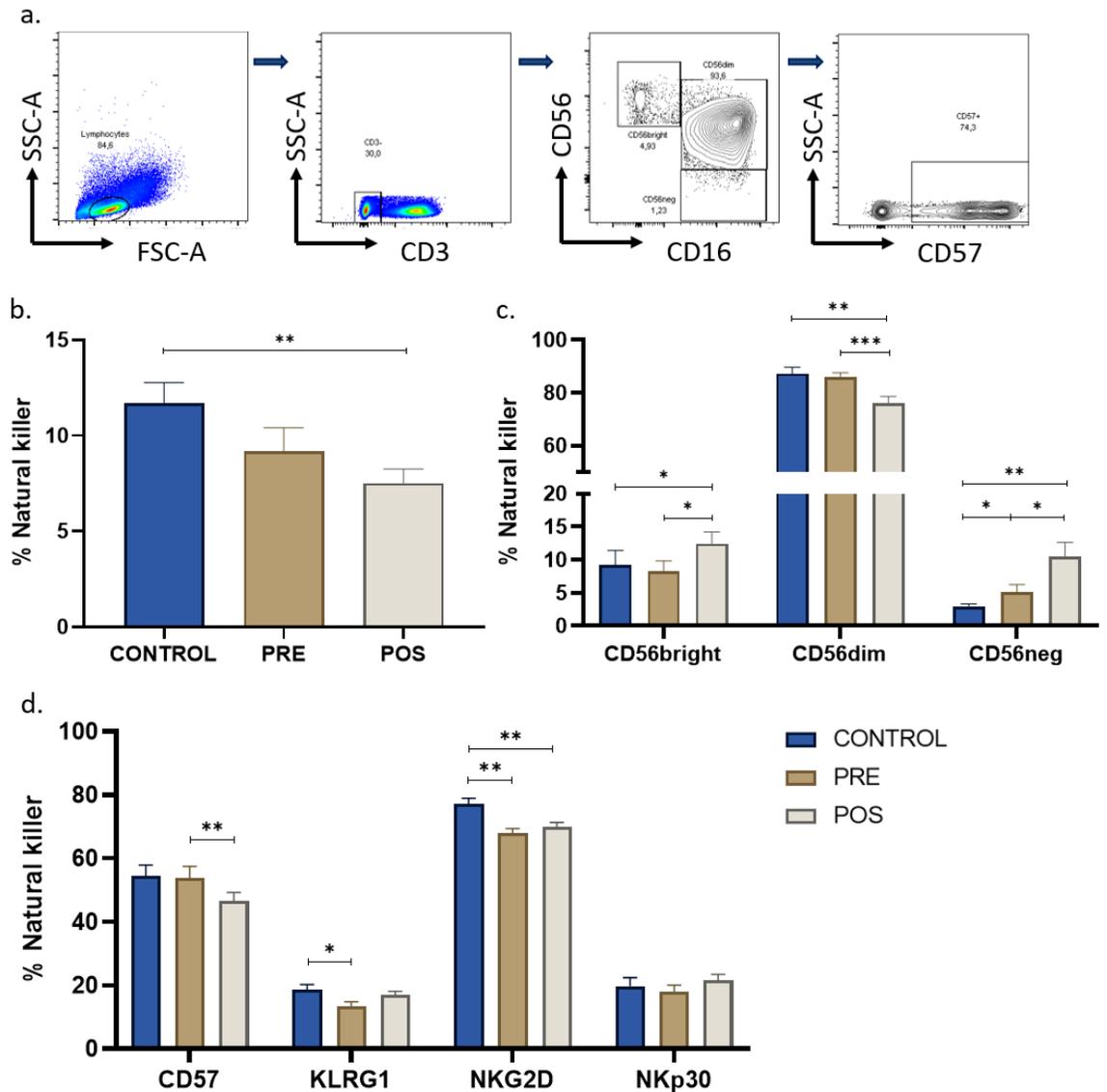
Con base en los hallazgos de las subpoblaciones de monocitos (Figura 29b), se realizó un análisis diferencial de la respuesta a la maduración *in vitro* de DCs separando las poblaciones de acuerdo con la expresión de CD14 y CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). De igual manera a lo visto en la población total, en respuesta al estímulo proinflamatorio se encontró una menor expresión de marcadores de maduración CD80, CD83 y CD40 en las DCs derivadas de monocitos tanto clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) como monocitos intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) en las pacientes antes de la quimioterapia (Figura 32a y b). Sin embargo, la expresión de estos marcadores se recupera luego de la quimioterapia (Figura 32b).



**Figura 32. Respuesta al estímulo proinflamatorio de DCs inmaduras originadas a partir de dos subpoblaciones de monocitos definidas por la expresión diferencial de CD14 y CD16.** Expresión diferencial ( $\Delta\%$ ) de tres marcadores característicos de DCs maduras: CD80, CD83 y CD40 que co expresan además marcadores de monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) (a) y monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (b) detectada en PBMCs de mujeres CONTROL y pacientes antes (PRE) y después de quimioterapia (POS) que fueron cultivados por 72 h. en GM-CSF e IL-4 y estimuladas o no por 48 h. con un coctel de citoquinas proinflamatorias con el fin de evaluar en un ensayo *in vitro* la generación *in situ* de DCs maduras a partir de monocitos como se describió en materiales y métodos. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los grupos. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) (n=10).

### 1.11.3 Evaluación de poblaciones de NKs y la expresión de receptores inhibitorios y activadores.

Las NKs son células importantes en la vigilancia antitumoral, existe evidencia que durante enfermedades inflamatorias así como en el cáncer de mama las NKs son disfuncionales, lo que incluye una deficiente maduración, recuentos bajos de células NK circulantes y menor actividad citotóxica (226). Por ejemplo, el eje NKG2D ha sido descrito como esencial en la inmunovigilancia antitumoral por las NKs gracias a que las células estresadas o transformadas expresan de manera selectiva los ligandos de NKG2D, MICA y/o MICB. Sin embargo, este eje se ve afectado por el microambiente tumoral y citoquinas como el TGF- $\beta$  (227). Con el fin de comparar el desempeño de las células NKs de mujeres sanas con las de pacientes con cáncer antes y después de la quimioterapia, realizamos una evaluación por citometría multicolor de las células NK totales, de diferentes subpoblaciones y la expresión de algunos receptores expresados por estas células en los tres grupos de muestra (Figura 33a). Estos análisis mostraron: (i) que las pacientes con cáncer de mama después de la quimioterapia exhiben una frecuencia menor de NKs totales circulantes comparadas con la frecuencia de estas células observada en las voluntarias sanas. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de estas células entre las pacientes antes y después de la quimioterapia (Figura 33b); (ii) que después de la quimioterapia la subpoblación CD56<sup>dim</sup> disminuye significativamente mientras que las subpoblaciones CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>neg</sup> aumentan (Figura 33c). Finalmente, la expresión diferencial de receptores de NKs mostró: (i) una disminución significativa de la expresión de CD57 en NKs de las pacientes luego de la quimioterapia que no se detectó antes del tratamiento y de KLRG1 en las pacientes antes de la quimioterapia, la cual se restableció luego del tratamiento a un nivel de expresión similar al observado en las NKs de mujeres sanas y (ii) una disminución significativa de NKG2D en las pacientes con cáncer antes de la quimioterapia que no se recuperó luego de la quimioterapia (Figura 33d).

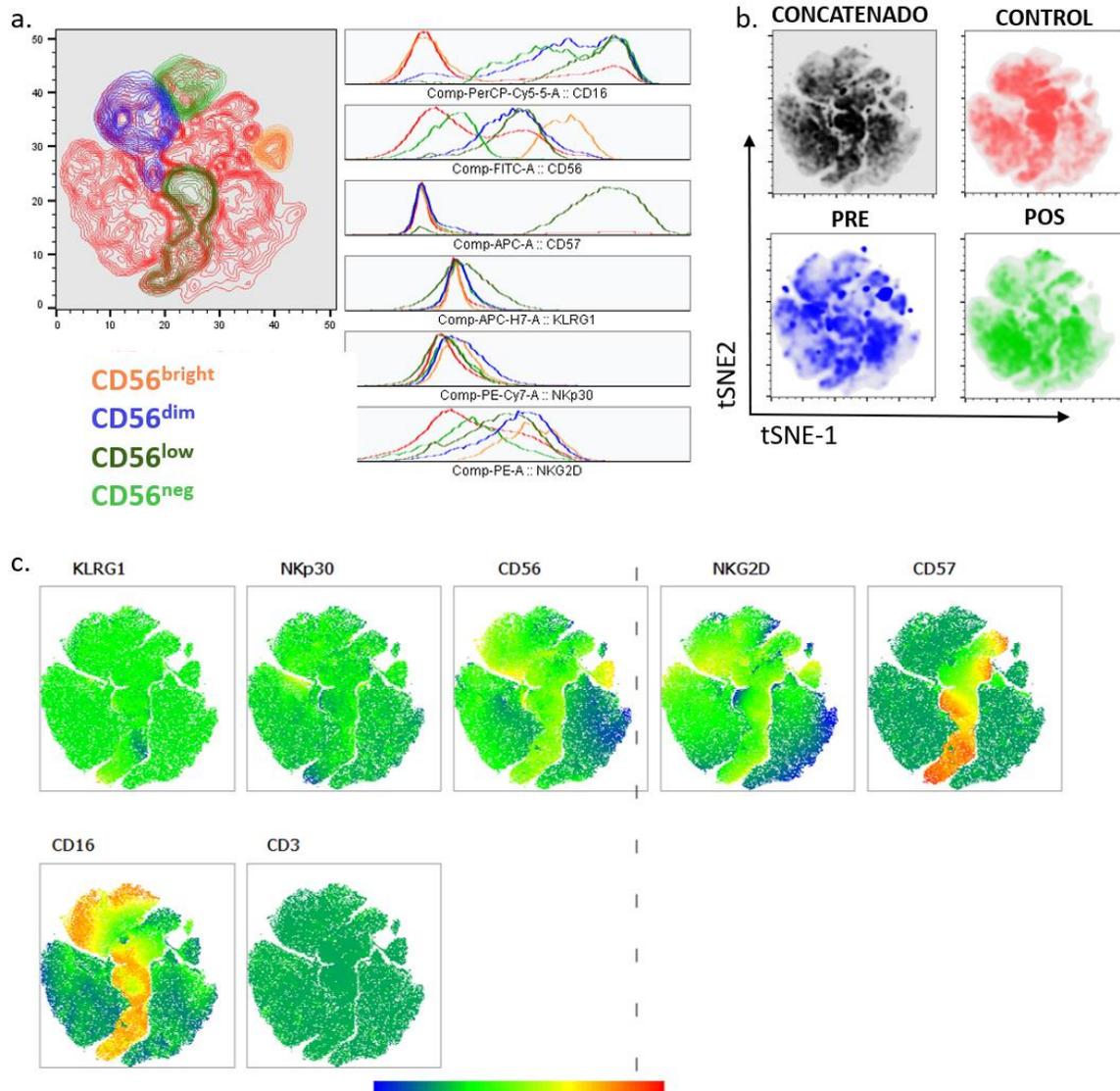


**Figura 33. Evaluación de células NKs, subpoblaciones y expresión de receptores inhibitorios y activadores.**

**a.** Estrategia de análisis para la identificación de las células NKs y las subpoblaciones de CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>neg</sup>, **b.** Frecuencia de células NKs en los controles y las pacientes pre y pos-quimioterapia. **c.** Frecuencia de subpoblaciones de NK, **d.** Expresión de receptores CD57, KLRG1, NKG2D y NKp30 en las NKs totales de los tres grupos de estudio. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ ; (\*\*) $p < 0.01$ ; (\*) $p < 0.05$ ) (n=10).

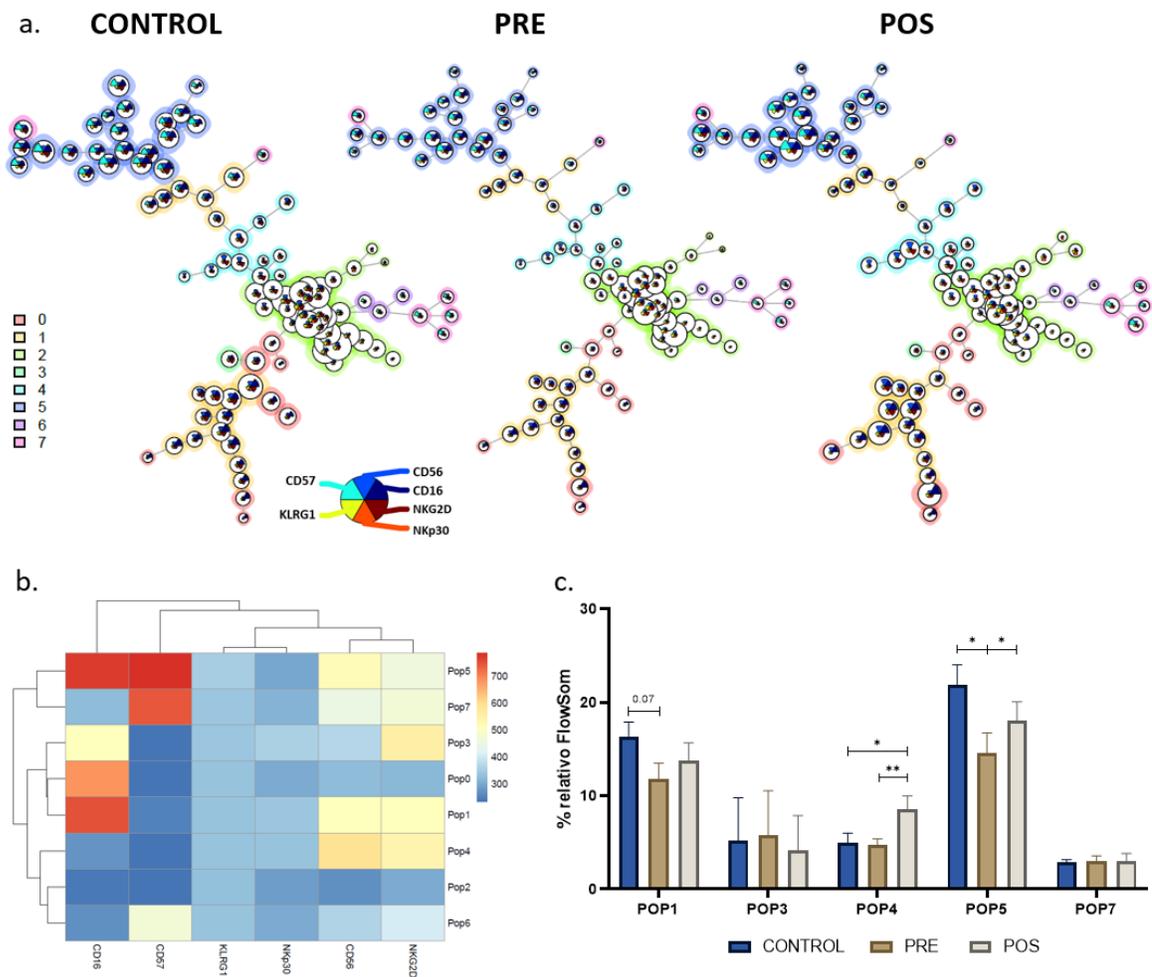
En el análisis manual no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los distintos receptores de NKs evaluados en las diferentes subpoblaciones de NK (Figura suplementaria 8). Con el fin de examinar en los tres grupos de muestra diferencias adicionales a las detectadas mediante el análisis manual, se realizó un análisis de reducción de dimensionalidad con tSNE a los datos de citometría en donde se identificaron cambios cualitativos del perfil de expresión de las distintas subpoblaciones de NKs en las

pacientes en comparación con los controles (Figura 34 y Figura suplementaria 9). Posteriormente, se realizó análisis multiparamétrico a través de FlowSOM para identificar agrupaciones celulares o *clústeres* con un perfil de expresión diferente entre los grupos. Se identificó una población  $CD56^{dim}CD57^+$  que disminuye significativamente en las pacientes con cáncer de mama, pero tiende a recuperarse pos-quimioterapia (POP5) y una población  $CD56^{bright}NKG2D^+$  que incrementa con la quimioterapia (POP4) (Figura 35c).



**Figura 34. Reducción de dimensionalidad mediante tSNE.**

**a.** Subpoblaciones de NKs identificadas sobre el análisis concatenado y el perfil de expresión en histogramas de cada uno de los marcadores estudiados. **b.** Distribución de los agregados celulares en el mapa global de tSNE de las PBMCs CD3- negativos en todas las muestras (concatenado) y en cada grupo de muestras, control, pre y posquimioterapia. **c.** Intensidad de la expresión para cada uno de los receptores indicados bajo la distribución del mapa tSNE.



**Figura 35. Análisis multiparamétrico de NKs con FlowSOM.**

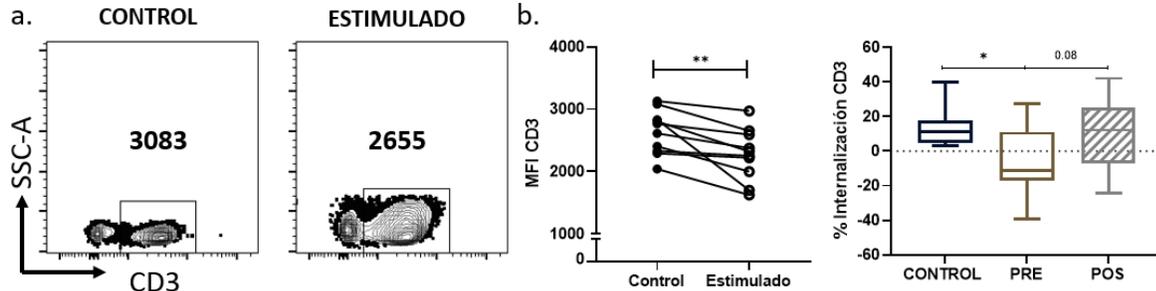
**a.** Árbol de expansión que representa el perfil de expresión de las ocho poblaciones principales y sus subpoblaciones identificadas en FlowSOM para los tres grupos de estudio. **b.** Mapa de calor que muestra el perfil de expresión de cada marcador en los ocho clústeres identificados y su relación jerárquica **c.** Gráfica de barras comparando la frecuencia relativa de las poblaciones que tienen características de NKs entre los controles (barras azules) y las pacientes tanto pre (barras Marrón) como pos-quimioterapia (barras crema). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10).

En conclusión, las pacientes con cáncer de mama exhiben cambios en las subpoblaciones de NKs y en la expresión de receptores de activación y senescencia antes y después de la quimioterapia en comparación con las mujeres sanas.

### 1.11.4 Análisis funcional del compartimiento de LT en pacientes con cáncer de mama.

En un trabajo previo del grupo de investigación, Bernal-Estévez y cols. encontró que pacientes con cáncer de mama tenían un compromiso funcional del compartimento APC y

de LT antes de la quimioterapia, que se recuperaba después de la terapia antitumoral con esquema A/C (20). En línea con estos hallazgos y para confirmar estos datos, las PBMCs de la nueva muestra de pacientes y el grupo de contrapartes sanas se estimularon con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 durante 72 horas. El porcentaje de internalización del CD3 corresponde al delta de cambio del MFI entre el control y el estimulado (Figura suplementaria 10). Consecuente con lo reportado por Bernal-Estévez en respuesta a la estimulación *in vitro*, los LT de las voluntarias sanas mostraron una eficiente internalización del receptor de células T (TCR) evidenciada por la reducción de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD3 (Figura 36a y b). El análisis pareado del MFI de CD3 en células obtenidas de donantes sanas estimuladas y no estimuladas mostró que la internalización provocada por el estímulo fue estadísticamente significativa en las mujeres sanas examinadas (Figura 36b). Por el contrario, las pacientes antes de la quimioterapia exhiben una menor capacidad de internalización del CD3, que tiende a recuperarse al nivel de las sanas después de la quimioterapia, estos resultados en esta nueva cohorte de pacientes coinciden con lo reportado previamente por Bernal-Estévez y cols. en una primera cohorte de 19 pacientes (20).

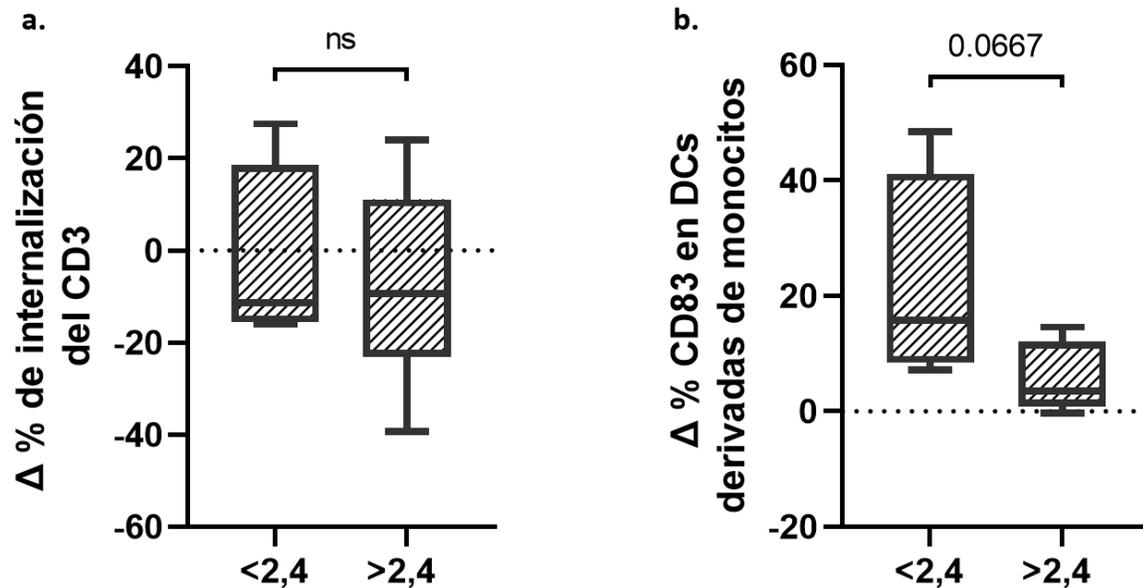


**Figura 36. La estimulación *in vitro* de PBMCs evidencia una deficiente capacidad funcional medida por la internalización del TCR en LT de pacientes con cáncer de mama.**

**a.** Gráfica de contornos (SSC-A vs CD3) en la que se cuantifica el MFI de CD3 en una muestra de PBMCs de una donante sana sin estimular (MFI de CD3 = 3083) y 72 horas luego de la estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 (MFI de CD3 = 2655) (se presenta un ensayo representativo de 10 realizados). **b.** Análisis pareado de la cuantificación del MFI de CD3 en 10 donantes sanas antes (control) y luego de la estimulación por 72 horas *in vitro* con perlas anti-CD3/28/2 (panel izquierdo); cuantificación de % de internalización de CD3 en donantes sanas (Control – caja azul n=10), pacientes antes de la quimioterapia (Pre – caja Marrón, n=10) y muestras de pacientes posterior a la quimioterapia (Pos – caja gris con rayas, n=10). Se muestra la dispersión de los datos en cajas y bigotes (5-95%). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ ; (\*\*) $p < 0.01$ ; (\*) $p < 0.05$  (n=10).

### **1.11.5 Asociación de la capacidad de maduración de DCs y la internalización del CD3 con la respuesta clínica.**

Para el tratamiento del cáncer de mama de alto riesgo y tumores  $\geq 2$  cm la quimioterapia neoadyuvante se utiliza ampliamente como herramienta terapéutica (215). El principal objetivo de la quimioterapia A/C es la reducción del tamaño tumoral para que las pacientes puedan ser candidatas a cirugías más conservadoras. Este esquema de tratamiento permite monitorear la respuesta al tratamiento, que en parte depende de la respuesta antitumoral del sistema inmune (215). Estudios han mostrado que la quimioterapia citotóxica puede inducir cambios dinámicos en el microambiente inmunológico del tumor que varían según el subtipo y la respuesta patológica (214). Un estudio previo de nuestro grupo evaluó si existía alguna relación entre el estado funcional de las células del sistema inmune y el grado de respuesta clínica del tumor a la quimioterapia neoadyuvante. Estos análisis mostraron que el estatus funcional previo a la quimioterapia tanto de LT (medido por la internalización del TCR) como de DCs (medido por la expresión de CD83 de DCs en respuesta a un estímulo proinflamatorio) tiene una asociación significativa con la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia neoadyuvante (20). En línea con estos hallazgos, en la nueva cohorte de pacientes con cáncer de mama se realizó la misma evaluación de la primera cohorte, previo al inicio de la quimioterapia, se cotejó el desempeño funcional de LT medido por la internalización de CD3 en respuesta *in vitro* y de DCs medido por la expresión de CD83 con el tamaño tumoral residual después de la quimioterapia neoadyuvante (tamaño tumoral: respondedoras  $<2,4$  cm<sup>2</sup> y no respondedoras  $>2,4$  cm<sup>2</sup>). Si bien no se encontraron cambios significativos entre la respuesta clínica y el delta de la internalización del TCR, en respuesta al estímulo, las DCs de las pacientes que respondieron mejor a la terapia neoadyuvante tendieron a tener un mayor grado de expresión del CD83 (Figura 37).

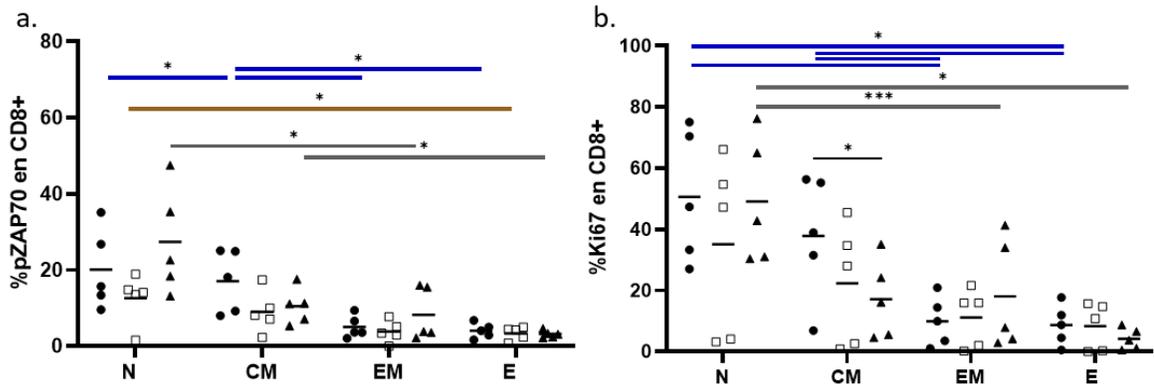


**Figura 37. Relación de la internalización del TCR y la expresión de CD83 en DCs con la respuesta clínica.** a. Gráfica de cajas y bigotes que muestran el porcentaje de internalización de CD3 en relación con el tamaño tumoral (área en cm<sup>2</sup>). b. Gráfica de cajas y bigotes que muestran el delta del porcentaje de expresión de CD83 en relación con el tamaño tumoral (área en cm<sup>2</sup>). Se muestra la dispersión de los datos en cajas y bigotes (5-95%). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar las pacientes respondedoras de las no respondedoras. (\*\*\*)*p*<0.001; (\*\*)*p*<0.01; (\*)*p*<0.05) (n=10). Barra de error indica SEM.

### 1.11.6 Los LT CD8 efectores terminales exhiben una disminución en la capacidad proliferativa.

Para evaluar la respuesta funcional de diferentes subpoblaciones de memoria de LT CD8 a la estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 por 72 horas, se midió la fosforilación de ZAP70 un componente de la maquinaria de señalización del TCR y encontramos tal y como ha sido reportado en la literatura (58) una disminución lineal de la fosforilación de ZAP70 (pZAP70) especialmente en LT CD8+ a medida que se genera la diferenciación de estas células del repertorio virgen al de memoria y de LT efectores (Figura 38a). En el caso de las pacientes con cáncer antes de la quimioterapia, esta disminución fue solo significativa cuando se comparó la expresión de pZAP70 entre los LT vírgenes y los LT efectores terminales de estas pacientes (Figura 38a). Para evaluar la capacidad funcional de LT entre los tres tipos de muestra, se evaluó la capacidad proliferativa de estas células midiendo la expresión de Ki67 en LT cuyo TCR había sido estimulado *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3, CD28 y CD2. Los LT efectores terminales de las voluntarias control y de las pacientes después de la quimioterapia exhibieron una disminución significativa de la proliferación cuando se

compararon con subpoblaciones menos diferenciadas después de la estimulación. Estos resultados contrastan con el grado de proliferación detectado en LT de las pacientes pre-quimioterapia quienes no mostraron cambios estadísticamente significativos en la capacidad de proliferación entre las distintas subpoblaciones evaluadas (Figura 38b).



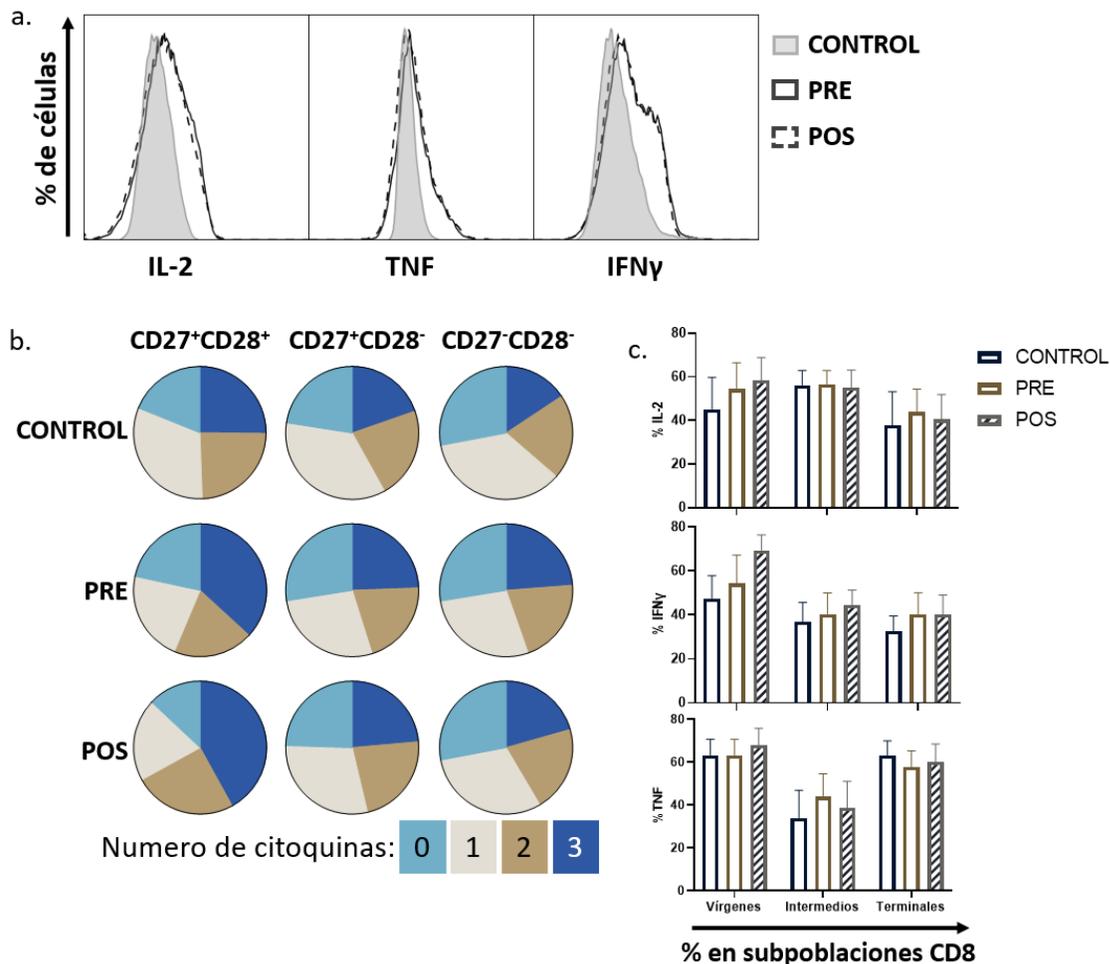
**Figura 38. Disminución en la capacidad proliferativa de LT CD8.**

**a.** Gráfica de puntos de dispersión que muestra el porcentaje de LT CD8 expresando pZAP70 en las subpoblaciones de memoria: N (Naïve: CD62L+, CD45RO-), CM (Memoria central: CD62L+, CD45RO+), EM (efectoras de memoria: CD62L-, CD45RO+) y E (Efectoras: CD62L-, CD45RO-) después de 72 horas de estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2. **b.** Gráfica de puntos de dispersión que muestra la evaluación de la proliferación en las subpoblaciones de memoria CD8 a través de la expresión de Ki67 después de la estimulación *in vitro* con perlas anti-CD3/28/2 durante cuatro días. Cada símbolo representa una donante: controles (círculos negros n=5), Pacientes pre-quimioterapia (cuadrados n=5) y pos-quimioterapia (triángulos negros n=5). Las comparaciones entre las subpoblaciones de memoria fueron calculadas usando una ANOVA de múltiples comparaciones con corrección de *Turkey*. (\*\*\*)p<0.001; \*\*p<0.01; \*p<0.05) (n=5).

### 1.11.7 Polifuncionalidad de los LT CD8 vírgenes después de la quimioterapia

Se ha descrito que el nivel de expresión de CD28 y CD27 disminuye de manera secuencial en LT CD8 a medida que ellos transitan de LT vírgenes (CD27+CD28+) a intermedios (CD27+CD28-) y a LT terminalmente diferenciados con características senescentes (CD27-CD28-) (58). Con el fin de complementar los estudios funcionales de LT en los tres grupos de muestras analizadas, se adelantó en células estimuladas una tinción intracelular de citoquinas como herramienta para comparar entre los grupos la función efectora en las subpoblaciones de LT CD8+ clasificadas por su relativa expresión de CD27 y CD28. Para esto se utilizó un panel que anticuerpos fluoromarcados con el fin de comparar entre LT estimuladas provenientes de los grupos de mujeres, la expresión intracelular simultáneamente o no de IL-2, IFN $\gamma$  y TNF. Los resultados de este experimento mostraron de manera interesante que los LT CD8+ vírgenes de las pacientes mostraron una

polifuncionalidad considerablemente mayor que los LT CD8+ vírgenes de las mujeres control (Figura 39b). Lo cual sugiere que estas células CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> no son estrictamente hablando una población virgen. No encontramos, diferencias representativas entre los grupos, ni entre los subconjuntos intermedios (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) ni terminalmente diferenciados (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>). Posteriormente, se analizó cada citoquina separadamente en los subconjuntos de LT CD8+ en los tres grupos (Figura 39c). Se encontró una tendencia de los LT vírgenes de las pacientes pos-quimioterapia a expresar altos niveles de citoquinas proinflamatorias, reforzando la idea de que estas células en las pacientes pos-quimioterapia no son células verdaderamente vírgenes. Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 39c).



**Figura 39. Los LT CD8 vírgenes exhiben polifuncionalidad después de la terapia neoadyuvante.**

**a.** Histogramas representativos de la expresión de citoquinas proinflamatorias IL2, TNF e IFN $\gamma$ . Control (histograma gris), paciente pre-quimioterapia (Histograma blanco) y paciente pos-quimioterapia (histograma con línea punteada). **b.** Gráfica de tortas que muestran la distribución promedio de células que expresan 0, 1, 2 o 3 citoquinas (IL-2, IFN $\gamma$  y TNF) en los subconjuntos de LT CD8 CD27/CD28 después de la estimulación durante 24 horas *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 dentro de cada grupo de

cinco donantes sanas y cinco pacientes antes y después de la quimioterapia. **c.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de los subconjuntos de LT CD8 expresando IL-2, IFN $\gamma$  y TNF. Las barras muestran la media  $\pm$  SEM por 5 donantes en cada grupo. Controles (Azul oscuro), pacientes prequimioterapia (Marrón) y pacientes pos-quimioterapia (gris). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. (\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) (n=5/grupo). Barra de error indica SEM

### 1.11.8 Diferencias en la detección de subpoblaciones de LT CD4+ y LT CD8+ en pacientes con cáncer de mama.

Si bien los LT CD8+ son más vulnerables al estrés originado por infecciones crónicas latentes como el CMV y el envejecimiento (228). Cuando analizamos la distribución de las subpoblaciones de memoria de LT, se detectó en el caso de los LT CD4+, una disminución de la población virgen y un incremento de la población de CM en los LT CD4+ en las pacientes pos-quimioterapia. Por el contrario, en el caso de LT CD8+ el análisis de la distribución de distintas subpoblaciones de memoria mostró un incremento en la población de células vírgenes y una disminución de la población de EM en las pacientes pos-quimioterapia (Figura 40).

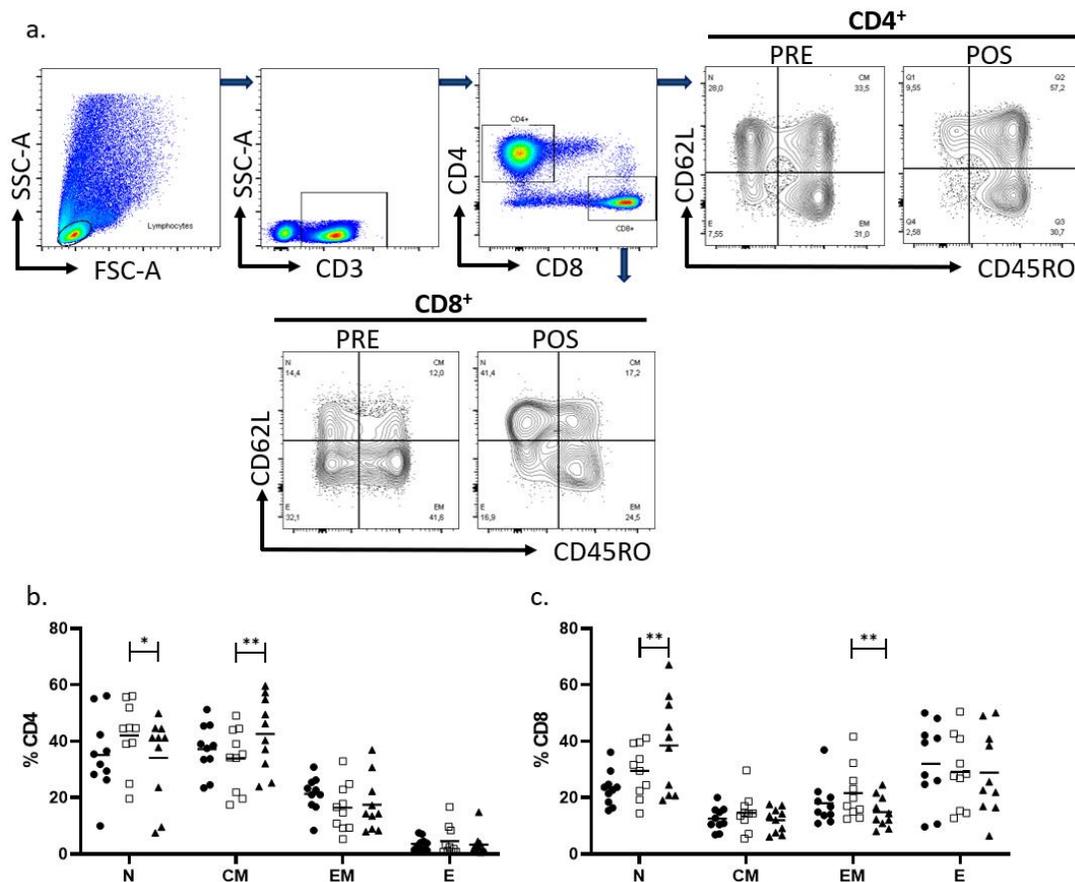
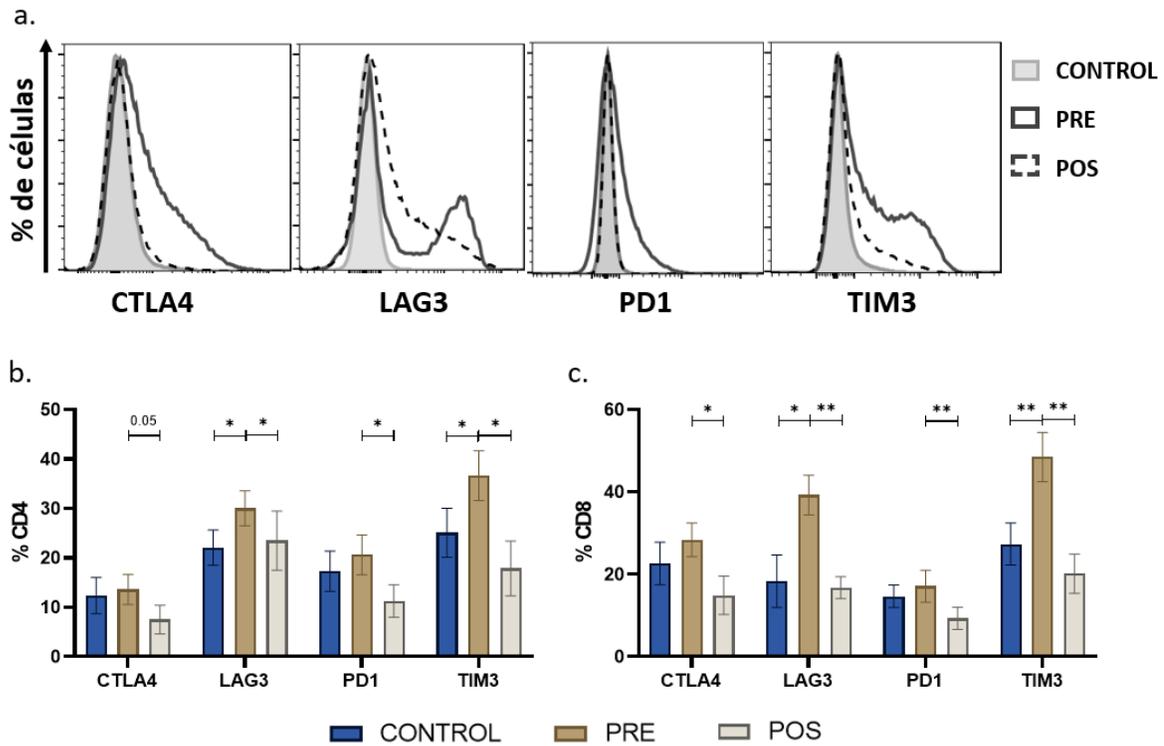


Figura 40. Distribución de las distintas subpoblaciones de memoria en LT CD4+ y LT CD8+.

**a.** Ejemplo representativo del análisis *ex vivo* de LT. Se definió la población de linfocitos con base en sus características de tamaño y complejidad utilizando los parámetros (FSC-A y SSC-A), se delimitó la región de células CD3+ y dentro de éstas las poblaciones CD4+ y CD8 seguido del análisis de la expresión de CD62L y CD45RO para las poblaciones de memoria N (Naïve: CD62L<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup>), CM (Memoria central: CD62L<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>), EM (efectoras de memoria: CD62L<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>) y E (Efectoras: CD62L<sup>-</sup>, CD45RO<sup>-</sup>). **b.** Gráfica de puntos de dispersión que muestra el porcentaje de cada subpoblación de memoria en los tres grupos de estudio controles (círculos negros), pacientes pre-quimioterapia (cuadrados blancos) y pacientes pos-quimioterapia (triángulos negros) en LT CD4+ *ex vivo* y c. En LT CD8 *ex vivo*. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.001; \*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10/grupo).

### 1.11.9 La quimioterapia induce una disminución del fenotipo de agotamiento en LT CD4+ y LT CD8+ detectado en pacientes con cáncer previo al tratamiento.

La progresión del cáncer ocurre cuando el sistema inmune es incapaz de eliminar el crecimiento de células tumorales como consecuencia de una limitada capacidad de reconocimiento del antígeno, agotamiento inmune y alteraciones metabólicas que afectan la función de las células del sistema inmune (229). El tratamiento más utilizado en el manejo del cáncer es la quimioterapia, que puede tener efectos que favorecen la inmunovigilancia a través de la liberación de DAMPs por las células tumorales. Sin embargo, la quimioterapia también puede inducir senescencia (213). De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo además de los experimentos encaminados a analizar la distribución de distintas subpoblaciones de LT, se contrastó entre mujeres sanas, pacientes con cáncer antes y después de la quimioterapia, el nivel de expresión y distribución de varios marcadores de agotamiento y senescencia tanto en LT CD4+ como LT CD8+. La evaluación del grado de expresión de los marcadores: CTLA4, LAG3, PD1 y TIM3 en LT mostró que las pacientes con cáncer de mama previo al tratamiento tienen un mayor número de LT tanto CD4+ como CD8+ que expresan todos estos receptores de membrana característicos de LT agotados. De manera interesante los resultados presentados en la Figura 41 sugieren que la expresión de todos los marcadores de agotamiento evaluados disminuye después de la quimioterapia neoadyuvante a un nivel similar al detectado en las mujeres sanas. Este resultado nos lleva a argumentar que la quimioterapia neoadyuvante tiene la capacidad de disminuir el grado de agotamiento observado en LT de las pacientes con cáncer de mama recién diagnosticadas y previo a la instauración de este tipo de tratamiento.

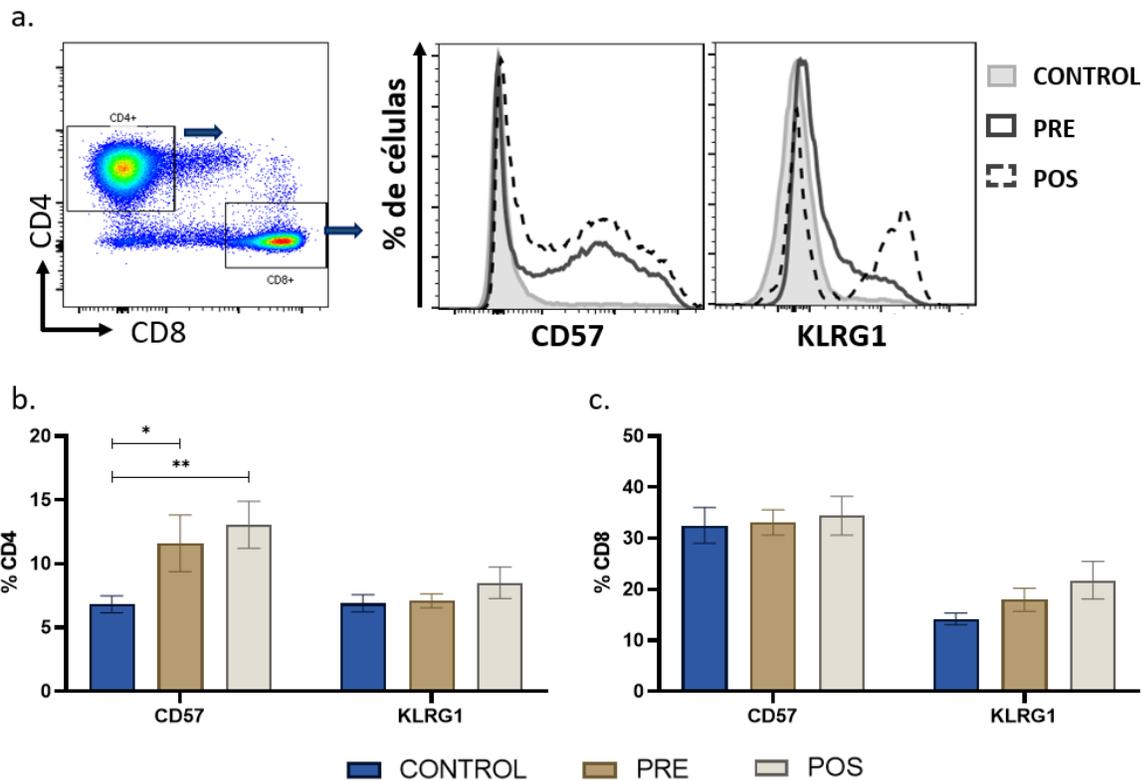


**Figura 41. Cambios en la expresión de marcadores de agotamiento en LT CD4+ y CD8.**

**a.** Histogramas representativos de la expresión de marcadores de agotamiento en LT CTLA4, LAG3, PD1 y TIM3. Control (histograma gris), paciente pre-quimioterapia (Histograma blanco) y paciente pos-quimioterapia (histograma con línea punteada). **b.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT expresando cada uno de los marcadores de agotamiento, después de 72 horas de estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2. Promedio de cada uno de los grupos de estudio controles (barras azules), pacientes pre-quimioterapia (barras cafés) y pacientes pos-quimioterapia (barras crema) en LT CD4+ y **c.** En LT CD8. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ ; (\*\*) $p < 0.01$ ; (\*) $p < 0.05$  ( $n = 10$ /grupo).

### 1.11.10 Aumento en la expresión de CD57 en LT CD4+ después de la quimioterapia.

Además de la medición del grado de agotamiento de LT CD4+ y LT CD8+ se evaluó en estos linfocitos el grado de expresión de CD57 y KLRG1 cuya expresión en estas células ha sido definida como característica de LT senescentes (57). En la cohorte de estudio encontramos un incremento significativo de la expresión de CD57 en LT CD4+ en pacientes con cáncer antes y después de la quimioterapia (Figura 42Figura 42b). Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas se observa una tendencia similar en KLRG1 tanto en LT CD4+ como en LT CD8+ (Figura 42).

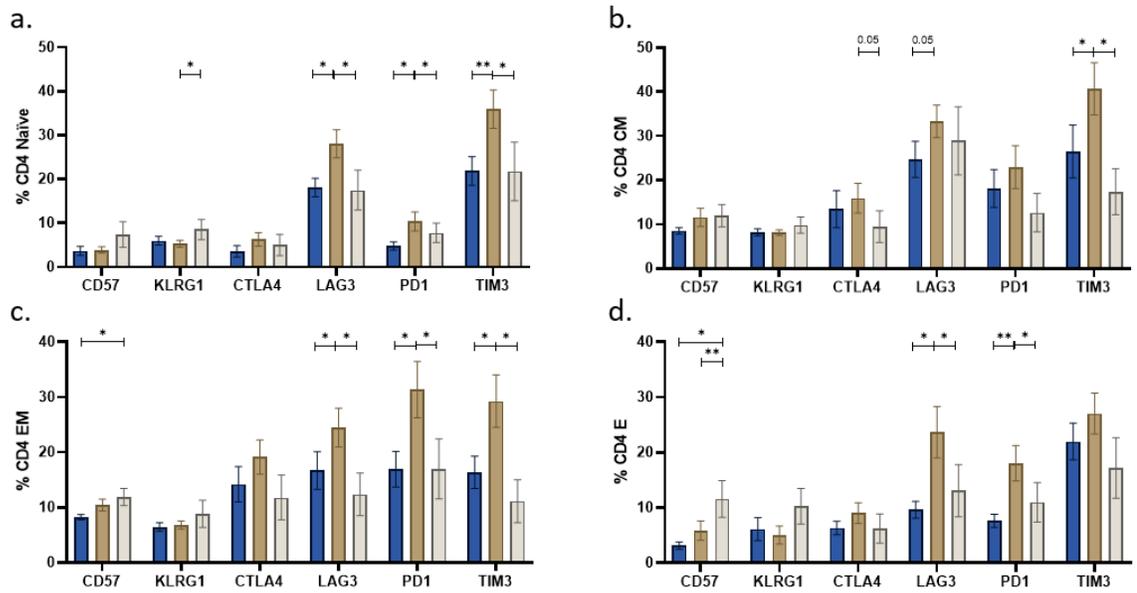


**Figura 42. Cambios en la expresión de marcadores de senescencia en LT CD4+ y CD8.**

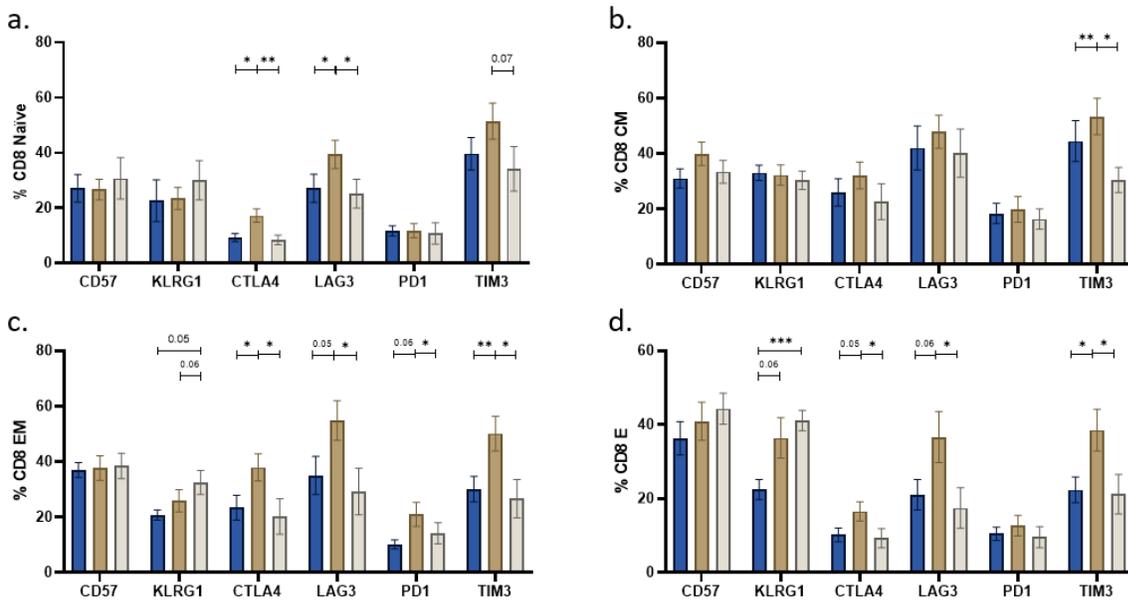
**a.** Histogramas representativos de la expresión de marcadores de senescencia en LT CD57 y KLRG1. Control (histograma gris), paciente pre-quimioterapia (histograma vacío) y paciente pos-quimioterapia (histograma con línea punteada). **b.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT expresando CD57 o KLRG1, después de 72 horas de estimulación in vitro con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2. En los tres grupos de estudio controles (barras azules), pacientes pre-quimioterapia (barras cafés) y pacientes pos-quimioterapia (barras crema) en LT CD4+ y **b.** En LT CD8. Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) ( $n = 10$ /grupo).

Posteriormente se analizó la expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en las subpoblaciones de LT vírgenes, de memoria y efectores tanto en LT CD4+ (Figura 43) y en LT CD8 (Figura 44). Los resultados de estas mediciones mostraron de forma consistente que en pacientes con cáncer previo al tratamiento tanto en las subpoblaciones de LT CD4+ como de LT CD8+ la expresión de marcadores de agotamiento está aumentada significativamente en todas las subpoblaciones de LT. De forma interesante, se evidenció que después de la quimioterapia al igual que sucede en LT CD4+ y LT CD8+ totales (Figura 41), la expresión de marcadores de agotamiento disminuye de manera significativa en las distintas subpoblaciones celulares (Figura 43 y 41) De otra parte, la medición de los marcadores de senescencia en LT CD4+ mostró que el incremento con respecto a mujeres sanas de CD57 en pacientes posquimioterapia se da principalmente en las poblaciones efectoras y de memoria efectora (Figura 43c y d), mientras que un

incremento significativo de KLRG1 con respecto a mujeres sanas solo se vio en LT vírgenes (Figura 43a). Por su parte, la expresión de CD57 y KLRG1 en subpoblaciones de LT CD8+ no mostró diferencias significativas entre grupos en la expresión de CD57 entre las distintas subpoblaciones analizadas, mientras que, la expresión significativa de KLRG1 en pacientes luego de la quimioterapia con respecto a las mujeres sanas se evidenció solo en LT de memoria efectora y LT efectores terminalmente diferenciados (Figura 44c y d).



**Figura 43. Marcadores de agotamiento y senescencia en las subpoblaciones de memoria de LT CD4.**  
**a.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT expresando los marcadores de senescencia (CD57 y KLRG1) y de agotamiento (CTLA4, LAG3, PD1 y TIM3), después de 72 horas de estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2. En los tres grupos de estudio controles (barras azules), pacientes pre-quimioterapia (barras cafés) y pacientes pos-quimioterapia (barras crema) en LT CD4+ vírgenes (Naive), **b.** Memoria central, (MC) **c.** Memoria efectora (EM) y **d.** efectoras (E). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\**p*<0.001; \*\**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10/grupo).

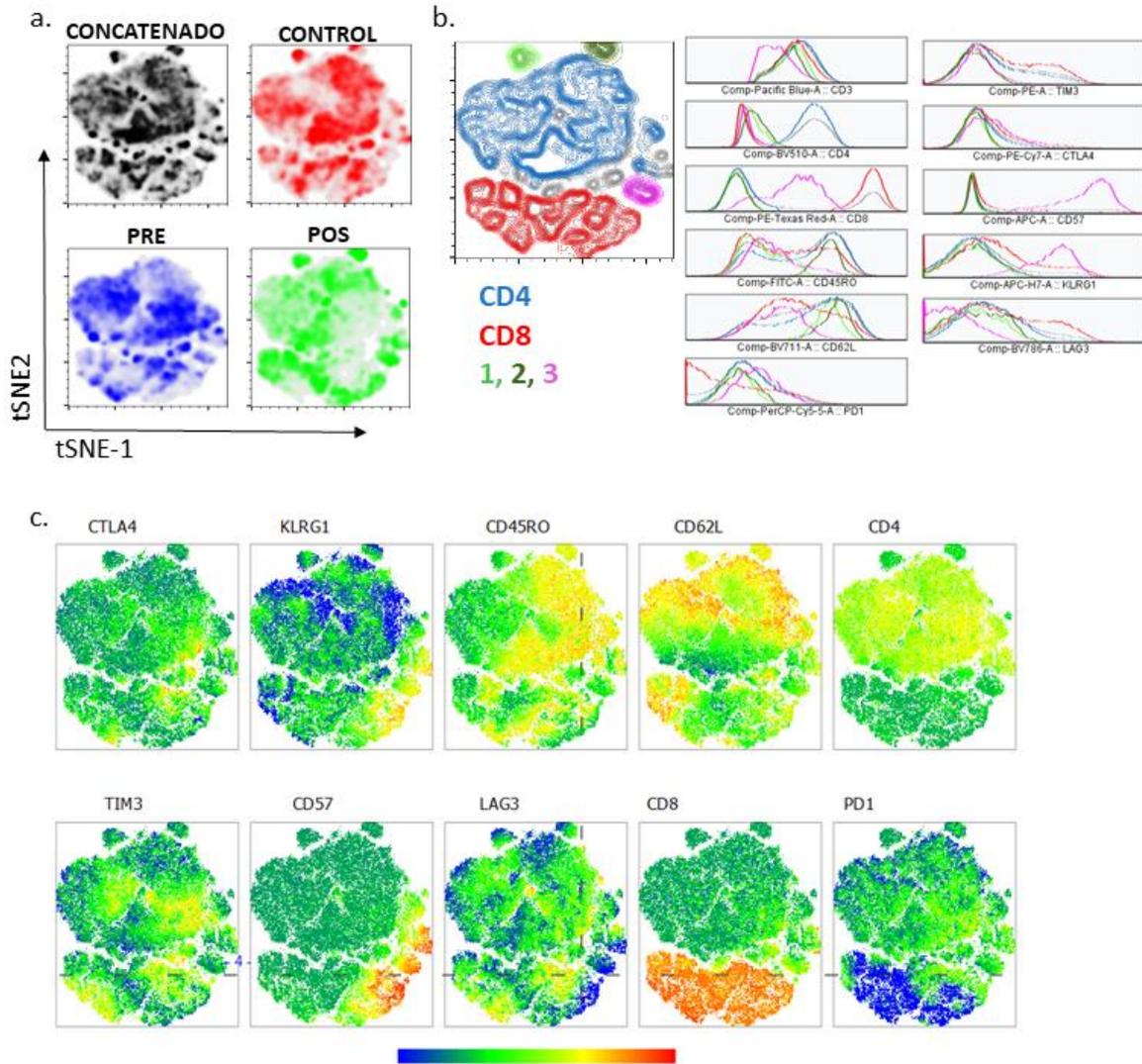


**Figura 44. Marcadores de agotamiento y senescencia en las subpoblaciones de memoria de LT CD8.**

a. Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT expresando los marcadores de senescencia (CD57 y KLRG1) y de agotamiento (CTLA4, LAG3, PD1 y TIM3), después de 72 horas de estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2. En los tres grupos de estudio controles (barras azules), pacientes prequimioterapia (barras café) y pacientes pos-quimioterapia (barras beige) en LT CD4+ vírgenes (Naïve), b. Memoria central (MC), c. Memoria efectora (ME) y d. efectoras (E). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ ; (\*\*) $p < 0.01$ ; (\*) $p < 0.05$ ) (n=10/grupo).

### 1.11.11 Análisis de alta dimensión de citometría de flujo en LT

Nosotros examinamos mediante tSNE la distribución general de los perfiles inmunes de LT de mujeres voluntarias sanas (grupo CONTROL), pacientes con cáncer de mama recién diagnosticado (grupo PRE) y después de la quimioterapia neoadyuvante con esquema A/C (grupo POS). Utilizando un panel de 10 parámetros (Figura 45c), el grupo PRE se diferencia del grupo CONTROL y POS (Figura 45a). Dentro del diagrama concatenado se identificaron algunas subpoblaciones que son CD4<sup>low</sup>, definidas como 1:CD4<sup>low</sup>CD3<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup>, la 2:CD4<sup>low</sup>CD3<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> que no se evidencian claramente en el tSNE de las pacientes pre-quimioterapia. Y una población CD8 definida como 3:CD8<sup>low</sup>CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup> que sobresale principalmente en el grupo pos-quimioterapia (Figura 45b).



**Figura 45. Reducción mediante tSNE de dimensionalidad en LT.**  
**a.** Distribución de los agregados celulares en el mapa global de tSNE de las PBMCs CD3 positivos en todas las muestras (concatenado) y en cada grupo de muestras, control, pre y pos-quimioterapia **b.** Subpoblaciones de LT identificadas sobre el análisis concatenado y el perfil de expresión en histogramas de cada uno de los marcadores estudiados CD8 (rojo), CD4+ (azul), 2 subpoblaciones CD3+ que son CD4<sup>low</sup>, y una población CD8<sup>low</sup> que cambian entre los grupos identificadas como 1 (verde claro), 2 (verde oscuro) y 3 (fucsia) respectivamente, **c.** Intensidad de la expresión para cada uno de los receptores indicados bajo la distribución del mapa tSNE.

### 1.11.12 Análisis de identificación por clúster a través de FlowSOM

Posteriormente, cuando realizamos el análisis de identificación por clúster a través de FlowSOM, encontramos que el clúster que contiene la mayoría de LT, es CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, y disminuye significativamente después de la quimioterapia. Dentro del

clúster 0 se encuentra contenido el clúster 7 ( $CD3^+CD4^+CD62L^{++}CD45RO^{low}LAG3^+$ ) que disminuye después de la quimioterapia y se puede asociar con la disminución encontrada en el análisis manual en los LT CD4+ vírgenes. Un tercer clúster dentro del compartimento CD4+ identificado como clúster 6 ( $CD3^+CD4^+CD62L^{low}CD45RO^{++}PD1^{low}CD57^{++}KLRG1^{low}$ ). Que está significativamente aumentado en el grupo de pacientes antes de la quimioterapia y disminuye significativamente después del tratamiento, pero no al nivel del grupo control (Figura 46).

Dentro del compartimento de LT CD8 se encontraron tres clústeres principales:

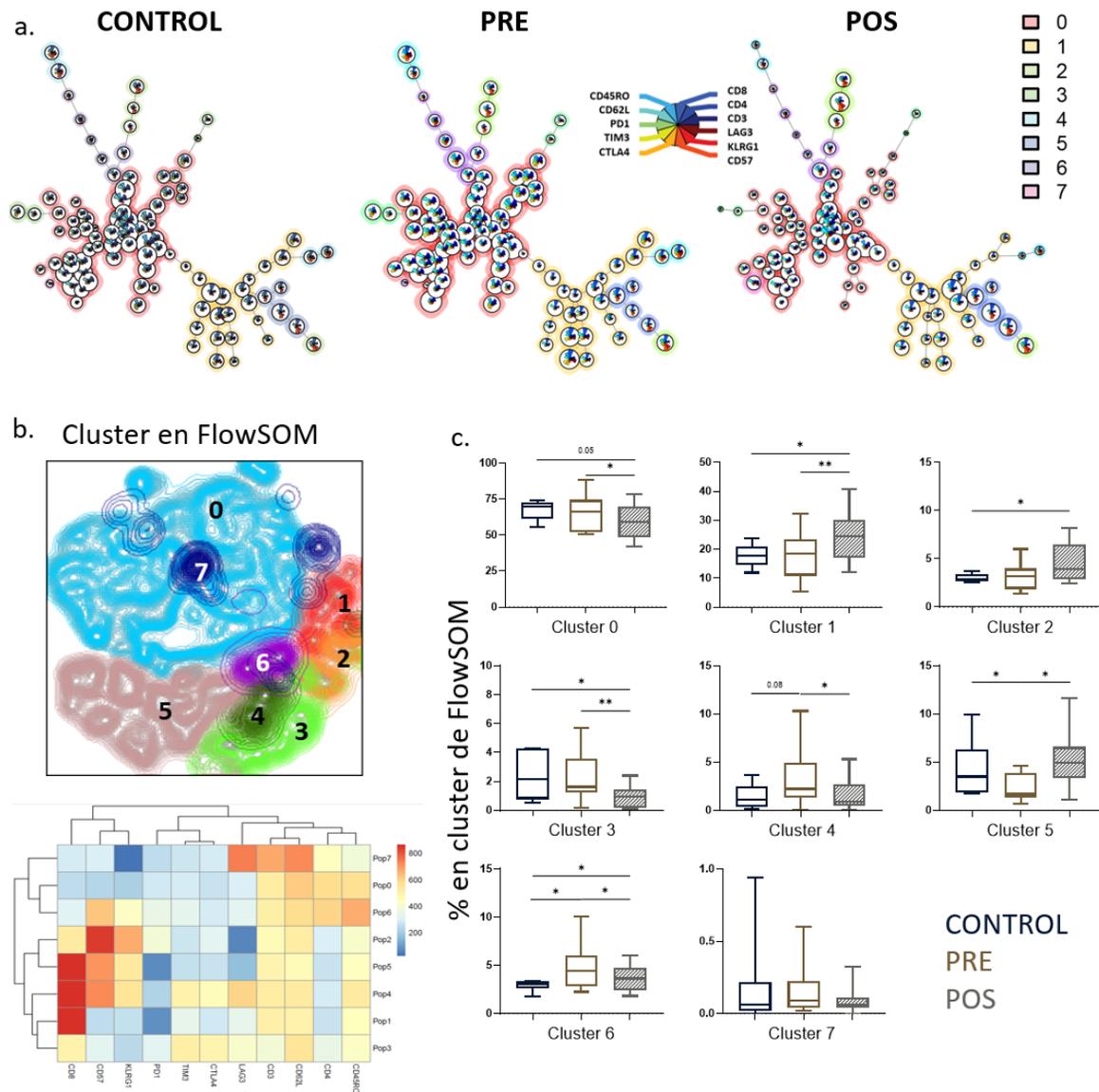
(i) Clúster 1 ( $CD3^+CD8^{++}CD62L^+CD45RO^{low}TIM3^{low}LAG3^{low}$ ) que incrementa significativamente después de la quimioterapia y puede estar comprendido dentro de la población de LT CD8 vírgenes que en el análisis manual también incrementó significativamente después de la quimioterapia.

(ii) Clúster 4 ( $CD3^+CD8^{++}CD62L^+CD45RO^+TIM3^+CTLA^+LAG3^+CD57^{++}KLRG1^+$ ). Esta aumentado en pacientes con relación al control y disminuye después de la quimioterapia. Aunque en el análisis manual no encontramos diferencias significativas entre los grupos, los hallazgos del análisis automatizado coinciden con la tendencia observada de recuperar un fenotipo más cercano a los controles después de la quimioterapia.

(iii) Clúster 5 ( $CD3^+CD8^{++}CD62L^{low}CD45RO^{low}CD57^{++}KLRG1^+$ ), que esta disminuida significativamente en las pacientes y se recupera después de la quimioterapia puede estar relacionada con las poblaciones efectoras que expresan marcadores de senescencia del análisis manual que incrementan después de la quimioterapia.

FlowSOM identificó dos clústeres adicionales dentro del compartimento de LT CD8. Sin embargo, dentro de estas poblaciones la MFI de CD8 es menor que en Pop1, 4 y 5. El clúster 2 ( $CD3^+CD8^{low}CD62L^+CD45RO^{low}PD1^+CD57^{++}KLRG1^{++}$ ), que incrementa en pacientes antes y significativamente después de la quimioterapia con relación al grupo control. Lo cual podría estar relacionado con la tendencia observada en el análisis manual en relación con el incremento de marcadores de senescencia observado después del tratamiento.

Finalmente, el clúster 3 ( $CD3^{low}CD8^{low}CD62L^{+}CD45RO^{low}CTLA4^{+}TIM3^{+}LAG3^{+}$ ), una población con características de agotamiento celular que disminuye significativamente después de la quimioterapia.

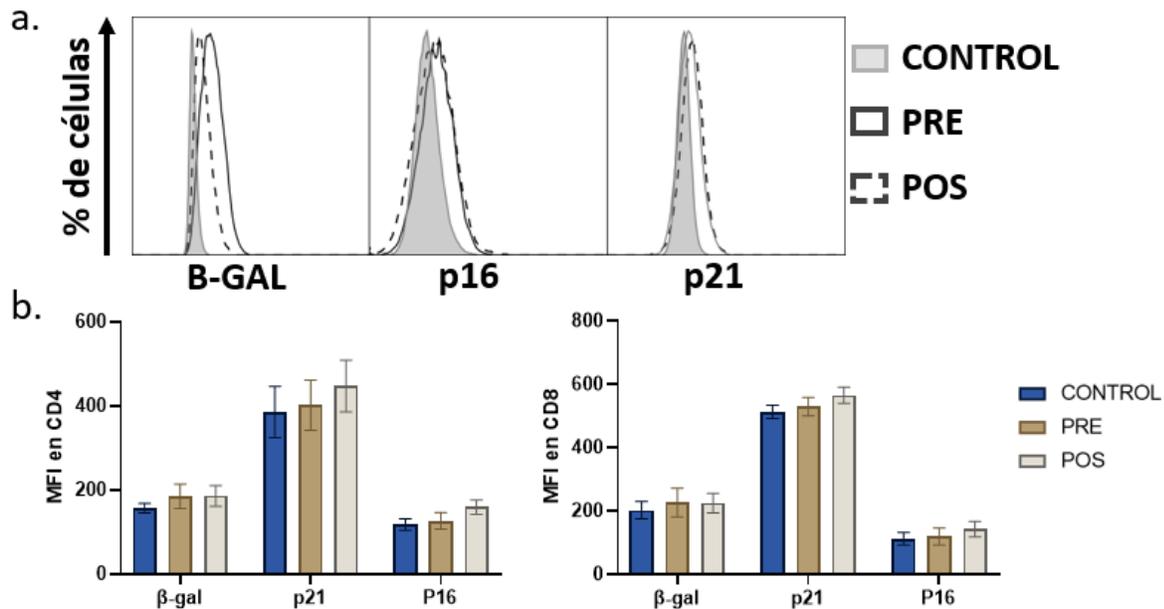


**Figura 46. Análisis multiparamétrico de LT mediante FlowSOM.**

**a.** Árbol de expansión que representa el perfil de expresión de las ocho poblaciones principales y sus subpoblaciones identificadas en FlowSOM para los tres grupos de estudio. **b.** Proyección de tSNE de los clústeres de LT CD4/CD8 identificados por FLOW SOM y mapa de calor que muestra el perfil de expresión de cada marcador en los ocho clústeres identificados y su relación jerárquica, identificados en el archivo concatenado de las 30 muestras. **c.** Gráfica de cajas y bigotes que muestra el porcentaje de LT de cada grupo en cada uno de los clústeres identificados en FlowSOM. Controles (Azul oscuro), pacientes pre-quimioterapia (Marrón) y pacientes pos-quimioterapia (gris). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ ; (\*\*) $p < 0.01$ ; (\*) $p < 0.05$  ( $n=10$ ).

### 1.11.13 Expresión de $\beta$ -gal, p16, p21 en LT CD4+ y CD8.

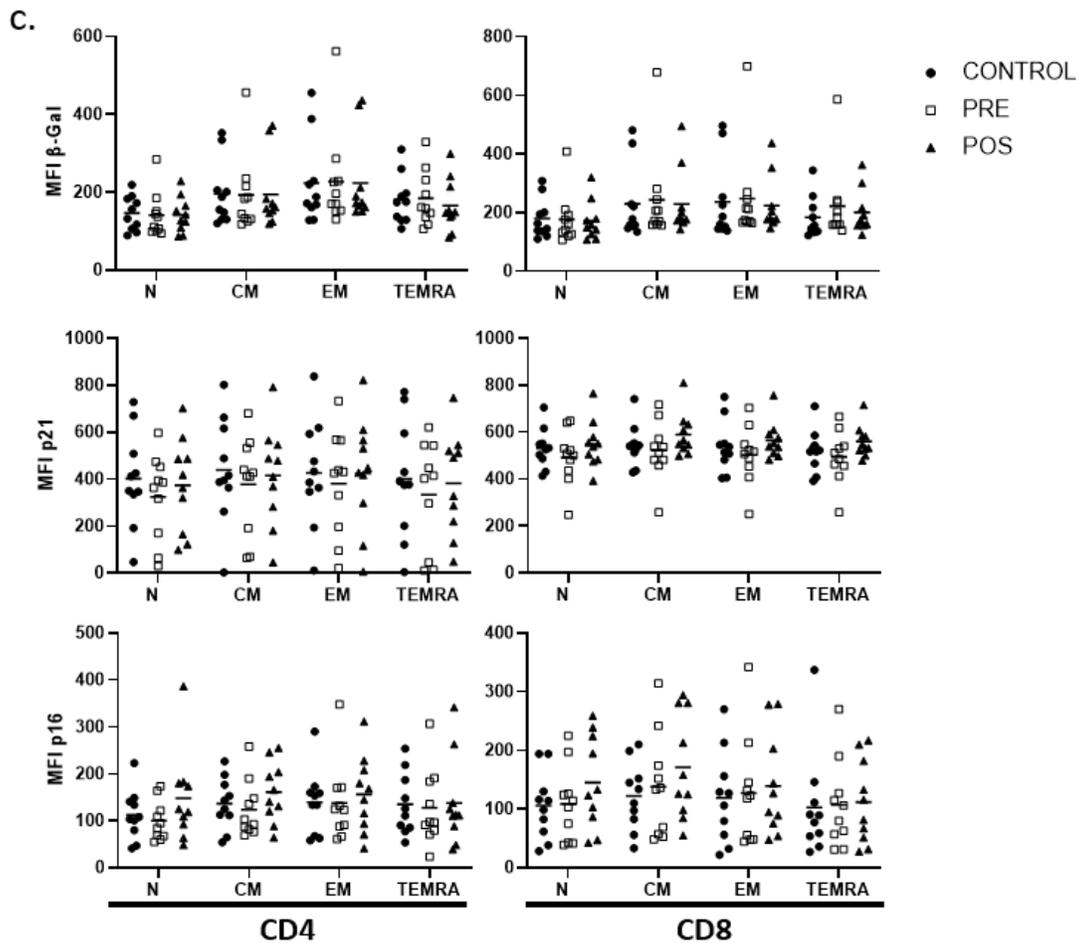
Diferentes reportes en la literatura han mostrado que la quimioterapia provoca un aumento en la expresión de marcadores moleculares asociados a la senescencia celular. En particular, Sanoff y cols. encontró que en LT periféricos de 33 pacientes con cáncer de mama después de la quimioterapia adyuvante la expresión de p16 aumentaba en un 75%, incremento que equivale de 10 a 15 años de envejecimiento cronológico (230). En línea con estos antecedentes, quisimos evaluar si la quimioterapia como agente citotóxico promueve el envejecimiento molecular de LT. Además de la medición de p16, evaluamos la expresión de p21 y la enzima  $\beta$ -galactosidasa cuya actividad también es considerada característica de células senescentes. En nuestra cohorte, encontramos que efectivamente en las pacientes con cáncer se evidencia una tendencia al incremento en la expresión de estos tres marcadores de envejecimiento (Figura 47b). Analizando las subpoblaciones de memoria CD27/CD45RA en LT CD4+ y LT CD8+ también se esbozó esta tendencia (Figura 48). Sin embargo, probablemente debido a la alta variabilidad de estas mediciones registradas por nosotros en las muestras de las donantes de los tres grupos no fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas en el grado de expresión de estos tres marcados en células de mujeres sanas y pacientes con cáncer tratadas o no con quimioterapia neoadyuvante (Figura 48).



**Figura 47. La quimioterapia puede inducir características de envejecimiento molecular en LT.**

a. Histogramas representativos de la expresión de características moleculares de envejecimiento celular  $\beta$ -gal, p16 y p21. Control (histograma gris), paciente pre-quimioterapia (histograma blanco) y paciente pos-

quimioterapia (histograma con línea punteada). **b.** Gráfica de barras que muestra la MFI promedio de  $\beta$ -gal, p21 y p16 en LT CD4+ y CD8. En los tres grupos de estudio control (Azul oscuro), pacientes pre-quimioterapia (Marrón) y pacientes pos-quimioterapia (Gris claro). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. (\*\**p*<0.001; \**p*<0.01; \**p*<0.05) (n=10/grupo).



**Figura 48. Características de envejecimiento celular en las subpoblaciones de memoria de LT.**  
 a. Gráfica de puntos de dispersión que muestra el MFI de  $\beta$ -gal, p21 y p16 en las subpoblaciones de memoria de LT CD4+ y CD8. Cada símbolo representa una donante: controles (círculos negros n=10), Pacientes pre-quimioterapia (cuadrados n=10) y pos-quimioterapia (triángulos negros n=10). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los controles y las pacientes. Una prueba *t* pareada no paramétrica *Wilcoxon test* para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. (\*\**p*<0.001; \**p*<0.01; \**p*<0.05).

## 1.12 Discusión

Algunos estudios sugieren que niveles elevados de estrés en etapas tempranas de la vida generan alteraciones en el sistema inmune tales como, el incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias y el desarrollo de senescencia temprana (231). Teniendo en cuenta que con el envejecimiento de la población a nivel mundial se ha incrementado la incidencia de distintos tipos de cáncer (202), se hace necesario comprender cómo los

cambios asociados con el envejecimiento influyen en la progresión de los tumores. Específicamente, la inflamación crónica de bajo grado (altos niveles circulantes de IL-6 y TNF $\alpha$ ) y la disminución de los procesos de inmunovigilancia, podrían estar dentro de las causas responsables del incremento en la susceptibilidad de los adultos mayores al cáncer (17). En este sentido, distintas alteraciones asociadas al desarrollo tumoral, tales como, la disminución en la expresión de HLA-DR, la generación de DCs tolerogénicas, las alteraciones metabólicas en los LT, la disminución de la proliferación celular y la mayor expresión de marcadores de agotamiento (PD1, TIM3 y LAG3) y senescencia (CD28 $^{-}$ , CD57 $^{+}$  y KLRG1 $^{+}$ ), hacen parte del listado de posibles candidatos a biomarcadores de inmunosenescencia (232).

En este capítulo se describe el fenotipo de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune en una muestra de pacientes con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia, la presencia de marcadores de inmunosenescencia y su asociación al desarrollo de cáncer y el efecto de la quimioterapia neoadyuvante en dicho fenotipo.

De las células de la inmunidad innata se analizaron los monocitos y las NKs. En primer lugar, se encontró un incremento de los monocitos circulantes después de la quimioterapia. Estas células se derivan de precursores mieloides provenientes de células madre hematopoyéticas (HSCs). Las HSCs se encuentran en un estado quiescente, son más resistentes al efecto citotóxico de la quimioterapia y tienen la capacidad de regenerar las poblaciones inmunes luego de una leucopenia inducida por toxas como la quimio o la radioterapia. Además, los monocitos tienen la posibilidad de recuperarse más fácilmente que las células de linaje linfóide, ya que, el proceso de maduración de estas últimas se ve afectado por la involución tímica (221). Es probable, que la leucopenia inducida por la quimioterapia estimule la producción de precursores mieloides y como consecuencia haya un incremento en el número de monocitos circulantes. Los monocitos se clasifican en tres subpoblaciones según la expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16. Los monocitos clásicos (CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$ ) comprenden el 80 al 95% de los monocitos circulantes. Estas células son efectivas fagocíticas y son importantes para la resolución de la inflamación. Los monocitos intermedios (CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ ) comprenden del 2 al 8% de los monocitos circulantes. Sus funciones incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), presentación de antígenos, participación en la proliferación y estimulación de los LT, respuestas inflamatorias y angiogénesis. Los monocitos no clásicos comprenden del 2 al 11% de los monocitos circulantes. Son móviles por naturaleza y patrullan el endotelio en busca de lesiones, son proinflamatorios y secretan citoquinas inflamatorias en

respuesta a la infección (233). Nuestros resultados muestran que las pacientes con cáncer pre-quimioterapia tienen un mayor porcentaje de monocitos intermedios en comparación con las pacientes pos-quimioterapia y las mujeres sanas. No se encontraron cambios significativos en las subpoblaciones de monocitos clásicos y no clásicos en las diferentes condiciones evaluadas. Los monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> son células proinflamatorias que producen altos niveles de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en respuesta a la estimulación con LPS, tienen menor actividad peroxidasa que las otras dos subpoblaciones de monocitos y expresan el receptor de quimioquinas CCR2 que le confiere la capacidad de quimiotaxis. El incremento de monocitos intermedios circulantes se ha asociado al desarrollo de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la enfermedad coronaria, la aterosclerosis y la enfermedad de Crohn (119). Incluso se ha propuesto el incremento de monocitos inflamatorios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> como un indicador útil para el diagnóstico temprano de cáncer de mama (222). Foulds y cols. encontraron que una muestra de pacientes con cáncer de mama en estadios 3 y 4 presentaba un fenotipo inmunosupresor caracterizado por el incremento en el porcentaje de monocitos proinflamatorios, de MDSCs y LT<sub>regs</sub> (234). Es probable, que el aumento de este tipo de células favorezca un ambiente proinflamatorio propicio para la progresión del cáncer. Algunos estudios han encontrado que los monocitos circulantes de pacientes con infecciones crónicas o cáncer presentan un fenotipo inmunosupresor caracterizado por la expresión a la baja de HLA-DR y al alta de PD-L1 (224, 232, 235). En nuestra investigación encontramos que los monocitos de las pacientes con cáncer (pre y post quimioterapia) muestran un aumento significativo en la expresión de PD-L1 (pero no de HLA-DR) comparado con las voluntarias sanas. Aunque la expresión de PD-L1 en células tumorales se ha utilizado como predictor de la respuesta al tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitarios en diferentes tipos de cáncer, pocos estudios han evaluado la expresión de este marcador en células infiltrantes de tumor como los monocitos y su repercusión en el curso de la enfermedad. Algunos estudios han encontrado, por ejemplo, que el porcentaje de monocitos PD-L1<sup>+</sup> circulantes se correlaciona con el mal pronóstico de pacientes con cáncer de mama o linfoma T/NK (224, 225). Estos estudios sugieren entonces, que la expresión de PD-L1 en monocitos puede ser un biomarcador clave para el pronóstico y la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer.

La inmunovigilancia hace referencia a los mecanismos celulares y moleculares existentes para el control del crecimiento tumoral y se caracteriza por presentar tres fases de

inmunoedición que determinan el destino del mismo, a saber: (i) fase de *eliminación*, donde la respuesta inmune innata y adaptativa son suficientes para erradicar las células tumorales; (ii) fase de *equilibrio*, caracterizada por la presión selectiva que ejerce el sistema inmune sobre el tumor y (iii) la fase de *escape*, donde las células tumorales resisten a la eliminación del sistema inmune, se replican y crecen fuera de control (199). Dentro de los mecanismos celulares de inmunovigilancia, las DCs son esenciales para el inicio, programación y regulación de la respuesta inmune específica contra el tumor (118). Con base en lo anterior, se ha propuesto que las DCs son una herramienta ideal que permite inducir la respuesta inmune necesaria para conseguir la erradicación del tumor.

El uso de DCs maduras derivadas de monocitos con fines de vacunación o para la expansión *in-vitro* de linfocitos T antígeno específicos es uno de los enfoques más utilizados en inmunoterapia (236). El grupo de I&MT ha realizado varios ensayos clínicos con vacunas basadas en DCs y aunque algunos estudios han mostrado que los métodos de purificación de monocitos no tienen efectos significativos en el resultado final (118) y los métodos de purificación de monocitos (enriquecimiento por adherencia Vs perlas magnéticas) no parece influir en la maduración de las DCs derivadas de ellos, la calidad de las células de partida quizás sí resulte ser un factor importante a ser tenido en cuenta en la eficacia terapéutica que se persigue con el uso de estas células en la inmunoterapia de distintos tipos cáncer. Si bien este resultado no permitió detectar una deficiencia selectiva para responder al estímulo proinflamatorio de DCs inmaduras derivadas de monocitos intermedios comparadas con las derivadas de monocitos clásicos en las pacientes prequimioterapia, vale la pena resaltar que el resultado de la Figura 32b sugiere que DCs derivadas de los monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (los cuales están aumentados de manera selectiva en las pacientes pre-quimioterapia (Figura 29b), en los tres grupos analizados, se caracterizan por una falta de respuesta medida en términos de la expresión del CD40 en respuesta al estímulo proinflamatorio (Figura 32b). En el presente estudio se encontró que las DCs derivadas de monocitos proinflamatorios tienen una menor expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD83. Esta alteración en el perfil de maduración de las DCs se revierte en las pacientes post-quimioterapia casi al nivel de las voluntarias sanas: este hallazgo refuerza la idea de que la quimioterapia tiene un papel restaurador de la respuesta inmune previamente propuesto por el grupo I&MT (19, 20). Esta recuperación coincide con una disminución en la frecuencia de monocitos proinflamatorios y de monocitos PD-L1<sup>+</sup> casi al mismo nivel observado en las mujeres sanas. Nuestros resultados sugieren que el fenotipo de los monocitos en las pacientes con

cáncer y en pacientes de edad avanzada (Capítulo 1: Marcadores de senescencia en células de los componentes del sistema inmune innato y adaptativo en ) podría afectar la capacidad de respuesta a la maduración de las DCs y consecuentemente su eficiencia en la activación inmune cuando se utilizan como herramienta de inmunoterapia.

Un segundo componente del sistema inmune innato analizado fueron las células NKs, estas células tienen un papel importante en la respuesta antitumoral controlando la progresión y las metástasis (217, 237); al punto que algunos estudios sugieren que el grado de infiltración por NKs en los tumores puede ser un predictor importante de la respuesta al tratamiento (quimio/radioterapia) (238). Si bien estas células expresan una variedad de receptores inhibitorios y activadores que están involucrados en el reconocimiento de las células diana y la actividad citotóxica (217), algunos estudios sugieren que los tumores pueden alterar la funcionalidad de las NKs mediante mecanismos intrínsecos que incluyen la disminución en la expresión de ligandos de receptores de reconocimiento y activación, la secreción de factores inhibitorios solubles y la resistencia a la apoptosis (239). Por otro lado, se ha reportado que la quimioterapia neoadyuvante puede afectar sus subpoblaciones celulares (CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>neg</sup>) (240). En este trabajo se evaluó mediante citometría de flujo multiparamétrica el porcentaje y el fenotipo de las subpoblaciones de células NK. Se encontró que las pacientes con cáncer de mama post quimioterapia presentan una disminución en el número total de células NKs respecto a las otras condiciones evaluadas. Nuestros resultados indican que este cambio es caracterizado principalmente por la disminución en la subpoblación CD56<sup>dim</sup> y el aumento de las células CD56<sup>bright</sup>. Adicionalmente encontramos que, las pacientes pre y post quimioterapia tienen un aumento significativo de la población CD56<sup>neg</sup> en comparación con las voluntarias sanas. CD56 es una molécula de adhesión que regula activamente la funcionalidad de las NKs, se acumula en la sinapsis inmunológica mejorando las interacciones con la célula diana que también expresa CD56 y media la transferencia de la granzima-B que induce la muerte celular en las células blanco por activación de la caspasa-3 (239). Esta molécula también se expresa normalmente en otros tejidos y durante el desarrollo embrionario, por ejemplo, el 80% del tejido mamario normal expresa CD56. No obstante, algunos tumores regulan a la baja la expresión de CD56 como posible mecanismo de escape de la inmunidad dependiente de NKs (239). Nuestros hallazgos sugieren que el incremento de estas células CD56<sup>neg</sup> en las pacientes con cáncer de mama quizás contribuya como mecanismo de escape de las células tumorales. Nuestra

investigación reveló además, que los adultos mayores presentan una reducción en la subpoblación CD56<sup>bright</sup> mientras que las células CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>neg</sup>CD16<sup>+</sup> se mantienen o aumentan; sugiriendo que con el envejecimiento se incrementa el porcentaje de NKs de larga vida (237). Estos resultados nos llevan a proponer que el aumento de la población CD56<sup>neg</sup> en las pacientes con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia esté asociado con procesos de senescencia temprana y que la quimioterapia puede inducir aún más estas poblaciones NKs senescentes.

No hay muchos estudios que describan el efecto que tiene el cáncer o la quimioterapia neoadyuvante en la expresión de los receptores de las células NK. Concordante con la literatura, encontramos que las células NK de las pacientes con cáncer de mama post quimioterapia disminuyen la expresión de CD57, KLRG1 y NKG2D; condición que puede afectar su actividad antitumoral (217, 241). Por ejemplo, las funciones efectoras activadas por el receptor NKG2D dependen del reconocimiento de los ligandos MIC sobre las células blanco; no obstante, algunos estudios han descrito que el incremento de los niveles séricos de proteínas MIC solubles en pacientes con cáncer regula a la baja la expresión de este receptor afectando la funcionalidad de las NKs. Más aún, se ha reportado que la disminución en la actividad citotóxica de estas células se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer y se han asociado los altos niveles séricos de proteínas MIC solubles con un pronóstico clínico desfavorable en este tipo de pacientes. Diversos estudios han confirmado que las células NK son esenciales para el control del cáncer; no obstante, también se conoce que tanto el microambiente tumoral como la quimioterapia impactan negativamente en la capacidad efectora de estas células, condición que contribuye a la progresión del cáncer. Foulds y cols. describen, por ejemplo, que las células NK de un grupo de pacientes con cáncer de mama, mostraron una disminución significativa en la expresión de los receptores de activación NKp30, NKp46 y 2B4 y en el receptor de inhibición NKG2A después del primer ciclo de neoadyuvancia con A/C (234). El análisis no supervisado de reducción de dimensionalidad (t-SNE) y el agrupamiento de clúster (FlowSOM) permitieron identificar dos poblaciones de interés, una CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>+</sup> y otra con fenotipo CD56<sup>bright</sup>NKG2D<sup>+</sup>. CD57 es una glicoproteína que tiene una expresión variable en las células NK CD56<sup>dim</sup> en los adultos, incrementa de manera lineal con la edad y se ha asociado con infecciones crónicas como CMV. A pesar de que las NKs CD57<sup>+</sup> exhiben actividad lítica, su capacidad de infiltración tumoral, proliferación, supervivencia en el nicho tumoral y respuesta a la estimulación con citoquinas se encuentra disminuida (238). El bajo número de esta subpoblación de células poco eficientes en la respuesta antitumoral

encontrado en la muestra de las pacientes analizadas podría ser un factor de buen pronóstico. El clúster CD56<sup>bright</sup>NKG2D<sup>+</sup> se encontró aumentado únicamente en las muestras de las pacientes post quimioterapia. Las CD56<sup>bright</sup> son células inmaduras con alta capacidad proliferativa y de producción de citoquinas (237). La expresión simultánea del receptor NKG2D sugiere un fenotipo activado, con un papel regulador inmunitario en las pacientes con cáncer de mama. Estos resultados se deben tomar con precaución, ya que otros estudios han encontrado que el incremento de células NK CD56<sup>bright</sup> CD11a<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> circulantes en pacientes con melanoma avanzado se correlaciona con una pobre supervivencia a largo plazo. Se hacen necesarios más estudios para profundizar en el papel de las NKs y su potencial como biomarcadores de la respuesta a la terapia en cáncer.

Las pacientes con cáncer de mama exhiben varios defectos en la inmunidad antitumoral tales como, alteraciones en la maduración de las DCs, el aumento de las poblaciones de LTreg y MDSCs, el deterioro en la funciones citotóxicas de NKs y la disfunción de los LT (217). Teniendo en cuenta que estos defectos también se han asociado al envejecimiento del sistema inmune, la dicotomía de si los tumores son los responsables de los estados de inmunosupresión e inmunosenescencia; o si, por el contrario, la progresión del cáncer es consecuencia del envejecimiento del sistema inmune, aún no ha sido resuelta.

Como se mencionó anteriormente, en un trabajo publicado por nuestro grupo se reportó que las pacientes con cáncer de mama exhiben una supresión general de los compartimentos de LT y APC, que revierte con la quimioterapia neoadyuvante correlacionándose con una mejor respuesta clínica (20). En este trabajo utilizamos un modelo similar para monitorear la respuesta de LT a la estimulación *in vitro* con perlas anti-CD3/CD28/CD2. Al evaluar la expresión de CD3 (MFI) como medida de la internalización del TCR en respuesta a la estimulación, se encontró que los LT de las pacientes con cáncer de mama presentan una disminución significativa de respuesta a la estimulación *in-vitro*, la cual se recupera post quimioterapia casi al mismo nivel que el grupo control (20). No se encontraron cambios significativos que permitan correlacionar la internalización del TCR con la carga tumoral residual, lo cual puede explicarse por el tamaño muestral de este estudio. Sí se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD83 en DCs maduras derivadas de monocitos entre los grupos evaluados y la carga tumoral residual; lo que concuerda con lo reportado por Bernal y cols (20). Estos datos sugieren que CD83

puede ser un marcador más sensible para estudiar la recuperación de la vigilancia inmunológica y predecir la respuesta tumoral a la quimioterapia A/C.

Estudios sobre la inmunosenescencia han descrito que la disminución en la respuesta del TCR a la estimulación, principalmente en LT terminalmente diferenciados, es consecuencia de alteraciones en la expresión y/o en la fosforilación de moléculas de la vía de señalización como CD3 $\zeta$  y ZAP70 o de la participación de receptores inhibitorios como CTLA4 (58, 242, 243). Teniendo en cuenta que los LT de las pacientes con cáncer de mama evaluadas exhiben una menor respuesta del TCR a la estimulación, analizamos la fosforilación de ZAP70 en las subpoblaciones de memoria de LT CD8+ después de un estímulo *in vitro* con perlas. Si bien no encontramos diferencias significativas entre las pacientes y las mujeres sanas, es importante resaltar que la fosforilación de ZAP70 disminuye significativamente entre las subpoblaciones de memoria a medida que las células se diferencian. Este hallazgo sólo fue significativo entre los LT vírgenes y los efectores de las pacientes con cáncer. Lo anterior indica la necesidad de realizar más estudios que permitan esclarecer por qué los LT de los pacientes con cáncer de mama tienen una menor respuesta a la estimulación y cómo la senescencia y el agotamiento influyen en su capacidad de activación.

Teniendo en cuenta que la disminución en la capacidad proliferativa de las células T es una característica clave de la senescencia y del agotamiento (57, 206), en este trabajo se determinó la expresión de Ki67 en las subpoblaciones de memoria de LT CD8+ después de la estimulación con perlas como una medida de su capacidad de proliferación. Encontramos que los LT efectores terminales de las mujeres sanas como de las pacientes con cáncer tienen una menor capacidad proliferativa en respuesta a la estimulación en comparación con las subpoblaciones menos diferenciadas. Así mismo se evidenció, que los LT de memoria central de las pacientes con cáncer tienen una actividad proliferativa menor que el grupo control. Se ha reportado que la disminución en la capacidad proliferativa de los LT puede estar controlada simultáneamente por vías de señalización de inmunosenescencia y agotamiento. Henson y cols describen, por ejemplo, que inhibiendo la expresión de PD1 (agotamiento) o p38 MAPK (senescencia) en los LT, se puede recuperar la capacidad proliferativa de estas células (57). En conclusión, las distintas subpoblaciones de memoria de los LT de las pacientes evaluadas se caracterizan por presentar un fenotipo agotado con una marcada disminución de su capacidad de proliferación.

La expresión de CD27 y CD28 se pierde secuencialmente a medida que los LT se diferencian de vírgenes a efectores terminales (58). En línea con la evaluación funcional de LT, se midió la expresión de IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  después de la estimulación *in vitro* con perlas. Los LT intermedios y terminales muestran un perfil funcional similar en las pacientes con cáncer y en los controles. Es interesante anotar que los LT CD8+ vírgenes aislados de las pacientes con cáncer son más polifuncionales que los LT vírgenes de las mujeres sanas. Este hallazgo debe tomarse con cautela ya que sugiere que los LT de las pacientes podría no ser una población verdaderamente virgen (57, 221). Aunque ha sido reportado en la literatura que los LT de las pacientes que tienen un fenotipo de agotamiento celular que se caracteriza por la disminución de su capacidad citotóxica y una menor producción de citoquinas como IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (210), no se observan diferencias significativas en la expresión de citoquinas en respuesta a la estimulación *in vitro* cuando se comparan las pacientes con las mujeres sanas en nuestra muestra. Es probable que los LT de las pacientes estén transitando de un fenotipo agotado a uno senescente, puesto que los LT senescentes pueden producir citoquinas en respuesta a la estimulación.

El agotamiento y la senescencia de los LT son estados disfuncionales que difieren fenotípica y funcionalmente de los estados efectores y de memoria (210). Utilizando un panel de anticuerpos multicolor se determinó mediante citometría de flujo la distribución de las subpoblaciones de LT y la expresión o no de marcadores de agotamiento y/o senescencia en las muestras de las pacientes con cáncer de mama. En primer lugar, encontramos que las pacientes pos-quimioterapia tienen un porcentaje menor de LT CD4+ vírgenes y un porcentaje mayor de linfocitos T CD8+ vírgenes que las mujeres sanas. Este hallazgo es particular, debido a que se ha reportado que la homeostasis de LT CD8 es más vulnerable a estresores como el envejecimiento y el efecto citotóxico de la quimioterapia (67, 78). La regeneración de la subpoblación virgen ocurre a través de diferentes mecanismos como: (i) la producción tímica, (ii) la proliferación homeostática y (iii) la infiltración de la población virgen con células de memoria que tienden a readquirir el fenotipo *naïve* (*stem-like memory cells*) (221). Gustafson y cols. encontraron que la quimioterapia induce una recuperación a niveles normales de los LT CD8+ vírgenes e incrementa la expansión de las células *stem-like memory* (CD95<sup>+</sup>): en tanto que, el compartimento CD4+ virgen tiene una regeneración limitada (221). En línea con lo anterior, otros estudios han reportado, además, que la tasa de reconstitución de los LT vírgenes después de la quimioterapia es mayor que la de los LT de memoria (244). Los hallazgos

en nuestra muestra coinciden con los resultados de Gustafson, especialmente por la polifuncionalidad observada en los LT vírgenes de las pacientes, que podría corresponder en realidad a una repoblación por parte de LT<sub>scm</sub>.

Aunque los LT agotados y senescentes comparten características disfuncionales similares en la inmunidad antitumoral, su comportamiento difiere en términos de generación, desarrollo y regulación metabólica durante la progresión del tumor (210). Cuando evaluamos la expresión de marcadores de agotamiento (CTLA4, LAG3, PD1 Y TIM3), encontramos que todas las subpoblaciones de memoria de los LT CD4+ y CD8+ de las pacientes con cáncer de mama exhiben un incremento significativo de estos marcadores. Mediante análisis de reducción de multidimensionalidad y agrupamiento de clúster se confirmaron algunos de los hallazgos del análisis manual. El clúster que se presenta con mayor frecuencia es CD4+ de memoria central que está aumentado en las pacientes con cáncer de mama y tiende a disminuir después de la quimioterapia. También se identificó un clúster CD8+ virgen con expresión de TIM3 y LAG3 que está aumentado en las pacientes y se incrementa después de la quimioterapia. Aunque algunos estudios han reportado que el agotamiento afecta principalmente los LT CM y EM (70), nuestros hallazgos sugieren que las alteraciones funcionales descritas anteriormente podrían explicar el agotamiento observado en todas las subpoblaciones de memoria analizadas. Se ha reportado que los LT agotados se acumulan en los pacientes con infecciones crónicas y/o diferentes tipos de cáncer (205). Al parecer la exposición prolongada de los LT a su antígeno cognato inducen señales de activación permanente del TCR que incrementa sostenidamente la expresión de receptores inhibitorios (245). La principal característica fenotípica de los LT agotados es la alta expresión de receptores inhibitorios como PD1, CTLA4, TIM3 y LAG3. BTLA, TIGIT, 2B4 y CD160 también han sido descritos como marcadores de agotamiento celular., Estas células pierden la jerarquía de sus funciones efectoras, proliferan menos en respuesta a la estimulación y presentan varios cambios metabólicos y transcripcionales (70, 210, 245, 246). La fracción de LT que simultáneamente expresan estos receptores inhibitorios aumenta durante el proceso de disfunción (245). PD1 y CTLA4 han sido los receptores inhibitorios más estudiados. PD1 bloquea la activación del TCR inhibiendo la fosforilación de ZAP70 y Lck; inhibe, además, la vía PI3K/AKT/mTOR que es esencial en la reprogramación metabólica y disminuye la proliferación y la producción de citoquinas efectoras como IL-2, IFN y TNF (210, 212). Los distintos marcadores asociados al agotamiento celular han permitido describir distintos fenotipos funcionales de LT agotados como los LT progenitores agotados (T-

$\text{bet}^{\text{high}}\text{Eomes}^{\text{low}}\text{PD1}^{\text{int}}$ ) y los LT agotados terminales ( $\text{T-bet}^{\text{low}}\text{Eomes}^{\text{high}}\text{PD1}^{\text{high}}$ ) que difieren en sus programas transcripcionales (210, 247). Es probable que esta heterogeneidad esté relacionada con la variabilidad de la respuesta a la terapia anti-checkpoint (210). CTLA4 se une a moléculas co-estimuladoras como CD80/86 y activa la fosfatasa PP2A que inhibe directamente la señalización de Akt/mTOR generando la detención del ciclo celular en los LT (210). El bloqueo combinado de receptores inhibitorios como la coadministración de anticuerpos anti-PD1/PD-L1 y anti-CTLA4, ha sido probado para revertir el agotamiento de LT y mejorar las respuestas inmunes en varios tipos de cáncer (248). A diferencia de estos dos receptores, las vías de señalización intracelular de TIM3 y LAG3 no han sido completamente dilucidadas. TIM3 tiene el potencial de interactuar con múltiples componentes del complejo de señalización intracelular del TCR y el nivel de afectación de las funciones celulares depende de ese ligando de unión (246). LAG3 se asocia con el CD3 e inhibe la proliferación, la producción de citoquinas y el flujo de calcio (246). Algunos estudios han encontrado correlación entre la respuesta clínica desfavorable al tratamiento antitumoral y la presencia de LT agotados infiltrantes de tumor (249). Aunque no hay reportes claros del valor pronóstico de la presencia de LT agotados circulantes, sí es claro que encontrar una firma inmune en sangre periférica medible por citometría de flujo podría facilitar la selección de pacientes candidatos a recibir cierto tipo de tratamiento (249).

El aumento en la frecuencia de LT agotados se ha asociado a un mal pronóstico en varios tipos de cáncer; de ahí la importancia de intervenciones de inmunoterapia que reestablezcan la función de los LT (250). En este trabajo se hace plausible el efecto de la quimioterapia neoadyuvante como pilar fundamental del tratamiento del cáncer de mama, ya que en los pacientes sometidos a ella se observó una disminución en la frecuencia de LT agotados circulantes comparable al de las voluntarias sanas. Esto es concordante con lo reportado por Massa y cols. quienes encontraron una diferencia significativa en la expresión de PD1 en los respondedores frente a los no respondedores, después de dos ciclos de quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer triple negativo (TNBC) (218). No obstante, en otro estudio realizado en pacientes con leucemia linfocítica crónica se evidenció que la quimioterapia incrementa la frecuencia de LT agotados, sugiriendo que este enfoque de tratamiento podría obstaculizar la vigilancia inmunológica en este tipo de tumor (251). Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que sugieren que la activación del sistema inmune está relacionada con una mejor respuesta clínica del tumor a la terapia neoadyuvante.

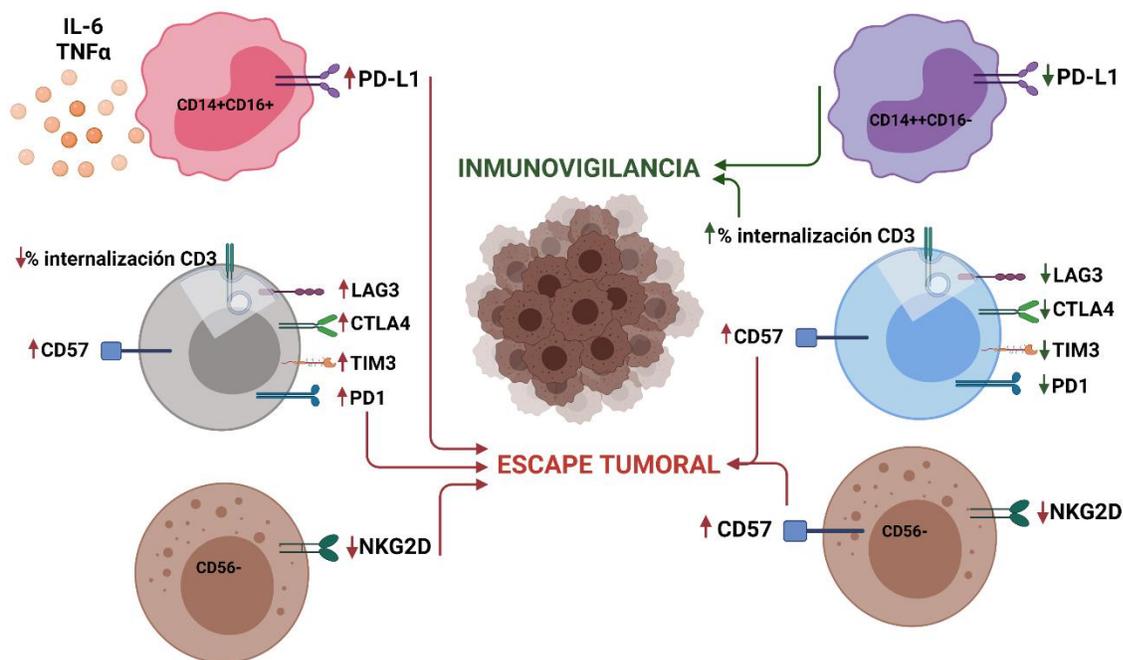
La senescencia de los LT se ha descrito como un mecanismo de evasión tumoral a la respuesta inmune (210, 252). Estos LT senescentes se caracterizan por: (i) una disminución en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD27 y CD28, (ii) la expresión de CD57 y KLRG1 y (iii) la regulación al alza de la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -Gal) (32, 210, 253). A diferencia de los LT agotados, los LT senescentes son metabólicamente activos y pueden secretar un amplio rango de citoquinas como IL-2, IL-6, IL-8, TNF, IFN $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$  (57, 70). No obstante, al igual que los LT agotados, las células senescentes tampoco pueden proliferar, regulan a la baja moléculas claves de la señalización celular como Lck y LAT e incrementan la expresión de NKR y de moléculas de arresto del ciclo celular como p16 y p21 (58, 59, 91, 254). En este trabajo se evidenció por citometría de flujo una mayor expresión del marcador CD57 en los LT CD4+ de las pacientes con cáncer de mama y un incremento no significativo de la expresión de KLRG1 en los LT CD8+. Ambos grupos celulares presentaron un incremento no significativo de  $\beta$ -Gal, p21 y p16. Posteriormente se realizó un análisis de reducción de multidimensionalidad y agrupamiento de clúster que permitió identificar poblaciones con fenotipo senescente en las poblaciones de ME de los LT CD4+ y en las células N y ME de los LT CD8+ de las pacientes con cáncer de mama pre-quimioterapia. Las subpoblaciones CD4+ senescentes disminuyen con la quimioterapia, mientras que las CD8+ aumentan. Ha sido descrito que las células tumorales pueden inducir respuestas al daño del ADN en los LT, dando como resultado la detención del ciclo celular y senescencia celular (254). Incluso hay estudios que sugieren que un envejecimiento prematuro puede inducir el desarrollo del cáncer de mama. En un estudio realizado por Trintinaglia y cols. mostraron que mujeres con antecedente de maltrato infantil tenían LT con características senescentes que podían estar induciendo el desarrollo del cáncer (231). Independientemente del mecanismo que induce la senescencia, el incremento de LT senescentes es crítico para la disminución de la inmunovigilancia, el desarrollo de tumores y su progresión (17, 254). La capacidad de las células tumorales de inducir agotamiento y senescencia en LT favorece el escape tumoral y la progresión. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que la fosfatasa SHP2 reclutada por PD1 prefiere el receptor co-estimulador CD28 para la desfosforilación, lo que sugiere que CD28 es necesario para una eficaz respuesta del tratamiento anti-PD1 en cáncer (255, 256). La acumulación de LT CD28<sup>-</sup> senescentes en pacientes con cáncer puede ir en detrimento de la terapia anti-checkpoint. El mejor conocimiento de los mecanismos responsables de la inducción de

senescencia y agotamiento en las pacientes con cáncer es necesario para el desarrollo de estrategias personalizadas para el tratamiento y el control de la enfermedad.

Para finalizar, algunos estudios han reportado que la quimioterapia neoadyuvante puede acelerar el envejecimiento y activar mecanismos de senescencia celular (230). Concordante con lo reportado por Onyema y cols, en nuestro estudio se observó que, las pacientes post-quimioterapia presentan un incremento en la expresión de marcadores de inmunosenescencia como CD57 en LT CD4+ y KLRG1 en LT CD8, principalmente en las subpoblaciones de memoria terminalmente diferenciadas (LT efectores) (257). Una explicación alternativa a la inducción de senescencia celular es el efecto citotóxico de la quimioterapia sobre las subpoblaciones de linfocitos con alta capacidad replicativa (vírgenes y de memoria central), que deriva en un incremento de las subpoblaciones con menor tasa proliferativa como los LT de ME y E (257). En consonancia con algunos estudios, el análisis por FlowSOM identificó subpoblaciones de LT CD8+ senescentes (N y ME) que están aumentados en las pacientes con cáncer de mama y que se incrementan después de la quimioterapia. Bruni y cols, reportaron un incremento de LT  $\gamma\delta$  TEMRA senescentes (CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) con alteraciones funcionales después de la quimioterapia en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (258). De igual manera, las investigaciones de Sanoff y cols. encontraron que los LT de los pacientes con cáncer de mama expuestos a quimioterapia neoadyuvante con doxorubicina y ciclofosfamida tienen un incremento en la expresión de marcadores de senescencia celular como p16 y secretan citoquinas asociadas a senescencia como VEGFA y MCP1 (230). La exposición a quimioterapia no se ha relacionado con acortamiento de la longitud de los telómeros en LT (*hallmark* del envejecimiento) al contrario parece que su efecto sobre el envejecimiento celular se da a través de la inducción de daño al ADN y senescencia celular (259). Nuestros hallazgos coinciden con otros estudios que señalan hacia el incremento de la senescencia del sistema inmune en las pacientes con cáncer de mama como una consecuencia de la citotoxicidad inducida por la terapia neoadyuvante. No obstante, el beneficio de la quimioterapia como estrategia exitosa para la erradicación del cáncer sigue siendo mayor al riesgo de incrementar el envejecimiento celular (230, 260).

En resumen, este estudio ha mostrado que las subpoblaciones celulares (monocitos, NKs y linfocitos) de pacientes con cáncer de mama evaluadas exhiben un fenotipo inmunosupresor (agotamiento y senescencia) que revierte con el uso de la quimioterapia neoadyuvante y que favorece el control de la progresión tumoral. No obstante, la

quimioterapia también impacta negativamente los LT y las células NK, induciendo la transición a fenotipos senescentes. Es posible además que la quimioterapia en sí misma no sea responsable del daño del ADN de las células del sistema inmune; sino que éste, sea una estrategia del microambiente tumoral para escapar a los mecanismos de inmunovigilancia. La inmunosenescencia en pacientes sobrevivientes al cáncer es un campo de estudio que debe considerarse dentro de las perspectivas de la investigación necesaria para la innovación en nuevos tratamientos y como insumo importante para el diseño de nuevas estrategias de tratamiento derivadas de la medicina de precisión importante para la medicina personalizada en cáncer y otras enfermedades.



**Figura 49. Modelo de senescencia en mujeres con cáncer de mama.**

Las mujeres con cáncer de mama exhiben alteraciones en el fenotipo celular como aumento de la subpoblación de monocitos intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) que expresan al alta PD-L1. Un aumento de la subpoblación NK CD56<sup>neg</sup> con expresión a la baja del receptor de activación NKG2D. Y un fenotipo agotado (expresión al alta de LAG3, CTLA4, TIM3 y PD1) en LT con alteración en la internalización del CD3 y expresión de un marcador de senescencia como CD57. Después de la quimioterapia se da un efecto inmunomodulador, los monocitos inflamatorios retornan a nivel de los controles sanos y disminuye la expresión de PD-L1. En los LT baja la expresión de los marcadores de agotamiento y se recupera la capacidad de internalización del CD3. No obstante, aumenta la expresión de CD57 en LT y NKs sugiriendo un efecto senescente de la quimioterapia.

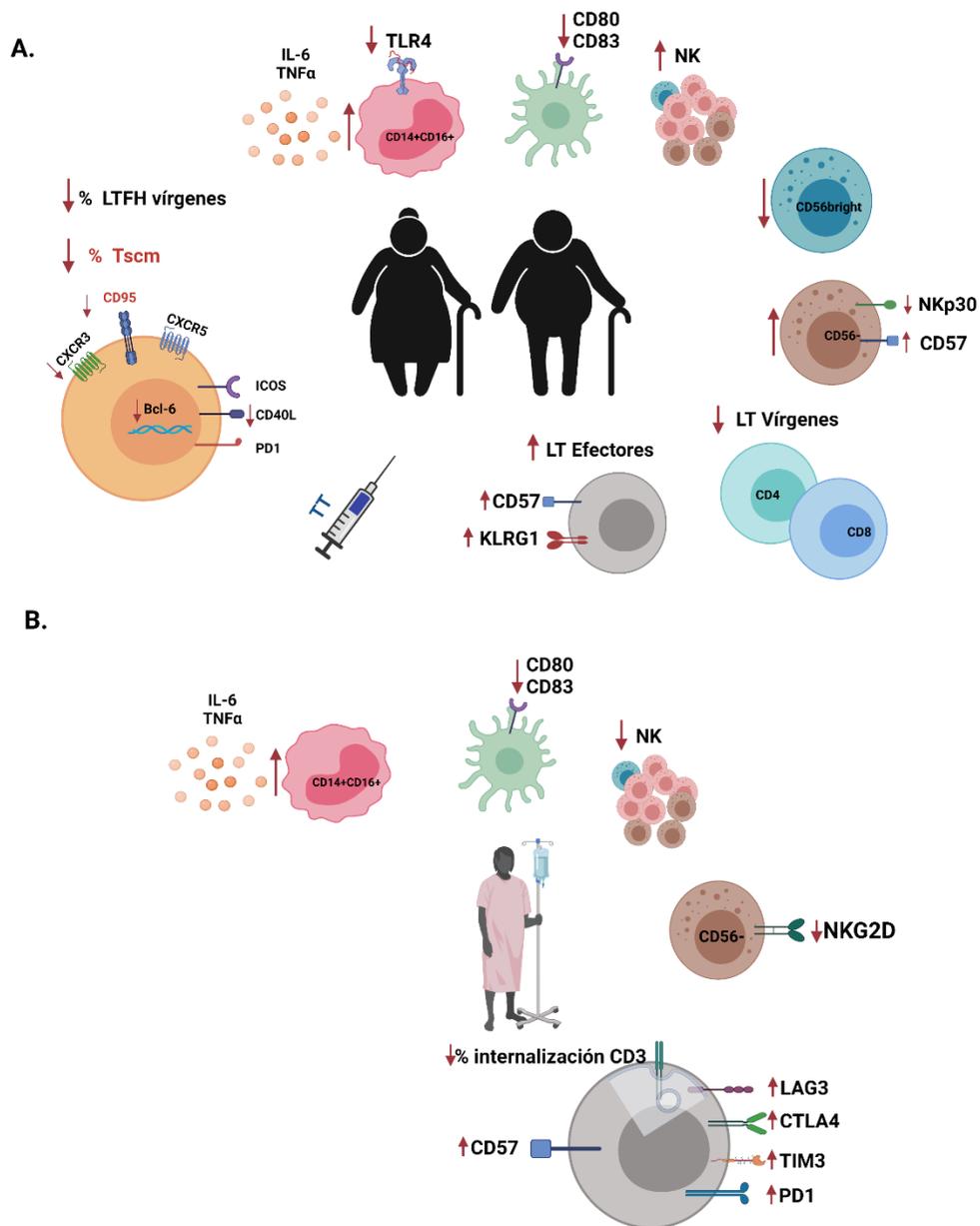
# Conclusiones y perspectivas

## 1.13 Conclusiones

- En la muestra de nuestra población encontramos cambios asociados con senescencia en células de los componentes del sistema inmune innato (monocitos y NKs) y adaptativo (LT) en personas sanas mayores de 60 años como: (i) Cambios en las subpoblaciones de monocitos, especialmente un incremento de monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Menor respuesta de los monocitos y de células dendríticas inmaduras al estímulo *in vitro* con LPS o con un coctel de citoquinas para inducir maduración *in vitro*, respectivamente. (ii) cambios en las principales subpoblaciones de NKs, especialmente una expansión de células CD56<sup>neg</sup> e incremento de la expresión de CD57 que pueden contribuir a la disfunción inmune de estas células durante el envejecimiento y (iii) disminución de los LT vírgenes CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, aumento de LT CD8<sup>+</sup> efectores y expresión de marcadores de senescencia CD57 y KLRG1. Estos cambios encontrados en los adultos mayores coinciden con lo reportado en la literatura; el envejecimiento puede estar afectando la capacidad de respuesta del sistema inmune, incrementando el riesgo de autoinmunidad y la susceptibilidad a las infecciones, enfermedades crónicas degenerativas y el cáncer.
- Los hombres exhiben un aumento en el porcentaje de monocitos inflamatorios y menor porcentaje de NKs CD56<sup>bright</sup> y LT vírgenes, cuando se comparan con las mujeres. Estas diferencias pueden explicar la mayor incidencia de enfermedades crónicas inflamatorias como la aterosclerosis en los hombres.
- Los adultos mayores tienen una menor frecuencia de LT CD4<sup>+</sup> vírgenes, una menor expansión de LTfh después de la vacunación con TT que los jóvenes. Adicionalmente, estos LTfh de las personas de edad avanzada tienen una menor expresión de Bcl-6, CXCR3 y CD40L, moléculas importantes para la diferenciación

de LTfh y su interacción en los CG con LB. Estos hallazgos pueden explicar en parte la pobre respuesta a la vacuna observada en los adultos mayores.

- Las pacientes con cáncer de mama exhiben cambios en el número y fenotipo de diferentes poblaciones de leucocitos que pueden estar afectando su capacidad de inmunovigilancia como: (i) Aumento de los monocitos proinflamatorios con expresión de PD-L1, (ii) disminución de la capacidad de los monocitos de responder al coctel porinflamatorio para madurar DCs (iii) disminución en la frecuencia de NKs circulantes e incremento de poblaciones maduras con expresión de CD57, (iv) alteración funcional y fenotípica de LT CD4+ y CD8 que exhiben menor capacidad de responder a la estimulación *in vitro* y expresan marcadores de agotamiento y senescencia. Estas alteraciones funcionales pueden ser consecuencia mecanismos de escape del tumor que favorecen la progresión tumoral.
- Adicionalmente, después de la quimioterapia, las pacientes exhiben cambios dinámicos como la mejor capacidad de respuesta al estímulo de maduración en monocitos y capacidad de internalización del CD3 en LT, que pueden estar favoreciendo la reactivación de la inmunovigilancia del tumor. No obstante, la quimioterapia puede incrementar la inducción de senescencia en células NKs y LT.



**Figura 50. Resumen de los cambios asociados a la edad y al cáncer de mama.**

**A.** Principales cambios evidenciados en los adultos mayores en las diferentes poblaciones celulares analizadas. **B.** Principales cambios encontrados en las mujeres con cáncer de mama. El aumento de monocitos proinflamatorios y de las NKs CD56<sup>neg</sup> son características compartidas entre los adultos mayores y las pacientes con cáncer de mama.

## 1.14 Perspectivas

Las conclusiones obtenidas en este trabajo plantean nuevas preguntas de investigación para la comprensión de la inmunosenescencia y su influencia en la etiología de enfermedades crónicas asociadas con el envejecimiento.

- En primer lugar, se propone realizar ensayos funcionales que permitan explicar los cambios observados en la frecuencia y fenotipo de las células NKs y los LT y su influencia en la inmunosenescencia.
- Evaluar cambios metabólicos en células del sistema inmune innato y adaptativo en diferentes condiciones de salud y enfermedad. El inmunometabolismo es un área de investigación reciente de la inmunología y en Colombia no hay muchos laboratorios que cuenten con la capacidad técnico-científica para llevar a cabo este tipo de investigación. Por lo que es todo un reto implementar protocolos y las técnicas de laboratorio necesarios para evaluar el inmunometabolismo en el contexto de la inmunosenescencia.
- Previamente, contamos con los convenios y la aprobación por comité de ética para desarrollar dos proyectos de estudio de la inmunosenescencia en el contexto de la Fibrosis pulmonar idiopática (Fundación Neumológica Colombiana, acta No.243 de 2019) y la sepsis (Hospital Universitario Nacional de Colombia acta No. 011-164-18 de 2018 y Hospital Santa Clara E.S.E acta No. 04 de diciembre 2019). Sin embargo, por la pandemia estos proyectos están suspendidos.
- El objetivo de cáncer hace parte de un proyecto titulado “Estudio del agotamiento y senescencia de células del sistema inmune, y su correlación con el antecedente de maltrato infantil, en pacientes con cáncer de mama en quimioterapia neoadyuvante” aprobado en el Instituto Nacional de Cancerología acta No 043 de 2018, con el cual se va a ampliar el tamaño de la muestra del objetivo 3.

# Bibliografía

1. Colombia MdSyPSd. Envejecimiento y Vejez 2021 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/proteccionsocial/promocion-social/Paginas/envejecimiento-vejez.aspx>].
2. Thomas-Crusells J, McElhane J, Aguado MT. Report of the ad-hoc consultation on aging and immunization for a future WHO research agenda on life-course immunization. *Vaccine*. 2012;30(42):6007-12.
3. Minsalud. Envejecimiento-demografico-Colombia-1951-2020.pdf 2013 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/PS/Envejecimiento-demografico-Colombia-1951-2020.pdf>].
4. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat Immunol*. 2018;19(1):10-9.
5. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):57-62.
6. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol*. 2013;14(5):428-36.
7. Swain SL, Blomberg BB. Immune senescence: new insights into defects but continued mystery of root causes. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):495-7.
8. Bueno V, Sant'Anna OA, Lord JM. Ageing and myeloid-derived suppressor cells: possible involvement in immunosenescence and age-related disease. *Age (Dordr)*. 2014;36(6):9729.
9. Boraschi D, Italiani P. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly: strategies for improving response. *Immunol Lett*. 2014;162(1 Pt B):346-53.
10. Ventura MT, Casciaro M, Gangemi S, Buquicchio R. Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clin Mol Allergy*. 2017;15:21.
11. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005;120(4):513-22.
12. Minsalud. Información vacunas y programas de vacunación Ministerio de Salud Colombia 2018 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/Vacunacion/Paginas/pai.aspx>].
13. Pereira BX, XN. Akbar, AN. Targeting Inflammation and Immunosenescence to Improve Vaccine Responses in the Elderly. *Frontiers in immunology*. 2020;11.
14. Lalinde N. Evaluación del componente T Folicular Helper en adultos mayores en respuesta a la vacuna antitetánica. Bogotá: Datos no publicados; 2017.
15. Alvarez-Fernandez C, Escriba-Garcia L, Vidal S, Sierra J, Briones J. A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy. *J Transl Med*. 2016;14(1):214.
16. Gomez A. PAHO WHO | Cancer in the Americas, country profiles 2013. 2013.
17. de Magalhaes JP. How ageing processes influence cancer. *Nat Rev Cancer*. 13. England2013. p. 357-65.
18. Morales Álvarez A, Parra-López CA. Inmuno-monitoreo del componente de células presentadoras de antígeno (APC) y células T en distintos estadios del desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal [NonPeerReviewed]: Universidad Nacional de Colombia; 2016.
19. Bernal-Estevez D, Sanchez R, Tejada RE, Parra-Lopez C. Chemotherapy and radiation therapy elicit tumor specific T cell responses in a breast cancer patient. *BMC Cancer*. 2016;16:591.
20. Bernal-Estevez DA, Garcia O, Sanchez R, Parra-Lopez CA. Monitoring the responsiveness of T and antigen presenting cell compartments in breast cancer patients is useful to predict clinical tumor response to neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2018;18(1):77.
21. Falci C, Gianesin K, Sergi G, Giunco S, De Ronch I, Valpione S, et al. Immune senescence and cancer in elderly patients: results from an exploratory study. *Exp Gerontol*. 2013;48(12):1436-42.

22. Villaseñor Keever MA. Diseños metodológicos para la investigación en el área de la salud. Metodología de la investigación para el área de la salud. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana editores; 2013. p. 47-62.
23. Tarazona R, Campos C, Pera A, Sanchez-Correa B, Solana R. Flow Cytometry Analysis of NK Cell Phenotype and Function in Aging. *Methods Mol Biol.* 2015;1343:9-18.
24. OMS. Envejecimiento y salud 2018 [Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/envejecimiento-y-salud>].
25. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell.* 2005;120(4):437-47.
26. Effros RB. Replicative senescence in the immune system: impact of the Hayflick limit on T-cell function in the elderly. *Am J Hum Genet.* 1998;62(5):1003-7.
27. Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(9):699-706.
28. Franceschi C, Salvioli S, Garagnani P, de Eguileor M, Monti D, Capri M. Immunobiography and the Heterogeneity of Immune Responses in the Elderly: A Focus on Inflammaging and Trained Immunity. *Front Immunol.* 2017;8:982.
29. Franceschi CG, P. Morsiani, C. Conte, M. Santoro, A. Grignolio, A. Monti, D. Capri, M. Salvioli, S. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Frontiers in medicine.* 2018;5.
30. Pereira BI, Akbar AN. Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging. *Front Immunol.* 2016;7:445.
31. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol.* 2012;24(5):331-41.
32. Akbar AN, Henson SM, Lanna A. Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. *Trends Immunol.* 2016;37(12):866-76.
33. van Duin D, Mohanty S, Thomas V, Ginter S, Montgomery RR, Fikrig E, et al. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J Immunol.* 2007;178(2):970-5.
34. Nyugen J, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. *J Clin Immunol.* 2010;30(6):806-13.
35. Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol.* 2010;11:30.
36. Verschoor CP, Johnstone J, Millar J, Parsons R, Lelic A, Loeb M, et al. Alterations to the frequency and function of peripheral blood monocytes and associations with chronic disease in the advanced-age, frail elderly. *PLoS One.* 2014;9(8):e104522.
37. Furman D, Chang J, Lartigue L, Bolen CR, Haddad F, Gaudilliere B, et al. Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states. *Nat Med.* 2017;23(2):174-84.
38. Wang X, Malawista A, Qian F, Ramsey C, Allore HG, Montgomery RR. Age-related changes in expression and signaling of TAM receptor inflammatory regulators in monocytes. *Oncotarget.* 2018;9(11):9572-80.
39. Molony RD, Nguyen JT, Kong Y, Montgomery RR, Shaw AC, Iwasaki A. Aging impairs both primary and secondary RIG-I signaling for interferon induction in human monocytes. *Sci Signal.* 2017;10(509).
40. Martinez de Toda I, Mate I, Vida C, Cruces J, De la Fuente M. Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging (Albany NY).* 2016;8(11):3110-9.
41. Shodell M, Siegal FP. Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing. *Scand J Immunol.* 2002;56(5):518-21.
42. Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol.* 2010;184(5):2518-27.
43. Pereira LF, de Souza AP, Borges TJ, Bonorino C. Impaired in vivo CD4+ T cell expansion and differentiation in aged mice is not solely due to T cell defects: decreased stimulation by aged dendritic cells. *Mech Ageing Dev.* 2011;132(4):187-94.
44. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcao RR, et al. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol.* 2011;72(4):319-29.
45. Agrawal S, Ganguly S, Tran A, Sundaram P, Agrawal A. Retinoic acid treated human dendritic cells induce T regulatory cells via the expression of CD141 and GARP which is impaired with age. *Aging (Albany NY).* 2016;8(6):1223-35.
46. Strauss-Albee DM, Horowitz A, Parham P, Blish CA. Coordinated regulation of NK receptor expression in the maturing human immune system. *J Immunol.* 2014;193(10):4871-9.
47. Verschoor CP, Johnstone J, Millar J, Dorrington MG, Habibagahi M, Lelic A, et al. Blood CD33(+)-HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer. *J Leukoc Biol.* 2013;93(4):633-7.

48. Warrington KJ, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. CD28 loss in senescent CD4+ T cells: reversal by interleukin-12 stimulation. *Blood*. 2003;101(9):3543-9.
49. Eaton SM, Maue AC, Swain SL, Haynes L. Bone marrow precursor cells from aged mice generate CD4 T cells that function well in primary and memory responses. *J Immunol*. 2008;181(7):4825-31.
50. Lanna A, Henson SM, Escors D, Akbar AN. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat Immunol*. 2014;15(10):965-72.
51. Channappanavar R, Twardy BS, Krishna P, Suvas S. Advancing age leads to predominance of inhibitory receptor expressing CD4 T cells. *Mech Ageing Dev*. 2009;130(10):709-12.
52. Brahmakshatriya V, Kuang Y, Devarajan P, Xia J, Zhang W, Vong AM, et al. IL-6 Production by TLR-Activated APC Broadly Enhances Aged Cognate CD4 Helper and B Cell Antibody Responses In Vivo. *J Immunol*. 2017;198(7):2819-33.
53. Martinez-Jimenez CP, Eling N, Chen HC, Vallejos CA, Kolodziejczyk AA, Connor F, et al. Aging increases cell-to-cell transcriptional variability upon immune stimulation. *Science*. 2017;355(6332):1433-6.
54. Briceno O, Lissina A, Wanke K, Afonso G, von Braun A, Ragon K, et al. Reduced naive CD8(+) T-cell priming efficacy in elderly adults. *Aging Cell*. 2016;15(1):14-21.
55. Cicin-Sain L, Brien JD, Uhrlaub JL, Drabig A, Marandu TF, Nikolich-Zugich J. Cytomegalovirus infection impairs immune responses and accentuates T-cell pool changes observed in mice with aging. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002849.
56. Mekker A, Tchang VS, Haeberli L, Oxenius A, Trkola A, Karrer U. Immune senescence: relative contributions of age and cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002850.
57. Henson S, Macaulay R, Riddell N, Nunn C, Akbar A. Blockade of PD-1 or p38 MAP Kinase Signaling Enhances Senescent Human CD8(+) T-cell Proliferation by Distinct Pathways. *European journal of immunology*. 2015;45(5).
58. Pereira B, De Maeyer R, Covre L, Nehar-Belaid D, Lanna A, Ward S, et al. Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8 + T cells. *Nature Immunology*. 2020:1-11.
59. Onyema OO, Njemini R, Bautmans I, Renmans W, De Waele M, Mets T. Cellular aging and senescence characteristics of human T-lymphocytes. *Biogerontology*. 2012;13(2):169-81.
60. Moskowitz DM, Zhang DW, Hu B, Le Saux S, Yanes RE, Ye Z, et al. Epigenomics of human CD8 T cell differentiation and aging. *Sci Immunol*. 2017;2(8).
61. Gupta S, Su H, Agrawal S, Gollapudi S. Molecular changes associated with increased TNF-alpha-induced apoptosis in naive (TN) and central memory (TCM) CD8+ T cells in aged humans. *Immun Ageing*. 2018;15:2.
62. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37.
63. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
64. Gupta S. Role of dendritic cells in innate and adaptive immune response in human aging. *Exp Gerontol*. 2014;54:47-52.
65. Hazeldine J, Lord JM. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev*. 2013;12(4):1069-78.
66. Müller-Durovic B, Lanna A, Covre LP, Mills RS, Henson SM, Akbar AN. Killer Cell Lectin-like Receptor G1 (KLRG1) inhibits NK cell function through activation of AMP-activated Protein Kinase. *J Immunol*. 2016;197(7):2891-9.
67. Goronzy JJ, Weyand CM. Successful and Maladaptive T Cell Aging. *Immunity*. 2017;46(3):364-78.
68. Duggal N, Niemi G, Harridge S, Simpson R, Lord J. Can Physical Activity Ameliorate Immunosenescence and Thereby Reduce Age-Related Multi-Morbidity? *Nature reviews Immunology*. 2019;19(9).
69. Pera A, Campos C, Lopez N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*. 2015;82(1):50-5.
70. Xu W, Larbi A. Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
71. Larbi A, Fulop T. From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*. 2014;85(1):25-35.
72. Jameson S, Masopust D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*. 2018;48(2).
73. Mahnke Y, Brodie T, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *European journal of immunology*. 2013;43(11).
74. Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. *Frontiers in microbiology*. 2016;7.

75. Sizzano F, Collino S, Cominetti O, Monti D, Garagnani P, Ostan R, et al. Evaluation of Lymphocyte Response to the Induced Oxidative Stress in a Cohort of Ageing Subjects, including Semisupercentenarians and Their Offspring. *Mediators of Inflammation*. 2018;2018.
76. Britanova O, Putintseva E, Shugay M, Merzlyak E, Turchaninova M, Staroverov D, et al. Age-related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured With Deep and Normalized Sequence Profiling. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192(6).
77. Larbi A, Fortin C, Dupuis G, Berrougui H, Khalil A, Fulop T. Immunomodulatory Role of High-Density Lipoproteins: Impact on Immunosenescence. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2014;36(5).
78. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee W, Cui D, Hiruma Y, Lamar D, Yang Z, et al. T Cell Subset-Specific Susceptibility to Aging. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2008;127(1).
79. Nasi M, Troiano L, Lugli E, Pinti M, Ferraresi R, Monterastelli E, et al. Thymic Output and Functionality of the IL-7/IL-7 Receptor System in Centenarians: Implications for the Neolymphogenesis at the Limit of Human Life. *Aging cell*. 2006;5(2).
80. Libri V, Azevedo R, Jackson S, Di Mitri D, Lachmann R, Fuhrmann S, et al. Cytomegalovirus Infection Induces the Accumulation of Short-Lived, Multifunctional CD4+CD45RA+CD27+ T Cells: The Potential Involvement of interleukin-7 in This Process. *Immunology*. 2011;132(3).
81. Alberti S, Cevenini E, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Bucci L, et al. Age-dependent Modifications of Type 1 and Type 2 Cytokines Within Virgin and Memory CD4+ T Cells in Humans. *Mechanisms of ageing and development*. 2006;127(6).
82. Dolfi D, Mansfield K, Polley A, Doyle S, Freeman G, Pircher H, et al. Increased T-bet Is Associated With Senescence of Influenza Virus-Specific CD8 T Cells in Aged Humans. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(6).
83. Hong M, Dan J, Choi J, Kang I. Age-associated Changes in the Frequency of naïve, Memory and Effector CD8+ T Cells. *Mechanisms of ageing and development*. 2004;125(9).
84. Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, et al. Marked Increase With Age of Type 1 Cytokines Within Memory and effector/cytotoxic CD8+ T Cells in Humans: A Contribution to Understand the Relationship Between Inflammation and Immunosenescence. *Experimental gerontology*. 2003;38(9).
85. Rodríguez IJ, Lalinde N, LLano M, Martínez L, Montilla MdP, Ortiz JP, et al. Immunosenescence study of T cells: a systematic review. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
86. Elwenspoek MMC, Sias K, Hengesch X, Schaan VK, Leenen FAD, Adams P, et al. T Cell Immunosenescence after Early Life Adversity: Association with Cytomegalovirus Infection. *Front Immunol*. 2017;8.
87. Xu W, Monaco G, Wong EH, Tan WLW, Kared H, Simoni Y, et al. Mapping of  $\gamma/\delta$  T Cells Reveals V $\delta$ 2+ T Cells Resistance to Senescence. *EBioMedicine*. 2019;39.
88. Riddell N, Griffiths S, Rivino L, King D, Teo G, Henson S, et al. Multifunctional Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8(+) T Cells Are Not Restricted by Telomere-Related Senescence in Young or Old Adults. *Immunology*. 2015;144(4).
89. Lee W, Shin M, Kang Y, Lee N, Jeon S, Kang I. The Relationship of Cytomegalovirus (CMV) Infection With Circulatory IFN- $\alpha$  Levels and IL-7 Receptor  $\alpha$  Expression on CD8+ T Cells in Human Aging. *Cytokine*. 2012;58(3).
90. Bajwa M, Vita S, Vescovini R, Larsen M, Sansoni P, Terrazzini N, et al. CMV-Specific T-cell Responses at Older Ages: Broad Responses With a Large Central Memory Component May Be Key to Long-term Survival. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(8).
91. Onyema O, Njemini R, Forti L, Bautmans I, Aerts J, De Waele M, et al. Aging-associated Subpopulations of Human CD8+ T-lymphocytes Identified by Their CD28 and CD57 Phenotypes. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2015;61(3).
92. He X, Zha Q, Liu Y, Xu L, Chi X. High Frequencies Cytomegalovirus pp65(495-503)-specific CD8+ T Cells in Healthy Young and Elderly Chinese Donors: Characterization of Their Phenotypes and TCR Vbeta Usage. *Journal of clinical immunology*. 2006;26(5).
93. Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak L, et al. Association Between Cytomegalovirus Infection, Enhanced Proinflammatory Response and Low Level of Anti-Hemagglutinins During the Anti-Influenza Vaccination--An Impact of Immunosenescence. *Vaccine*. 2003;21(25-26).
94. Ouyang Q, Wagner W, Voehringer D, Wikby A, Klatt T, Walter S, et al. Age-associated Accumulation of CMV-specific CD8+ T Cells Expressing the Inhibitory Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 (KLRG1). *Experimental gerontology*. 2003;38(8).
95. Sawhney M, Mathew M, Valarmathi M, Das S. Age Related Changes in Fas (CD95) and Fas Ligand Gene Expression and Cytokine Profiles in Healthy Indians. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2006;24(1).
96. Pinti M, Troiano L, Nasi M, Bellodi C, Ferraresi R, Mussi C, et al. Balanced Regulation of mRNA Production for Fas and Fas Ligand in Lymphocytes From Centenarians: How the Immune System Starts Its Second Century. *Circulation*. 2004;110(19).

97. Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Pedersen A, Skinhøj P, et al. Is Ageing Associated With a Shift in the Balance Between Type 1 and Type 2 Cytokines in Humans? *Clinical and experimental immunology*. 2002;127(1).
98. Ross M, Ingram L, Taylor G, Malone E, Simpson R, West D, et al. Older Men Display Elevated Levels of Senescence-Associated Exercise-Responsive CD28 null Angiogenic T Cells Compared With Younger Men. *Physiological reports*. 2018;6(12).
99. Ouyang Q, Wagner W, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi A, et al. Large Numbers of Dysfunctional CD8+ T Lymphocytes Bearing Receptors for a Single Dominant CMV Epitope in the Very Old. *Journal of clinical immunology*. 2003;23(4).
100. Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E, Zak M, Foerster J, Myśliwski A. Lower Percentage of CD8(high+)CD152(+) but Not CD8(high+)CD28(+) T Lymphocytes in the Elderly May Be Reverted by Interleukin 2 in Vitro. *Mechanisms of ageing and development*. 2002;123(9).
101. Canaday D, Parker K, Aung H, Chen H, Nunez-Medina D, Burant C. Age-dependent Changes in the Expression of Regulatory Cell Surface Ligands in Activated Human T-cells. *BMC immunology*. 2013;14.
102. Agius E, Lacy K, Vukmanovic-Stejic M, Jagger A, Papageorgiou A, Hall S, et al. Decreased TNF-alpha Synthesis by Macrophages Restricts Cutaneous Immunosurveillance by Memory CD4+ T Cells During Aging. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(9).
103. Herndler-Brandstetter D, Veel E, Laschober G, Pfister G, Brunner S, Walcher S, et al. Non-regulatory CD8+CD45RO+CD25+ T-lymphocytes May Compensate for the Loss of Antigen-Inexperienced CD8+CD45RA+ T-cells in Old Age. *Biological chemistry*. 2008;389(5).
104. Machado C, Calado R, Garcia A, Falcão R. Age-related Changes of the Multidrug Resistance P-glycoprotein Function in Normal Human Peripheral Blood T Lymphocytes. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2003;36(12).
105. Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(3):199-212.
106. Minciullo P, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G, et al. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2016;64(2).
107. Hagen J, Zimmerman R, Goetz C, Bonnevier J, Houchins J, Reagan K, et al. Comparative Multi-Donor Study of IFN $\gamma$  Secretion and Expression by Human PBMCs Using ELISPOT Side-by-Side with ELISA and Flow Cytometry Assays. *Cells*. 2015;4(1).
108. Deng Y, Jing Y, Campbell A, Gravenstein S. Age-related Impaired Type 1 T Cell Responses to Influenza: Reduced Activation Ex Vivo, Decreased Expansion in CTL Culture in Vitro, and Blunted Response to Influenza Vaccination in Vivo in the Elderly. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(6).
109. Pietschmann P, Gollob E, Brosch S, Hahn P, Kudlacek S, Willheim M, et al. The Effect of Age and Gender on Cytokine Production by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Markers of Bone Metabolism. *Experimental gerontology*. 2003;38(10).
110. Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Schroll M, Jeune B. High Circulating Levels of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Centenarians Are Not Associated With Increased Production in T Lymphocytes. *Gerontology*. 2003;49(3).
111. Mariani E, Meneghetti A, Formentini I, Neri S, Cattini L, Ravaglia G, et al. Different Rates of Telomere Shortening and Telomerase Activity Reduction in CD8 T and CD16 NK Lymphocytes With Ageing. *Experimental gerontology*. 2003;38(6).
112. Son N, Murray S, Yanovski J, Hodes R, Weng N. Lineage-specific Telomere Shortening and Unaltered Capacity for Telomerase Expression in Human T and B Lymphocytes With Age. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(3).
113. Marimuthu R, Francis H, Dervish S, Li SC, Medbury H, Williams H. Characterization of Human Monocyte Subsets by Whole Blood Flow Cytometry Analysis. *J Vis Exp [Internet]*. 2018; (140). Available from: <http://dx.doi.org/10.3791/57941>.
114. KF K, K D, X W, F Q, A A, SE M, et al. Dysregulation of TLR3 Impairs the Innate Immune Response to West Nile Virus in the Elderly. *Journal of virology*. 2008;82(15).
115. KL B, LM S, AJ H, DM K, DJ R, TD L. Aging Leads to Dysfunctional Innate Immune Responses to TLR2 and TLR4 Agonists. *Aging clinical and experimental research*. 2019;31(9).
116. Kawasaki T, Laboratory of Molecular Immunobiology GSoBS, Nara Institute of Science and Technology, Japan, Kawai T, Laboratory of Molecular Immunobiology GSoBS, Nara Institute of Science and Technology, Japan, tarokawai@bs.naist.jp. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*. 2014;5.

117. Bernal-Estevez D, Tovar D, Parra-López C. Functional and Phenotypic Analysis of Two-Day Monocyte-Derived Dendritic Cells Suitable for Immunotherapy Purposes. 2019.
118. Castiello L, Sabatino M, Jin P, Clayberger C, Marincola F, Krensky A, et al. Monocyte-derived DC Maturation Strategies and Related Pathways: A Transcriptional View. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2011;60(4).
119. Yang JZ, L. Yu, C. Yang, XF. Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research*. 2014;2(1).
120. Witkowski JM, Larbi A, Le Page A, Fulop T. Natural Killer Cells, Aging, and Vaccination. *Interdiscip Top Gerontol Geriatr*. 2020;43:18-35.
121. Witkowski JL, A. Le Page, A. Fülöp, T. Natural Killer Cells, Aging, and Vaccination. *Interdisciplinary topics in gerontology and geriatrics*. 2020;43.
122. Phan MC, S. Kim, SH. Ali, AK. Lee, SH. Kim, S. Kim, SH. Cho, D. Natural killer cell subsets and receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of a healthy Korean population: Reference range, influence of age and sex, and correlation between NK cell receptors and cytotoxicity. *Human immunology*. 2017;78(2).
123. Reed RA-A, A. Presnell, SR. Lutz, CT. Segerstrom, SC. A longitudinal study of the stability, variability, and interdependencies among late-differentiated T and NK cell subsets in older adults. *Experimental gerontology*. 2019;121.
124. Van Gassen SC, B. Van Helden, MJ. Lambrecht, BN. Demeester, P. Dhaene, T. Saeys, Y. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2015;87(7).
125. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112014. p. E2770-7.
126. Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(6-7).
127. Al-Attar A, Presnell S, Peterson C, Thomas D, Lutz C. The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men. *Mechanisms of ageing and development*. 2016;156.
128. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses.
129. Shchukina I, Bagaitkar J, Shpynov O, Loginicheva E, Porter S, Mogilenko DA, et al. Enhanced epigenetic profiling of classical human monocytes reveals a specific signature of healthy aging in the DNA methylome. *Nature Aging*. 2020.
130. Pence BY, JR. Classical monocytes maintain ex vivo glycolytic metabolism and early but not later inflammatory responses in older adults. *Immunity & ageing : I & A*. 2019;16.
131. Ketelhuth DL, E. Bäck, M. Binder, CJ. Van den Bossche, J. Daniel, C. Dumitriu, IE. Hofer, I. Libby, P. O'Neill, L. Weber C, PC E. Immunometabolism and atherosclerosis: perspectives and clinical significance: a position paper from the Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular research*. 2019;115(9).
132. Kalinski PU, J. Narang, R. Berk, E. Wieckowski, E. Muthuswamy, R. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future oncology (London, England)*. 2009;5(3).
133. Müller-Durovic B, Grählert J, Devine OP, Akbar AN, Hess C. CD56-negative NK cells with impaired effector function expand in CMV and EBV co-infected healthy donors with age. *Aging (Albany NY)*. 112019. p. 724-40.
134. Campos CP, A. Lopez-Fernandez, I. Alonso, C. Tarazona, R. Solana R. Proinflammatory status influences NK cells subsets in the elderly. *Immunology letters*. 2014;162(1 Pt B).
135. Wang JC, YQ. Shi, L. Ying, RS. Wu, XY. Li, GY. Moorman, JP. Yao, ZQ. KLRG1 negatively regulates natural killer cell functions through the Akt pathway in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of virology*. 2013;87(21).
136. Monsiváis-Urenda AN-C, D. Hernández-Salinas, A. García-Sepúlveda C. Romo N. Baranda, L. López-Botet, M. González-Amaro, R. Influence of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire in children. *European journal of immunology*. 2010;40(5).
137. Hayhoe RH, SM. Akbar, AN. Palmer, DB. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset. *Human immunology*. 2010;71(7).
138. Bigley AS, G. Agha, N. O'Connor, DP. Simpson, RJ. Dichotomous effects of latent CMV infection on the phenotype and functional properties of CD8+ T-cells and NK-cells. *Cellular immunology*. 2016;300.
139. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino C, et al. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Frontiers in immunology*. 2019;10.
140. Pawelec G. Age and immunity: What is "immunosenescence"? *Experimental gerontology*. 2018;105.
141. Zhou X, McElhaney J. Age-related changes in memory and effector T cells responding to influenza A/H3N2 and pandemic A/H1N1 strains in humans. *Vaccine*. 2011;29(11).

142. Goronzy J, Fang F, Cavanagh M, Qi Q, Weyand C. Naive T cell maintenance and function in human aging. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2015;194(9).
143. Márquez EC, CH. Marches, R. Rossi, RJ. Nehar-Belaid, D. Eroglu, A. Mellert, DJ. Kuchel, GA. Banchereau, J. Ucar, D. Sexual-dimorphism in human immune system aging. *Nature communications*. 2020;11(1).
144. Gustafson CW, CM. Goronzy, JJ. T follicular helper cell development and functionality in immune ageing. *Clinical science* (London, England : 1979). 2018;132(17).
145. Radbruch AM, G. Luger, EO. Inamine, A. Smith, KG. Dörner, T. Hiepe, F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(10).
146. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Ueno H. Molecular Mechanisms Regulating T Helper 1 versus T Follicular Helper Cell Differentiation in Humans. *Cell Rep*. 2016;16(4):1082-95.
147. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019;50(5).
148. Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(6).
149. Bryant VM, CS. Avery, DT. Li, Y. Good, KL. Corcoran, LM. de Waal, Malefyt R. Tangye, SG. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2007;179(12).
150. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:741-66.
151. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-69.
152. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol*. 2009;10(11):1185-92.
153. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
154. Schmitt NB, SE. Ueno, H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends in immunology*. 2014;35(9).
155. Slight SR, Rangel-Moreno J, Gopal R, Lin Y, Fallert Junecko BA, Mehra S, et al. CXCR5(+) T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest*. 2013;123(2):712-26.
156. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108-21.
157. Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med*. 2013;5(176):176ra32.
158. Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu D, et al. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol*. 2011;186(10):5556-68.
159. Forster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood*. 1994;84(3):830-40.
160. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000;192(11):1545-52.
161. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193(12):1373-81.
162. Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol*. 2007;179(8):5099-108.
163. Herati RR, MA. Dolfi, DV. Mansfield, KD. Aung, H. Badwan, OZ. Kurupati, RK. Kannan, S. Ertl, H. Schmader, KE, MR B, DH C, EJ. W. Circulating CXCR5+PD-1+ response predicts influenza vaccine antibody responses in young adults but not elderly adults. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2014;193(7).
164. Stebegg MB, A. Hill, DL. Silva-Cayetano, A. Krueger, C. Vanderleyden, I. Innocentin, S. Boon, L. Wang, J. Zand, MS. Dooley, J. Clark J, A L, E C, MA L. Rejuvenating conventional dendritic cells and T follicular helper cell formation after vaccination. *eLife*. 2020;9.
165. Scholz JD, A. Riley, RL. Cancro, MP. Frasca, D. A comparative review of aging and B cell function in mice and humans. *Current opinion in immunology*. 2013;25(4).

166. Pritz TL, J. Ban, M. Keller, M. Weinberger, B. Krismer, M. Grubeck-Loebenstein, B. Plasma cell numbers decrease in bone marrow of old patients. *European journal of immunology*. 2015;45(3).
167. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA, et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(Rr-8):1-62.
168. Palache A. Seasonal influenza vaccine provision in 157 countries (2004-2009) and the potential influence of national public health policies. *Vaccine*. 2011;29(51):9459-66.
169. McElhaney JE, Kuchel GA, Zhou X, Swain SL, Haynes L. T-Cell Immunity to Influenza in Older Adults: A Pathophysiological Framework for Development of More Effective Vaccines. *Front Immunol*. 2016;7:41.
170. Weinberger BS, M. Matteucci, Gothe R. Siebert, U. Fuchs, D. Grubeck-Loebenstein, B. Recall responses to tetanus and diphtheria vaccination are frequently insufficient in elderly persons. *PLoS one*. 2013;8(12).
171. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:335-68.
172. Alam S, Knowlden ZA, Sangster MY, Sant AJ. CD4 T cell help is limiting and selective during the primary B cell response to influenza virus infection. *J Virol*. 2014;88(1):314-24.
173. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nature Medicine*. 2017;23(1):18-27.
174. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*. 2011;17:1290-7.
175. Fuertes Marraco SA, Soneson C, Delorenzi M, Speiser DE. Genome-wide RNA profiling of long-lasting stem cell-like memory CD8 T cells induced by Yellow Fever vaccination in humans. *Genom Data*. 2015;5:297-301.
176. Lorenzo EC, Bartley JM, Haynes L. The impact of aging on CD4(+) T cell responses to influenza infection. *Biogerontology*. 2018.
177. Yu ML, G. Lee, WW. Yuan, M. Cui, D. Weyand CM. Goronzy, JJ. Signal inhibition by the dual-specific phosphatase 4 impairs T cell-dependent B-cell responses with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(15).
178. Zhang Y, Ertl HCJ. T and B Cell Metabolism in Older Adults. *Immunometabolism*. 2020;2.
179. Mannick JM, M. Hockey, HP. Roma, G. Beibel, M. Kulmatycki, K. Watkins, M. Shavlakadze, T. Zhou, W. Quinn, D. Glass, DJ. Klickstein, LB. TORC1 inhibition enhances immune function and reduces infections in the elderly. *Science translational medicine*. 2018;10(449).
180. Chen YY, M. Zheng, Y. Fu, G. Xin, G. Zhu, W. Luo, L. Burns, R. Li, QZ. Dent, AL. Zhu, N. Cui, W. Malherbe, L. Wen, R. Wang, D. CXCR5 + PD-1 + follicular helper CD8 T cells control B cell tolerance. *Nature communications*. 2019;10(1).
181. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013;11:<http://globocan.iarc.fr>-<http://globocan.iarc.fr>.
182. Aguilera J, de Vries E, Espinosa MT, Henríquez GM, Marín Y, Pardo C, et al. Análisis de Situación del Cáncer en Colombia 2015: Instituto Nacional de Cancerología; 2015.
183. Zhu S, Lin J, Qiao G, Xu Y, Zou H. Differential regulation and function of tumor-infiltrating T cells in different stages of breast cancer patients. *Tumour Biol*. 2015;36(10):7907-13.
184. Michelet XD, L. Hogan, A. Loftus, RM. Duquette, D. Wei, K. eyaz, S. Tavakkoli, A. Foley, C. Donnelly, R. O'Farrelly, C. Raverdeau, M. Vernon, A. Pettee, W. O'Shea, D. Nikolajczyk, BS. Mills, KHG. Brenner, MB. Finlay, D. Lynch, L. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nature immunology*. 2018;19(12).
185. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(21):12072-7.
186. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer*. 2016;2.
187. Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, Kwek SS, Madhireddy D, Martins MM, et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(3):487-502.e15.
188. Marliot F, Pagès F, Galon J. Usefulness and robustness of Immunoscore for personalized management of cancer patients. *Oncoimmunology*. 2020 9(1).
189. Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2016;16:687.
190. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705.
191. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729-40.

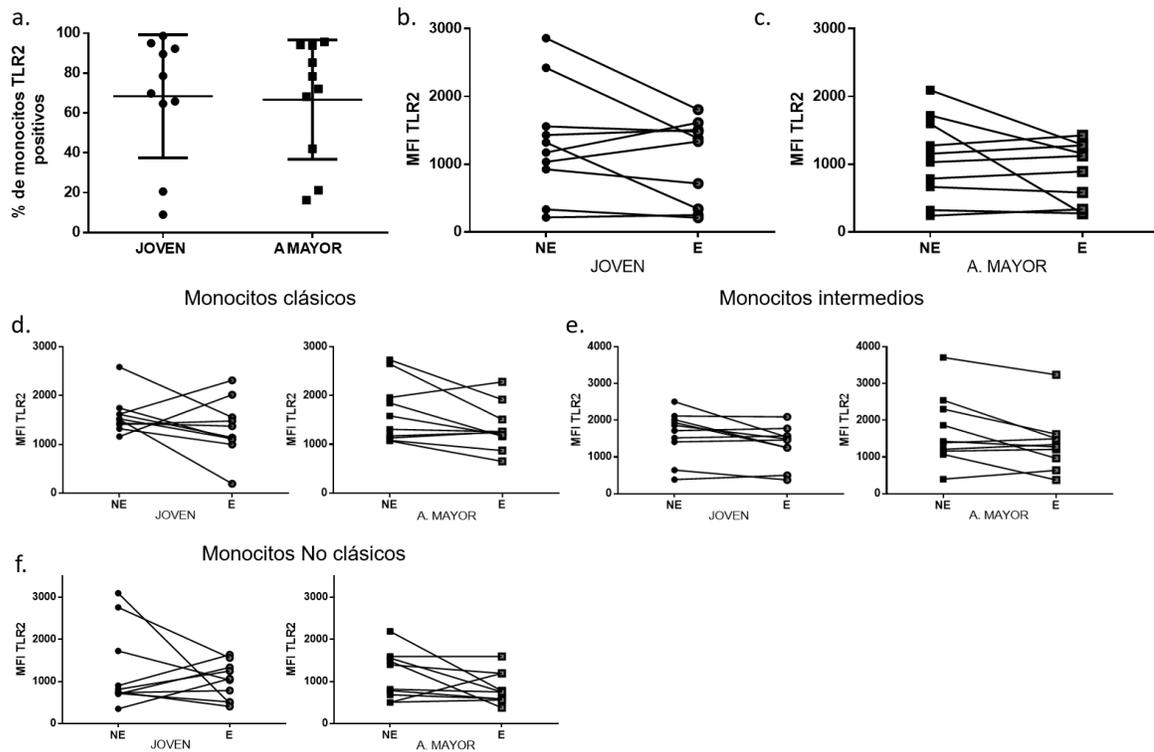
192. Yanai H, Fraifeld VE. The role of cellular senescence in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 2018;41:18-33.
193. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol.* 2011;21(6):354-9.
194. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118.
195. Campisi J, Robert L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Interdiscip Top Gerontol.* 2014;39:45-61.
196. Munk R, Panda AC, Grammatikakis I, Gorospe M, Abdelmohsen K. Chapter Four - Senescence-Associated MicroRNAs. In: Galluzzi L, Vitale I, editors. *International Review of Cell and Molecular Biology.* 334: Academic Press; 2017. p. 177-205.
197. Eccles M. Bio-protocol - Improve Research Reproducibility 2018 [Available from: <https://bio-protocol.org/e247>].
198. Dunn GB, AT. Ikeda, H. Old, LJ. Schreiber, RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology.* 2002;3(11).
199. Dunn GO, LJ. Schreiber, RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology.* 2004;22.
200. Dunn G, Old L, Schreiber R. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21(2).
201. Bhatia AK, Yashwant. Cancer Immunoediting: Immunosurveillance, Immune Equilibrium, and Immune Escape | SpringerLink. *Cancer Immunology.* 2020:291-305.
202. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2018;68:394-424.
203. Lian JY, Y. Yu, W. Zhang, Y. Immunosenescence: a key player in cancer development. *Journal of hematology & oncology.* 2020;13(1).
204. Fulop T, Le Page A, Fortin C, Witkowski JM, Dupuis G, Larbi A. Cellular signaling in the aging immune system. *Curr Opin Immunol.* 2014;29:105-11.
205. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(2):214-21.
206. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):289-95.
207. van Vloten JP, Workenhe ST, Wootton SK, Mossman KL, Bridle BW. Critical Interactions between Immunogenic Cancer Cell Death, Oncolytic Viruses, and the Immune System Define the Rational Design of Combination Immunotherapies. *J Immunol.* 2018;200(2):450-8.
208. Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi RZ, Liu ZW, Zhang JY, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer.* 2011;128(4):887-96.
209. Weber J. Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. *Oncologist.* 2007;12(7):864-72.
210. Zhao Y, Shao Q, Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *cellular & molecular immunology.* 2020;7:27-35.
211. Ye JP, G. Controlling T cell senescence in the tumor microenvironment for tumor immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2015;4(3).
212. Jiang YL, Y. Zhu, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell death & disease.* 2015;6(6).
213. Battram AB, M. Martín-Antonio B. Senescence in the Development and Response to Cancer with Immunotherapy: A Double-Edged Sword. *International journal of molecular sciences.* 2020;21(12).
214. Park Y, Lal S, Lee J, Choi Y, Wen J, Ram S, et al. Chemotherapy induces dynamic immune responses in breast cancers that impact treatment outcome. *Nature communications.* 2020;11(1).
215. Thompson AM-T, S. Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Annals of Oncology.* 2012;23:x231-x6.
216. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2010;124(1):133-40.
217. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. 2011.
218. Massa C, Karn T, Denkert C, Schneeweiss A, Hanusch C, Blohmer J, et al. Differential effect on different immune subsets of neoadjuvant chemotherapy in patients with TNBC. *Journal for immunotherapy of cancer.* 2020;8(2).

219. Kroemer GG, L. Kepp, O. Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. Annual review of immunology. 2013;31.
220. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. Cancer research. 2011;71(14).
221. Gustafson CJ, R. Cao, W. Qi, Q. Pegram, M. Tian, L. Weyand, CM. Goronzy, JJ. Immune cell repertoires in breast cancer patients after adjuvant chemotherapy. JCI insight. 2020;5(4).
222. Feng A, Zhu J, Sun J, Yang M, Neckenig M, Wang X, et al. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. Clinical and experimental immunology. 2011;164(1).
223. Silva GBRFd, Silva TGA, Duarte RA, Neto NL, Carrara HHA, Donadi EA, et al. Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. International Journal of Breast Cancer. 2013;2013.
224. Zhang X, Bi X, Liu P, Liu Z, Nie M, Yang H, et al. Expression of PD-L1 on Monocytes Is a Novel Predictor of Prognosis in Natural Killer/T-Cell Lymphoma. Frontiers in oncology. 2020;10.
225. Nagano M, Saito K, Kozuka Y, Shibusawa M, Imai N, Noro A, et al. PD-L1 expression on circulating monocytes in patients with breast cancer. Annals of Oncology; 2018/11/01: Elsevier; 2018.
226. Widowati WJ, DK. Sumitro, SB. Widodo, MA. Mozef, T. Rizal, R. Kusuma, HSW.Laksmitawati DR, H M, I B, A F. Effect of interleukins (IL-2, IL-15, IL-18) on receptors activation and cytotoxic activity of natural killer cells in breast cancer cell. African health sciences. 2020;20(2).
227. Lazarova MS, A. Impairment of NKG2D-Mediated Tumor Immunity by TGF- $\beta$ . Frontiers in immunology. 2019;10.
228. Wertheimer AM, Bennett MS, Park B, Uhrlaub JL, Martinez C, Pulko V, et al. Aging and Cytomegalovirus Infection Differentially and Jointly Affect Distinct Circulating T Cell Subsets in Humans. 2014.
229. O'Sullivan D, Sanin DE, Pearce EJ, Pearce EL. Metabolic interventions in the immune response to cancer. Nature Reviews Immunology. 2019;19(5):324-35.
230. Sanoff HD, AM. Krishnamurthy, J. Torrice, C. Dillon, P. Sorrentino, J. Ibrahim, JG. Jolly TA. Williams, G. Carey, LA. Drobish, A. Gordon, BB. Alston, S. Hurria, A. Kleinhans, K. Rudolph, KL. Sharpless, NE. Muss, HB. Effect of cytotoxic chemotherapy on markers of molecular age in patients with breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. 2014;106(4).
231. Trintinaglia L, Bandinelli LP, Grassi-Oliveira R, Petersen LE, Anzolin M, Correa BL, et al. Features of Immunosenescence in Women Newly Diagnosed With Breast Cancer. Front Immunol. 2018;9:1651.
232. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. Nat Rev Nephrol. 2018;14(2):121-37.
233. Sampath PM, K. Ranganathan, UD. Bethunaickan, R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. Frontiers in immunology. 2018;9.
234. Foulds G, Vadakekolathu J, Abdel-Fatah T, Nagarajan D, Reeder S, Johnson C, et al. Immune-Phenotyping and Transcriptomic Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Breast Cancer: Identification of a 3 Gene Signature Which Predicts Relapse of Triple Negative Breast Cancer. Frontiers in immunology. 2018;9.
235. Hotchkiss RM, LL. Parallels between cancer and infectious disease. The New England journal of medicine. 2014;371(4).
236. Sabado RB, S. Bhardwaj, N. Dendritic cell-based immunotherapy. Cell research. 2017;27(1).
237. Tarazona R, Sanchez-Correa B, Casas-Avilés I, Campos C, Pera A, Morgado S, et al. Immunosenescence: limitations of natural killer cell-based cancer immunotherapy. Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2017;66(2).
238. Muntasell A, Servitja S, Cabo M, Bermejo B, Pérez-Buira S, Rojo F, et al. High Numbers of Circulating CD57+ NK Cells Associate with Resistance to HER2-Specific Therapeutic Antibodies in HER2+ Primary Breast Cancer. 2019.
239. Taouk G, Hussein O, Zekak M, Abouelghar A, Al-Sarraj Y, Abdelalim EM, et al. CD56 expression in breast cancer induces sensitivity to natural killer-mediated cytotoxicity by enhancing the formation of cytotoxic immunological synapse. Scientific reports. 2019;9(8756).
240. Verma R, Foster R, E., Horgan K, Mounsey K, Nixon H, Smalle N, et al. Lymphocyte depletion and repopulation after chemotherapy for primary breast cancer. Breast Cancer Research. 2016;18(1):1-12.
241. Nieto-Velázquez N, Torres-Ramos Y, Muñoz-Sánchez J, Espinosa-Godoy L, Gómez-Cortés S, Moreno J, et al. Altered Expression of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients. Translational oncology. 2016;9(5).
242. Kurt RU, WJ. Smith, JW. Schoof, DD. Peripheral T lymphocytes from women with breast cancer exhibit abnormal protein expression of several signaling molecules. International journal of cancer. 1998;78(1).
243. Guntermann CA, DR. CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2002;168(9).

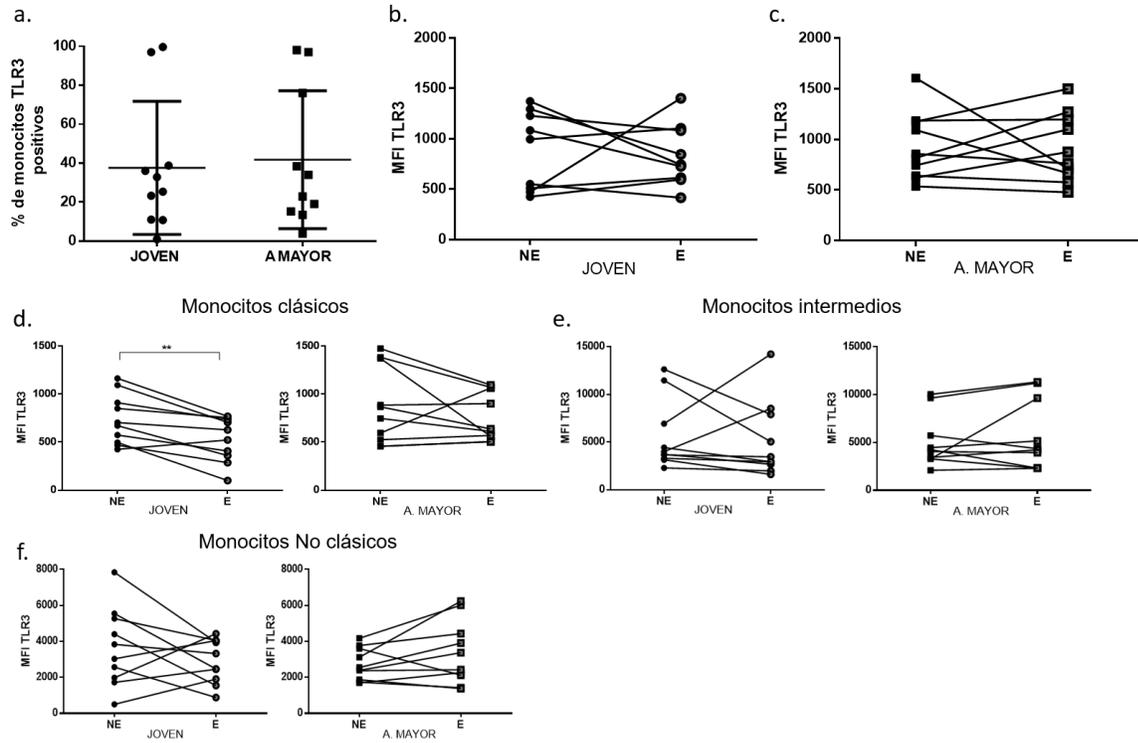
244. Fagnoni F, Lozza L, Zibera C, Zambelli A, Ponchio L, Gibelli N, et al. T-cell dynamics after high-dose chemotherapy in adults: elucidation of the elusive CD8+ subset reveals multiple homeostatic T-cell compartments with distinct implications for immune competence. *Immunology*. 2002;106(1).
245. Thommen DS, TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer cell*. 2018;33(4).
246. Anderson AJ, N. Kuchroo, VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016;44(5).
247. Ghoneim H, Fan Y, Moustaki A, Abdelsamed H, Dash P, Dogra P, et al. De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell*. 2017;170(1).
248. Pardoll D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4).
249. Terranova-Barberio MP, N. Dhawan, M. Moasser, M. Chien, AJ. Melisko, ME. Rugo, H. Rahimi, R. Deal, T. Daud, A. Rosenblum, MD. Thomas, S. Munster, PN. Exhausted T cell signature predicts immunotherapy response in ER-positive breast cancer. *Nature communications*. 2020;11(1).
250. Muenst S, Soysal S, Gao F, Obermann E, Oertli D, Gillanders W. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2013;139(3).
251. Gassner FZ, N. Neureiter, D. Huemer, M. Melchardt, T. Egle, A. Rebhandl, S. Catakovic, K. Hartmann. TN, R G, R G. Chemotherapy-induced augmentation of T cells expressing inhibitory receptors is reversed by treatment with lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(5).
252. Ye J, Ma C, Hsueh E, Dou J, Mo W, Liu S, et al. TLR8 signaling enhances tumor immunity by preventing tumor-induced T-cell senescence. *EMBO molecular medicine*. 2014;6(10).
253. Goronzy J, Weyand C. Mechanisms Underlying T Cell Ageing. *Nature reviews Immunology*. 2019;19(9).
254. Montes C, Chapoval A, Nelson J, Orhue V, Zhang X, Schulze D, et al. Tumor-induced senescent T cells with suppressor function: a potential form of tumor immune evasion. *Cancer research*. 2008;68(3).
255. Kamphorst A, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber D, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science (New York, NY)*. 2017;355(6332).
256. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor M, Wallweber H, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science (New York, NY)*. 2017;355(6332).
257. Onyema O, Decoster L, Njemini R, Forti L, Bautmans I, De Waele M, et al. Chemotherapy-induced changes and immunosenescence of CD8+ T-cells in patients with breast cancer. *Anticancer research*. 2015;35(3).
258. Bruni E, Cazzetta V, Donadon M, Cimino M, Torzilli G, Spata G, et al. Chemotherapy accelerates immune-senescence and functional impairments of V $\delta$ 2 pos T cells in elderly patients affected by liver metastatic colorectal cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7(1).
259. Scurig Z, Carroll J, Bower J, Ramos-Perlberg S, Petersen L, Esquivel S, et al. Biomarkers of aging associated with past treatments in breast cancer survivors. *NPJ breast cancer*. 2017;3.
260. Killock D. Chemotherapy: life gained, years lost? *Nature reviews Clinical oncology*. 2014;11(6).



## A. ANEXO 1. Material suplementario.

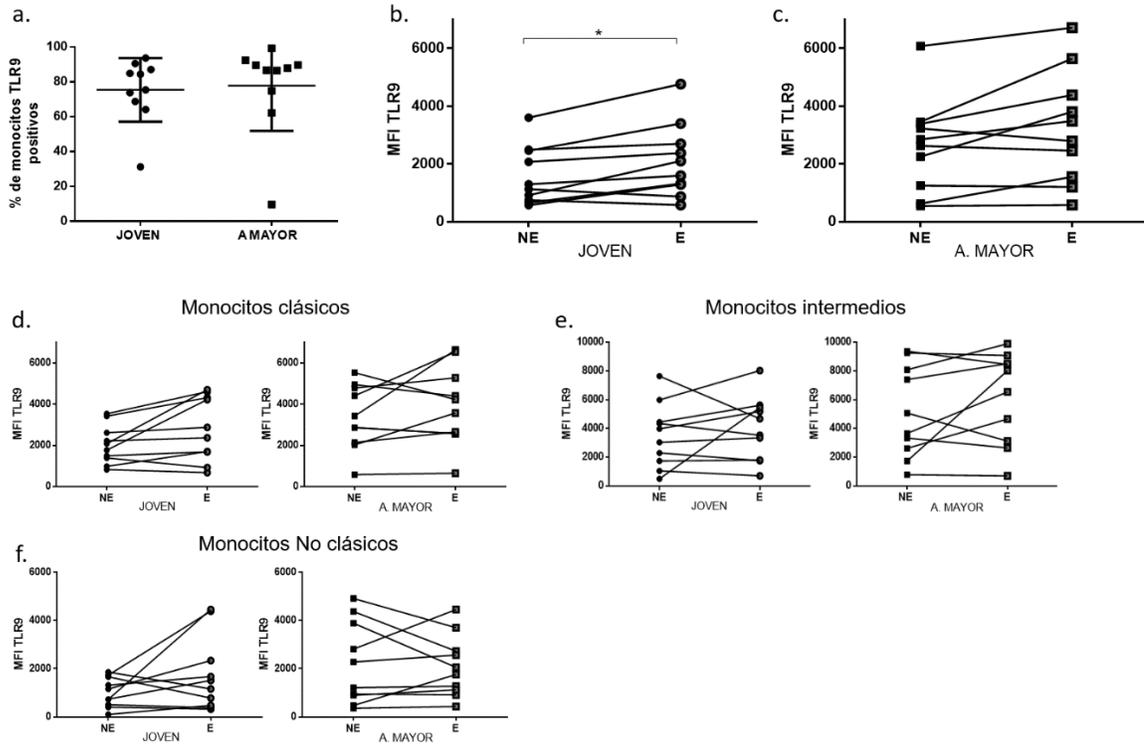


**Figura suplementaria 1. Cambios en la expresión del TLR2 después de la estimulación con Pam3CSK.** **a.** Porcentaje de monocitos totales que expresan TLR2 aislados de un grupo de 10 jóvenes sanos comparados con un grupo de 10 adultos mayores sanos. **b.** Cambio en la expresión de TLR2 (MFI intensidad media de fluorescencia) con la estimulación con Pam3CSK 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el grupo joven **c.** Cambio en la expresión de TLR2 con la estimulación con Pam3CSK 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el grupo adulto mayor. **d. e. f.** Cambios en la expresión de TLR2 con la estimulación en los dos grupos de estudio, en las diferentes subpoblaciones de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Una *t de student* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* fue aplicada en **a.** un valor *p* significativo  $\leq 0,05$ . Una *t de student* no paramétrica, *wilcoxon test* para datos pareados se aplicó en **b, c, d, e y f.** un valor *p* significativo  $p \leq 0.05$ .



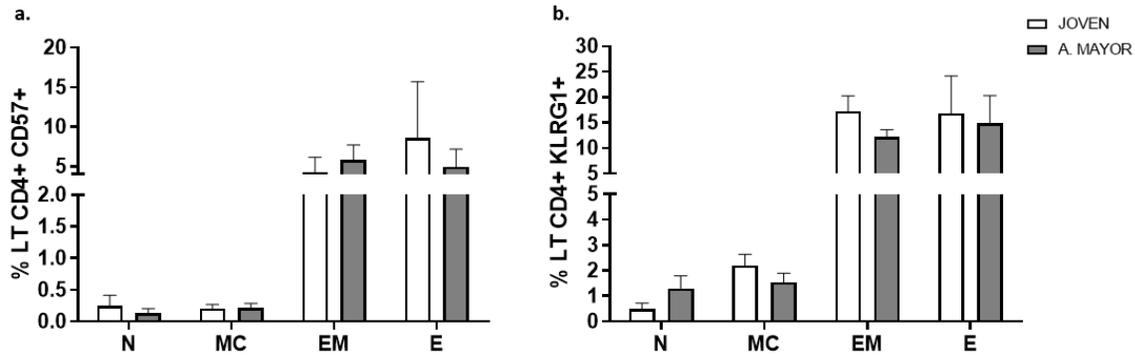
**Figura suplementaria 2. Cambios en la expresión del TLR3 después de la estimulación con Poly I:C.**

**a.** Porcentaje de monocitos totales que expresan TLR3 aislados de un grupo de 10 jóvenes sanos comparados con un grupo de 10 adultos mayores sanos. **b.** Cambio en la expresión de TLR3 (MFI intensidad media de fluorescencia) con la estimulación con Poly I:C  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 horas en el grupo joven **c.** Cambio en la expresión de TLR3 con la estimulación con Poly I:C  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 horas en el grupo adulto mayor. **d. e. f.** Cambios en la expresión de TLR3 con la estimulación en los dos grupos de estudio, en las diferentes subpoblaciones de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Una *prueba t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* fue aplicada en **a.** un valor *p* significativo  $\leq 0,05$ . Una *prueba t* no paramétrica, *wilcoxon test* para datos pareados se aplicó en **b, c, d, e y f.** un valor *p* significativo  $\leq 0,05$ .



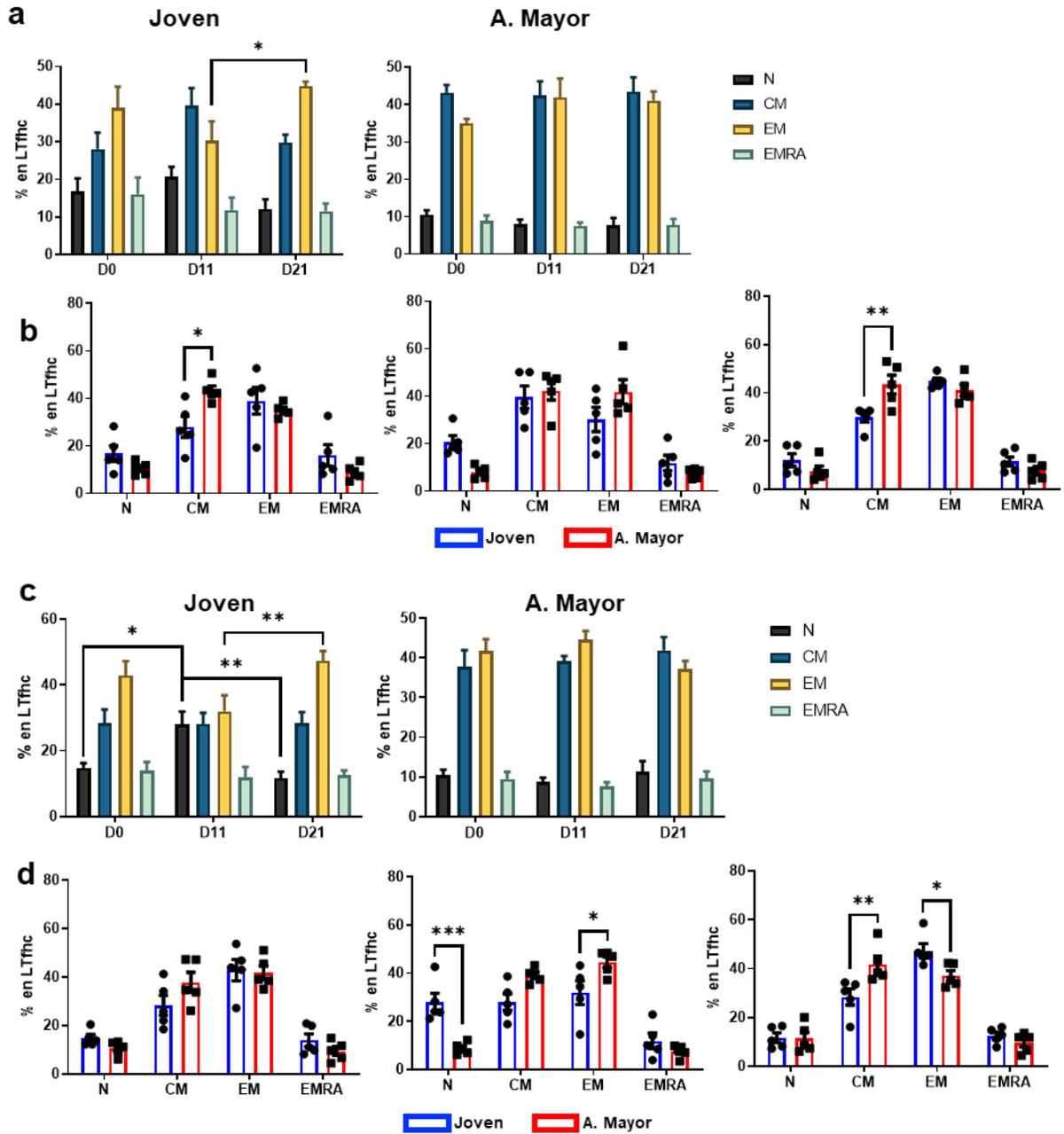
**Figura suplementaria 3. Cambios en la expresión del TLR9 después de la estimulación con CPG.**

**a.** Porcentaje de monocitos totales que expresan TLR9 aislados de un grupo de 10 jóvenes sanos comparados con un grupo de 10 adultos mayores sanos. **b.** Cambio en la expresión de TLR9 (MFI intensidad media de fluorescencia) con la estimulación con CPG 20µg/ml durante 24 horas en el grupo joven **c.** Cambio en la expresión de TLR9 con la estimulación con CPG 20µg/ml durante 24 horas en el grupo adulto mayor. **d. e. f.** Cambios en la expresión de TLR9 con la estimulación en los dos grupos de estudio, en las diferentes subpoblaciones de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Una *prueba t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* fue aplicada en **a.** un valor p significativo  $\leq 0,05$ . Una *prueba t* no paramétrica, *wilcoxon test* para datos pareados se aplicó en **b, c, d, e y f.** un valor p significativo  $\leq 0.05$



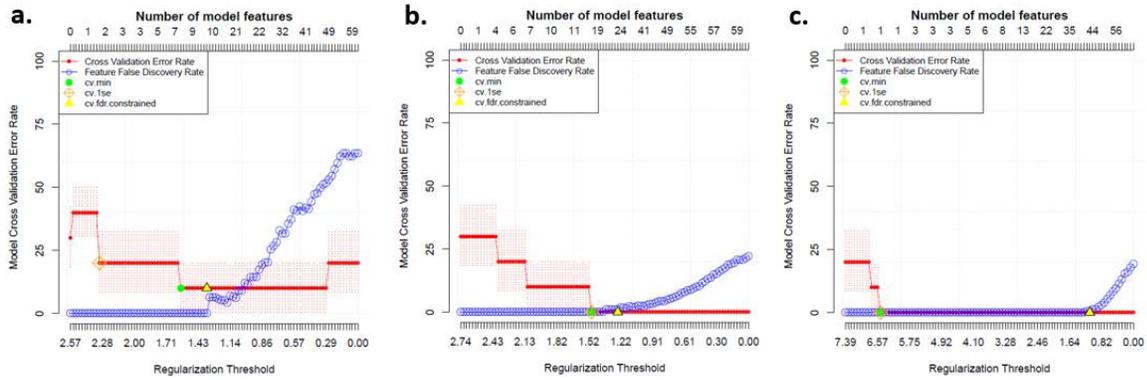
**Figura suplementaria 4. Expresión de marcadores de senescencia en las poblaciones de memoria de LT CD4+.**

Gráfica de barras que muestra el porcentaje de LT CD4+ que expresan CD57 (a) y KLRG1 (b.) en la superficie de distintas subpoblaciones de LT CD4+: vírgenes (N), de memoria central (MC), memoria efectora (EM) y efectoras terminales (E), en los dos grupos de estudio jóvenes (barras blancas), adultos mayores (barras grises). Se realizó una prueba *t* no paramétrica con datos no pareados *Mann-Whitney test* para comparar los grupos. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) ( $n = 10$ /grupo).



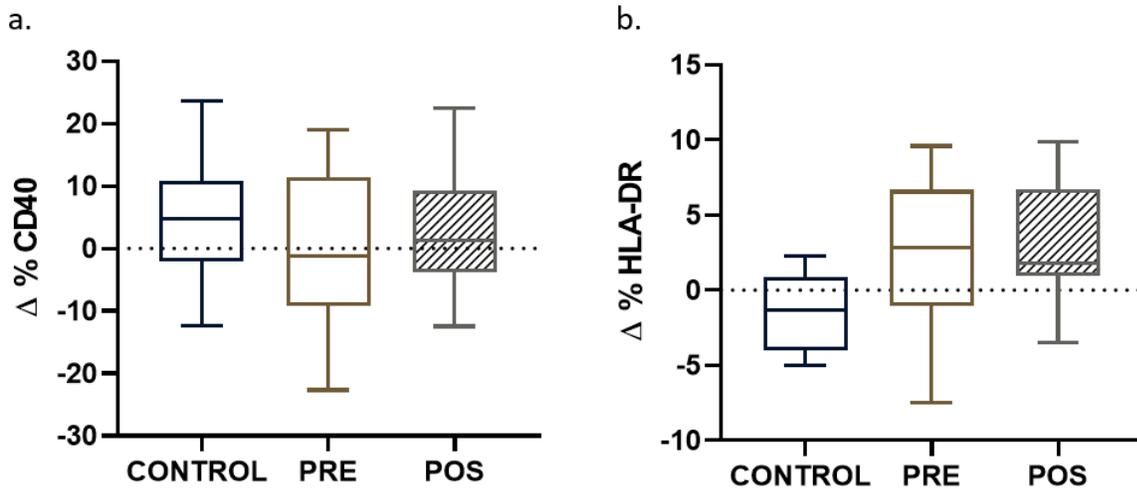
**Figura suplementaria 5. Los LTfhc vírgenes se expanden en respuesta a la estimulación del antígeno en los adultos jóvenes, pero no en los adultos mayores.**

Tomado de Lalinde y cols.(14). Los subconjuntos de LTfhc se determinaron en los días 0, 11 y 21 entre la población CXCR5<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> dentro de los LT CD4<sup>+</sup> tanto *ex vivo* (A) como en respuesta a la estimulación TT durante seis horas *in vitro* (C). Se comparó el porcentaje de subconjuntos de LT en los tres tiempos de muestreo entre los dos grupos de jóvenes y adultos mayores *ex vivo* (B) y después de la estimulación *in vitro* con TT (D). Se evaluaron diferentes subpoblaciones de LTfhc mediante citometría de flujo midiendo la expresión de CCR7 y CD45RA; CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> (virgen), CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> (Memoria central: CM), CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> (Memoria efectora: EM), CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> (Terminal diferenciado: EMRA).



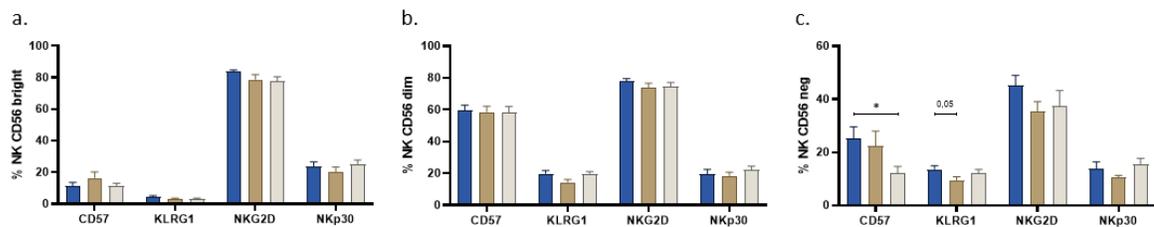
**Figura suplementaria 6. Gráfica de validación del modelo predictivo de los clústeres LTfh identificados en Citrus.**

Curva roja, la tasa de error estimada del modelo y curva azul que corresponde a la tasa de falsos descubrimientos. Se muestran los dos modelos predictivos aplicables a los datos obtenidos: **cv.min**, - círculo verde (menor tasa de error) y **cv.1se** (tasa de error establecida de 1) – diamante naranja. **a.** clúster ex vivo D0. **b.** ex vivo D11 **c.** D11 estimulado con TT.



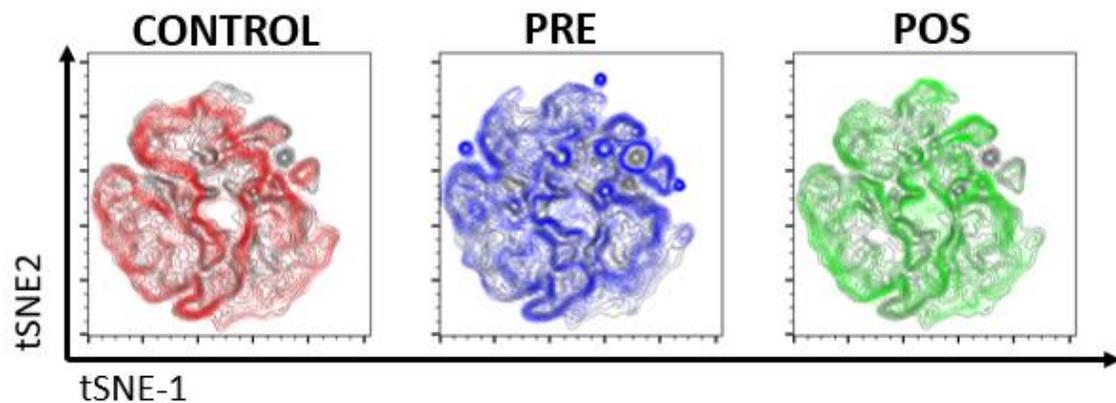
**Figura suplementaria 7. Diferencia en la expresión de CD40 y HLA DR en monocitos después de la maduración de detriticas in vitro.**

**a y b.** La diferencia del porcentaje de expresión de CD40 y HLA-DR ( $\Delta\%$ ) corresponde a la diferencia de porcentaje de células positivas para cada marcador en Monocitos, presente en PBMCs estimulados o no con coctel de citoquinas. se realizó una prueba t no paramétrica con datos no pareados Mann-Whitney test para comparar los grupos. No se encontraron cambios significativos entre los grupos.



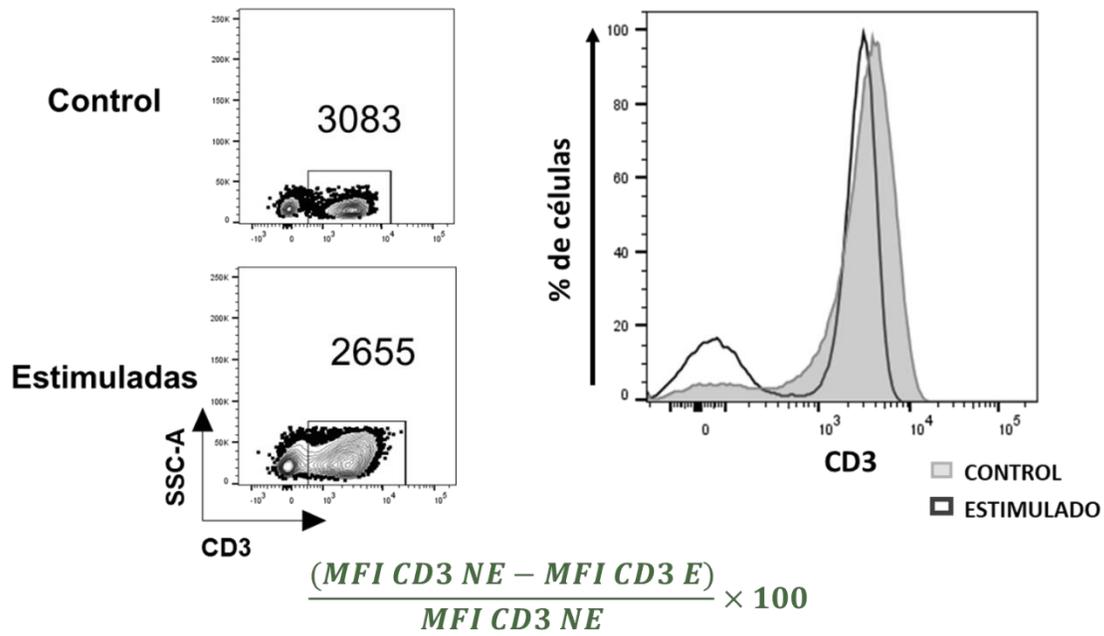
**Figura suplementaria 8. Diferencia en la expresión de receptores en las subpoblaciones de NKs.**

Porcentaje de expresión de CD57, KLRG1, NKG2D y Nkp30 en a. CD56bright, b. CD56dim y en c. CD56neg. Se realizó una prueba t no paramétrica con datos no pareados Mann-Whitney test para comparar los controles y las pacientes. Una prueba t pareada no paramétrica Wilcoxon test para comparar pacientes pre y pos-quimioterapia. Barra de error indica SEM. (\*\*p<0.01; \*p<0.05) (n=10).



**Figura suplementaria 9. Análisis de reducción de dimensionalidad mediante tSNE.**

PBMCs CD3- para todas las participantes agrupados controles y pacientes pre y pos-quimioterapia concatenados y superpuestos.



**Figura suplementaria 10. Modelo de internalización del CD3.**

La gráfica muestra un ejemplo del cálculo del MFI de CD3 control y estimulado. Y la ecuación para calcular el porcentaje de internalización.

## **B. ANEXO 2. PRODUCTOS ACADEMICOS**

### **Artículos científicos:**

- **Rodríguez IJ**, Lalinde Ruiz N, Llano León M, Martínez Enríquez L, Montilla Velásquez MdP, Ortiz Aguirre JP, Rodríguez Bohórquez OM, Velandia Vargas EA, Hernández ED and Parra López CA (2021) **Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review**. Front. Immunol. 11:604591. [doi: 10.3389/fimmu.2020.604591](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604591).
- **Rodríguez IJ**, Chamucero Millares J, Lalinde Ruiz N, Llano León M, Martínez Enríquez L, Montilla Velásquez MdP, Ortiz Aguirre JP, Rodríguez Bohórquez OM, Velandia Vargas EA and Parra López CA. **Human immune response to SARS-CoV-2: What is known? A scoping review**. Infectio 2020; 24(3) Suplemento COVID 19: 26-35

## Socialización de resultados en eventos científicos:

- **El papel de la ciencia tecnología en Innovación en la lucha contra el cáncer** de la secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Gobernación De Cundinamarca. Ponencia: *Vacunas personalizadas para el manejo del cáncer de mama*, 21 de marzo de 2019.
- **Congreso internacional Innovación, tecnología y humanización para el control del cáncer** del Instituto Nacional de Cancerología, Póster: *Estudio celular y molecular de la inmunosenescencia en mujeres con cáncer de mama*, 27 y 28 de agosto de 2019.
- **III Jornadas de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional**. Poster: *Evaluación de la expresión de marcadores de agotamiento y senescencia en Linfocitos T de mujeres con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia neoadyuvante*. **Ganador del primer puesto modalidad póster**. 20 de noviembre de 2019.
- **18° Día de la Investigación de la Fundación Cardioinfantil y la Fundación Neumológica Colombiana**. Póster: *Evaluación de marcadores de inmunosupresión en adultos mayores con sepsis*. 13 de noviembre de 2020.
- **BSI virtual conference: Connecting immunology in the time of COVID-19** de la Sociedad Británica de Inmunología. Póster 1: *Immunosuppression markers in older adults with sepsis* y póster 2: *High Dimensional analysis of the aging of NK cells in a cohort of Colombian adults over 60 years of age*. 01- 02 de diciembre de 2020.
- **Sex Differences in the Immune System** *Influence of Sex Differences on the Distribution of Different Leukocyte Populations*. 14-15 de abril de 2021.
- **Congreso Colombiano de Alergia, Asma e Inmunología ACAAI-ACOI**. Ponencia oral 1: *older adults exhibit a limited expansion of cd45ra+ccr7+ t follicular helper cells in response to tetanus vaccine*. Ponencia oral 2: *inmunosenescencia en mujeres con cáncer de mama y la respuesta a quimioterapia neoadyuvante*. Ponencia oral 3: *estudio celular de la inmunosenescencia en adultos mayores sanos*. 9, 10 y 11 de septiembre de 2021.