

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

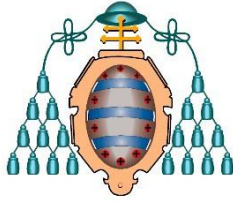
**MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y LA SALUD  
SERVICIO DE INMUNOLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE  
ASTURIAS**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE  
LA POBLACIÓN LINFOCITARIA CD4+CD28<sup>null</sup> EN  
PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**RAQUEL MARCOS FERNÁNDEZ**

**Oviedo, 2016**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**REBECA ALONSO ARIAS**, Facultativo Especialista de Área de Inmunología del Hospital Universitario Central de Asturias y **JUAN CARLOS MAYO BARRALLO**, Profesor del Departamento de Morfología y Biología Celular en la Universidad de Oviedo

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LA POBLACIÓN LINFOCITARIA CD4+CD28<sup>null</sup> EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO**” ha sido realizado por la Graduada en Biología **Raquel Marcos Fernández** en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Central de Asturias bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado, cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 8 de Junio 2016

# Abreviaturas

**APC:** “Allophycocyanin” (Aloficocianina)

**APC:** Célula presentadora de antígeno

**APC-H7:** “Allophycocyanin-H7”

**BSA:** “Bovine serum albumin” (Albúmina sérica bovina)

**CM:** Célula T de memoria central

**CMV:** Citomegalovirus

**E:** Célula T efectora terminal

**EM:** Célula T de memoria efectora

**EMR:** Emigrantes recientes del timo

**EMRA:** Célula T de memoria efectora terminal

**FBS:** “Fetal bovine serum” (Suero bovino fetal)

**FITC:** “Fluorescein isothiocyanate” (Isotiocianato de fluoresceína)

**HSP60:** “Heat shock protein 60” (Proteína de choque térmico 60)

**IFN:** Interferón

**IL-2:** Interleucina-2

**IRP:** “Immune risk profile” (Perfil de riesgo inmunológico)

**ITAM:** “Immunoreceptor tyrosine-based activation motif” (Motivo basado en la activación de la tirosina)

**KIR:** “Killer cell Ig-like receptor” (Receptor tipo Ig de las células NK)

**LAMP:** “Lysosome-associated membrane protein” (proteína de membrana asociada al lisosoma)

**LDL:** “Low density lipoprotein” (Lipoproteína de baja densidad)

**MHC:** “Major histocompatibility complex” (Complejo mayor de histocompatibilidad)

**NK:** “Natural killer cells” (Célula asesina natural)

**N/L:** Cociente entre neutrófilos y linfocitos.

**PB:** Pacific blue

**PBS:** “Phosphate buffered saline” (Tampón fosfato)

**PCR:** Proteína C reactiva

**PE:** “Phycoeritrin” (Ficoeritrina)

**PE-cy7:** “Phycoerythrin-Cyanine7

**PerCP:** “Peridinin chlorophyll-A protein complex”

**SCA:** Síndrome coronario agudo

**Segmento ST:** Segmento del ciclo cardiaco, que representa el tiempo que transcurre desde el final de reposo de una contracción (despolarización) y el inicio del periodo de reposo (repolarización) del ventrículo izquierdo.

**TCR:** “T cell receptor” (Receptor de células T)

**TLR:** “Toll-like receptor” (Receptor tipo toll)

**TNF:** “Tumor necrosis factor” (Factor de necrosis tumoral)

**VEB:** Virus de Epstein-Barr

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

# Índice

|  |    |
|--|----|
| <b>Resumen</b> .....   | 10 |
| <b>Abstract</b> .....  | 11 |
| <b>1. Introducción</b> .....   | 12 |
| <b>1.1 Inmunosenescencia</b> .....   | 12 |
| 1.1.1 Efecto de la edad sobre la inmunidad innata.....   | 13 |
| 1.1.1.1 Inflamación .....  | 14 |
| 1.1.2 Inmunidad adaptativa en personas de edad avanzada .....  | 17 |
| 1.1.2.1 Efecto de la edad sobre las células B .....  | 17 |
| 1.1.2.2 Efecto de la edad sobre las células T .....  | 18 |
| 1.1.2.2.1 Diferenciación de linfocitos T CD4+ .....  | 19 |
| 1.1.2.2.2 Perfil de riesgo inmunológico .....  | 21 |
| <b>1.2 Marcadores de inmunosenescencia</b> .....   | 22 |
| 1.2.1 Receptor CD28 .....  | 23 |
| <b>1.3 Enfermedades cardiovasculares</b> .....   | 26 |
| 1.3.1 Cardiopatía isquémica .....  | 26 |
| 1.3.2 Implicaciones patogénicas de los linfocitos T CD4+CD28 <sup>null</sup> en individuos<br>con síndrome coronario agudo ..... | 27 |
| <b>2. Objetivos</b> .....  | 29 |
| <b>3. Material y métodos</b> .....   | 30 |
| 3.1 Reactivos .....  | 30 |
| 3.2 Materiales .....   | 31 |
| 3.3 Instrumentación .....  | 31 |
| 3.4 Métodos .....  | 31 |
| 3.4.1 Población de estudio .....   | 31 |
| 3.4.2 Análisis hematológico y fenotipado inmunológico .....  | 32 |
| 3.4.3 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica<br>y cultivo celular .....                                       | 33 |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.4     | Ensayo de activación.....  | 33        |
| 3.4.5     | Ensayo de estimulación para cuantificación intracitoplasmática<br>de citocinas .....             | 33        |
| 3.4.6     | Ensayo de degranulación celular .....  | 32        |
| 3.4.7     | Análisis estadístico... ..   | 32        |
| <b>4.</b> | <b>Resultados .....</b>  | <b>35</b> |
| 4.1       | Características demográficas y hematológicas de la población de estudio .....                    | 35        |
| 4.2       | Diferenciación de células T CD4+.....  | 37        |
| 4.3       | Diferenciación de las células T CD4+ de memoria.....   | 38        |
| 4.4       | Activación celular <i>in vitro</i> de las células T CD4+ de memoria.....                         | 41        |
| 4.5       | Capacidad citotóxica <i>in vitro</i> de las poblaciones de linfocitos T de memoria<br>CD4+ ..... | 42        |
| 4.6       | Producción intracelular de citocinas.....  | 43        |
| <b>5.</b> | <b>Discusión .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>6.</b> | <b>Conclusiones .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>7.</b> | <b>Bibliografía .....</b>  | <b>50</b> |

# Índice de figuras

## INTRODUCCIÓN

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Efecto del componente genético y el envejecimiento en el sistema inmune.....  | 15 |
| <b>Figura 2.</b> Balance entre agentes pro y anti-inflamatorios y su efecto sobre la supervivencia en ancianos.....                            | 16 |
| <b>Figura 3.</b> Efecto de la edad sobre la inmunidad adaptativa.....  | 19 |
| <b>Figura 4.</b> Clasificación de los linfocitos T en subpoblaciones utilizando la expresión de CD45RA y CCR7... ..                            | 20 |
| <b>Figura 5.</b> Distribución de EM y EMRA en linfocitos T CD4+ de acuerdo a la expresión de CD27 y CD28... ..                                 | 21 |
| <b>Figura 6.</b> Interacción entre el IRP, la inflamación crónica de bajo grado y el deterioro cognitivo y su relación con la mortalidad... .. | 22 |
| <b>Figura 7.</b> Reconocimiento simultaneo de MHC por el TCR y de B7-1 o B7-2 por la molécula co-estimuladora del receptor CD28... ..          | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Representación esquemática de algunas características de las células T CD28 <sup>null</sup> y CD28 <sup>+</sup> .....         | 25 |
| <b>Figura 9.</b> Representación esquemática del proceso de formación de la placa de ateroma.....   | 27 |
| <b>Figura 10.</b> Efectos patogénicos de las células T CD4+CD28 <sup>null</sup> en el síndrome coronario agudo.....                            | 28 |
| <b>RESULTADOS</b>  |    |
| <b>Figura 11.</b> Fenotipo inmunológico en sangre periférica .....   | 36 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 12.</b> Distribución de las células T CD4+ entre naïve, memoria central y subpoblaciones de EM y EMRA.....                               | 38 |
| <b>Figura 13.</b> Poblaciones de linfocitos T de memoria CD4+CD28+ y CD4+CD28 <sup>null</sup> en los dos grupos de estudio (SCA y controles) ..... | 38 |
| <b>Figura 14.</b> Expresión de CD45RO y CD45RA en ambos grupos de células T CD4+ de memoria.....   | 39 |
| <b>Figura 15.</b> Expresión de marcadores de envejecimiento, CD56, NKG2D, KLRG1 y CD16 en ambos grupos de células T CD4+ de memoria .....          | 40 |
| <b>Figura 16.</b> Expresión basal de los marcadores de activación, HLA-DR, CD69, CD127 y CD25 en ambos grupos de células T CD4+ de memoria .....   | 41 |
| <b>Figura 17.</b> Expresión del marcador de activación CD69 en células T CD4+ aisladas de sangre periférica .....                                  | 42 |
| <b>Figura 18.</b> Expresión de granzima B y perforina en células T CD4+ de memoria CD28+ y CD28 <sup>null</sup> .....                              | 42 |
| <b>Figura 19.</b> Degranulación celular en ambos grupos de células T CD4+ de memoria.....  | 43 |
| <b>Figura 20.</b> Producción intracelular de IFN- $\gamma$ e IL-2 en células T CD4+ de memoria CD28+ y CD28 <sup>null</sup> .....                  | 44 |



# Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Características clínicas y parámetros hematológicos en pacientes e individuos sanos..... | 35 |
|--|----|

# Resumen

La enfermedad coronaria es una de las principales causas de muerte en el mundo desarrollado. Los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) presentan una elevada frecuencia de linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup>, que podrían mediar la inestabilidad de la placa y la recurrencia de eventos coronarios agudos. El objetivo principal de este trabajo fue comparar las subpoblaciones de células T de memoria CD4+CD28<sup>null</sup>, más diferenciadas, y CD4+CD28+, menos diferenciadas, en pacientes con SCA. Comparamos el estado inmunológico de 102 participantes, 50 controles (C) y 52 pacientes con SCA. Los pacientes con SCA tenían aumentado el número total de leucocitos, neutrófilos y monocitos, pero disminuidos los linfocitos, también presentaron niveles elevados de células NK y células T CD8+. Las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ naïve, EM1 y pE1 estaban aumentadas en el grupo control, mientras que EM3 y E se encontraron disminuidas. A continuación, comparamos las poblaciones de células T CD4+ de memoria CD28+ y CD28<sup>null</sup> en pacientes con SCA. Las células CD28<sup>null</sup> mostraron una mayor expresión de CD45RA a la vez que iba disminuyendo la expresión de CD45RO. Los marcadores relacionados con la senescencia celular NKG2D, CD56, KLRG1 y el marcador de activación HLA-DR, se encontraban aumentados, mientras que CD127 y CD25 presentaron una expresión disminuida en los pacientes con SCA. Las células T CD4+CD28<sup>null</sup> presentaron propiedades citotóxicas con una elevada expresión de granzima B, perforina y CD107a. Además, en respuesta a anti-CD3 observamos una mayor producción de IFN- $\gamma$ .

En conclusión, el SCA se relacionó con una mayor diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+. Además, la población de memoria CD28<sup>null</sup> presentó características de células altamente diferenciadas, con gran capacidad citotóxica y de producción de IFN- $\gamma$ . De acuerdo con estas propiedades las células T CD4+CD28<sup>null</sup> podrían estar involucradas en la inestabilidad de la placa aterosclerótica y en posibles complicaciones en el SCA.

# Abstract

Coronary artery disease is one of the leading causes of death in the developed world. Patients with acute coronary syndrome (ACS) have a high frequency of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T lymphocytes which could mediate instability of plaque and recurrence of acute coronary events. The main objective of this study was to compare memory subpopulations of CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> more differentiated, and CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> less differentiated in patients with ACS. We compared the immune status of 102 participants, 50 controls (C) and 52 patients with ACS. ACS patients had increased total number of leukocytes, neutrophils and monocytes, but decreased levels of lymphocytes. They had also elevated levels of NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells. Subpopulations of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes such as naïve, pE1 and EM1 were increased in the control group, while EM3 and E were diminished. Then, we compared memory CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells in patients with ACS. The CD28<sup>null</sup> cells showed increased expression of CD45RA while that the expression of CD45RO was significantly reduced. Markers related to cell senescence NKG2D, CD56, KLRG1 and activation marker HLA-DR were increased, while CD127 and CD25 showed decreased expression in patients with ACS. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells exhibited cytotoxic properties with high expression of granzyme B, perforin and CD107a. In addition, in response to anti-CD3 we observed a greater IFN- $\gamma$  production.

In conclusion, the SCA was associated with a greater differentiation of subpopulations of CD4<sup>+</sup> T cells. In addition, the population of memory CD28<sup>null</sup> cells presented characteristics of differentiated cells with cytotoxic ability and production of high levels of IFN- $\gamma$ . According to their properties, the CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells might be involved in atherosclerotic plaque instability and possible complications in ACS.

## **1. Introducción.**

### **1.1. Inmunosenescencia.**

El envejecimiento se ha definido como la disminución en el tiempo de la capacidad funcional y la resistencia al estrés, asociado con un incremento en la mortalidad y morbilidad. Dicho proceso afecta a la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo. Por otra parte, se produce interacción entre múltiples sistemas fisiológicos, por ejemplo, alteraciones en los sistemas metabólicos pueden influir en el envejecimiento del sistema inmune (Lopez-Otin et al., 2013). Al conjunto de alteraciones que sufre el sistema inmune con la edad se le denomina “inmunosenescencia” (Pawelec, 2012; Weiskopf et al., 2009). Entre las consecuencias de esta inmunosenescencia se incluyen, disminución de la función inmune, aumento en la incidencia y gravedad de las enfermedades infecciosas, desarrollo de fenómenos autoinmunes y cáncer, disminución en la protección inducida por vacunas frente a diversas enfermedades y una menor incidencia al rechazo agudo en pacientes trasplantados de edad avanzada (Bradley et al., 2001; DelaRosa et al., 2006; Prelog, 2006; Weinberger et al., 2008). Hasta hace un par de siglos, la esperanza de vida media del ser humano no superaba los 40-50 años, en la actualidad esta cifra se ha duplicado, de acuerdo con el Informe Europeo de la Salud del 2002. Por lo tanto, el sistema inmunológico tiene que hacer frente a una variedad de antígenos a lo largo de toda la vida, función para la cual no ha evolucionado, conllevando a un aumento en la mortalidad y morbilidad debida a infecciones y patologías relacionadas con la edad (Gavazzi and Krause, 2002; Pawelec et al., 2005). La inmunosenescencia celular no solo es característica del envejecimiento fisiológico, sino que también aparece en patologías donde se produce una activación del sistema inmune e inflamación generalizada (Moro-Garcia et al., 2012). De hecho, algunas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Thewissen et al., 2005) y algunas enfermedades infecciosas como la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Appay et al., 2007), se caracterizan por un fenotipo inmunosenescente. Tanto el envejecimiento fisiológico como las patologías asociadas a la inmunosenescencia, se caracterizan por un estado de inflamación mantenido, dando lugar al envejecimiento del propio sistema inmune (Candore et al., 2010).

El proceso de envejecimiento afecta principalmente a la inmunidad adaptativa (Pawelec et al., 2002), aunque recientes estudios han demostrado que las células del

sistema inmune innato presentan alteraciones y defectos relacionados con la edad (Panda et al., 2009; Shaw et al., 2010; Solana et al., 2006). Las alteraciones que se llevan a cabo en ambas ramas del sistema inmune están asociadas con alteraciones fenotípicas y funcionales del sistema inmune innato y con defectos en la especificidad y regulación de la inmunidad adaptativa, alterando así, el procesamiento y presentación del antígeno y la producción de citocinas (Ku et al., 2000; Pamer, 1999; Ponnappan and Ponnappan, 2011).

El envejecimiento del sistema inmune es el resultado de la acumulación de defectos moleculares y celulares. Una de las alteraciones que se produce de forma más precoz es la involución del timo, proceso en el que el timo disminuye de tamaño, peso y celularidad (Steinmann et al., 1985). Este proceso se acompaña de un cambio en la función del timo debido a la reducción en la producción de células T naïve, detectable tanto en sangre periférica como en los ganglios linfáticos (Appay et al., 2010). Los mecanismos que promueven la involución del timo se cree que aparecen principalmente en el compartimento epitelial de éste (Ortman et al., 2002; Zhu et al., 2007), además existen evidencias de que se produce la acumulación de células apoptóticas y senescentes, lo que reduce el tamaño de dicho compartimento (Flores et al., 1999). A pesar de este fenómeno, el pool de linfocitos T en periferia se mantiene constante debido a la expansión de éstos (Cicin-Sain et al., 2007; Mackall et al., 1993). Mackall y colaboradores demostraron que la presencia de un timo funcional suprime la expansión de células T en la periferia (Mackall et al., 1993). A nivel molecular también se han observado defectos, como la acumulación de daño oxidativo en macromoléculas (incluyendo en el ADN y la cromatina) y la alteración de la expresión génica y los perfiles epigenéticos (Sedivy et al., 2008).

### **1.1.1 Efecto de la edad sobre la inmunidad innata.**

La inmunidad innata representa la primera línea de defensa, en los seres vivos se encuentra muy conservada independientemente del contacto previo con agentes o inmunógenos (Medzhitov and Janeway, 2000). El proceso de inmunosenescencia afecta a múltiples células del sistema inmune innato, incluyendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK). En el caso de los neutrófilos, el número de éstos no cambia, sin embargo, se producen alteraciones en la migración y la

capacidad funcional, comprendiendo la reducción de la capacidad fagocítica y las respuestas a bacterias Gram-positivas y a factores de supervivencia (Fulop et al., 2004; Lord et al., 2001; Schroder and Rink, 2003). Los monocitos y macrófagos también sufren cambios con la edad, el número absoluto de monocitos se incrementa (Della Bella et al., 2007), aumento que se contrarresta con una disminución en la función de los macrófagos, sobre todo la actividad mediada por los receptores tipo Toll (TLR). La reducida actividad de los receptores TLR da lugar a una disminución en la producción de citocinas (van Duin et al., 2007). Del mismo modo, las células NK sufren alteraciones con la edad, aumentando en número, pero reduciéndose su actividad citotóxica, la producción de citocinas y quimiocinas y alterándose su migración a través de los tejidos al sitio diana (Mocchegiani et al., 2009).

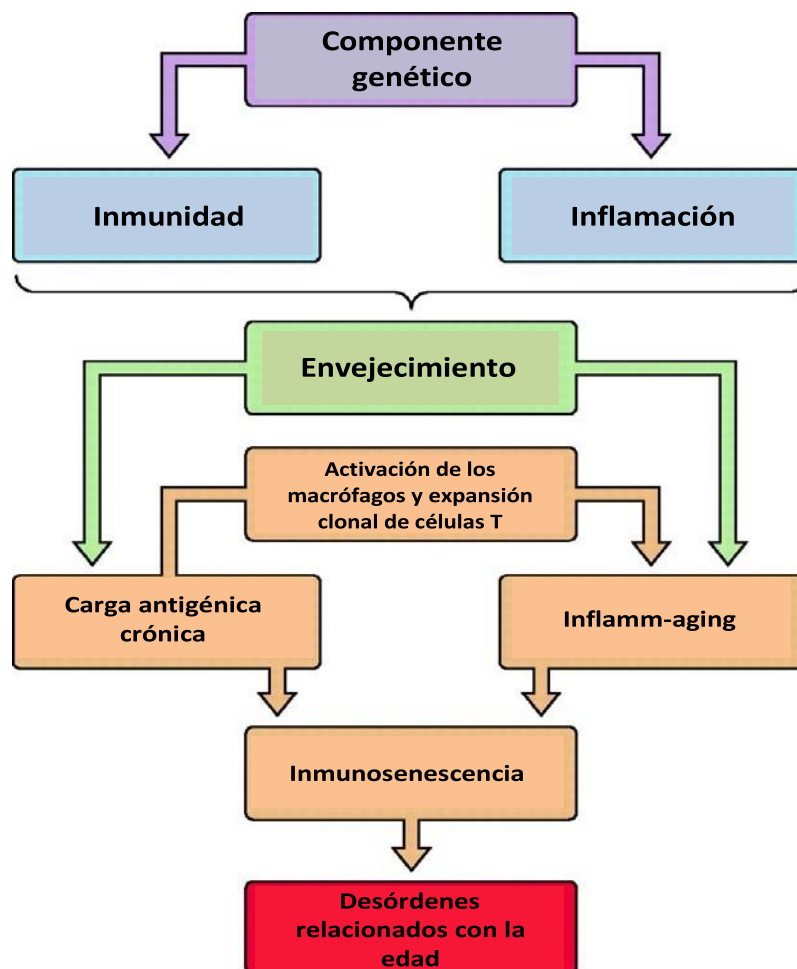
#### **1.1.1.1 Inflamación.**

Durante el envejecimiento se produce un aumento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias en plasma, así como la capacidad de las células para producirlas. Esta condición pro-inflamatoria crónica de bajo grado se conoce como “envejecimiento inflamatorio” o “inflamm-aging” (Franceschi et al., 2000). Las características más importantes del envejecimiento inflamatorio se resumen en tres puntos:

1. Mayor nivel sérico de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-15, IL-8) (Franceschi et al., 2005; Wikby et al., 2006; Zanni et al., 2003) y otros marcadores inflamatorios (factores de coagulación y reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR)) (Franceschi and Campisi, 2014; Mannucci et al., 1997).
2. Las infecciones crónicas en ancianos son bastante comunes, en la mayoría de los casos son provocadas por virus como Citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein-Barr (VEB). Estos virus ejercen un importante papel, ya que se produce la activación de los macrófagos y además, las células T CD8+ específicas para los virus se acumulan adquiriendo un fenotipo de memoria efectora y actividad pro-inflamatoria. Tras una reactivación de estos virus, esta población de células T CD8+ de memoria aumenta de forma gradual para ir en contra de los epítomos

de éstos. En el caso de los linfocitos T CD4+ también se produce, pero su respuesta no es tan exagerada (Koch et al., 2006; Ouyang et al., 2003b; Pawelec et al., 2006; Vescovini et al., 2004) (Figura 1).

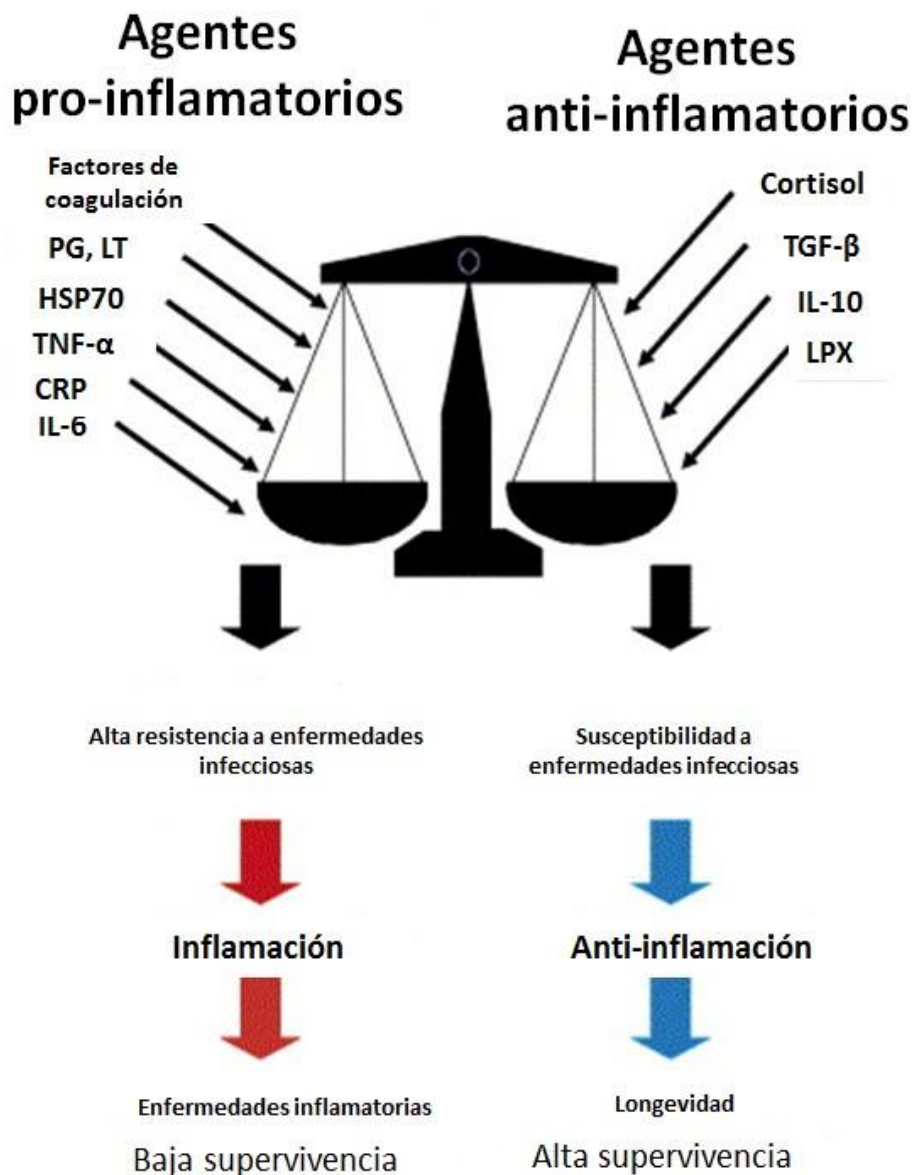
3. El componente genético de inflamm-aging está presente, como se ha sugerido en varios estudios en diversos alelos y genotipos de genes que codifican moléculas inflamatorias como citocinas y factores de coagulación (Bonafe et al., 2001; Cipriano et al., 2005; Franceschi et al., 2005) (Figura 1).



**Figura 1.** Efecto del componente genético y el envejecimiento en el sistema inmune (Larbi et al., 2008).

Los ancianos centenarios pueden contrarrestar los efectos perjudiciales del envejecimiento inflamatorio y además desarrollar una respuesta anti-inflamatoria, lo que les permite resistir a las enfermedades infecciosas sin padecer los efectos perjudiciales del inflamm-aging (Vasto et al., 2007). Esta población además cuenta con genes que les permiten regular el equilibrio entre las citocinas pro- y anti-inflamatorias y los mediadores

de inflamación (Franceschi et al., 2007). De hecho, en estos individuos se ha encontrado un aumento en los marcadores genéticos asociados con una reducida capacidad pro-inflamatoria, lo que permite confirmar que la producción de agentes anti- y pro-inflamatorios está bajo el control genético (Vasto et al., 2007). De acuerdo con ello, una excesiva cantidad de factores inflamatorios y una disminución en la respuesta anti-inflamatoria juega un papel importante en el desarrollo de fragilidad y patologías relacionadas con la edad (Ostan et al., 2008) (Figura 2).



**Figura 2.** Balance entre agentes pro- y anti-inflamatorios. Respuestas inflamatorias eficientes confieren una alta resistencia a enfermedades infecciosas, pero con la edad aumentan la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias crónicas. Por otro lado, las respuestas inflamatorias bajas aumentan la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, pero confieren una ventaja de supervivencia en la vejez (Franceschi et al., 2007).



## **1.1.2 Inmunidad adaptativa en personas de edad avanzada.**

La inmunidad adaptativa está mediada por linfocitos B y T que responden con alto grado de especificidad y memoria frente a antígenos específicos. La función de la inmunidad adaptativa disminuye con la edad, ya que tanto la inmunidad celular mediada por células T como la inmunidad humoral mediada por células B están afectadas por el proceso de inmunosenescencia (Ma and Fang, 2013).

### **1.1.2.1 Efecto de la edad sobre los linfocitos B.**

Los linfocitos B derivan de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea como células pro-B que se diferencian en pre-B, y, que después del reordenamiento del gen de la inmunoglobulina se diferencian en células B (Ponnappan and Ponnappan, 2011). La alteración en la composición y capacidad funcional de las células B provoca una reducción en la capacidad de protección inducida por las vacunas y en la respuesta a nuevos antígenos (Riley, 2013). Recientes estudios han demostrado que la edad afecta a las células B tanto de forma cuantitativa como cualitativa. La concentración de anticuerpos de alta afinidad disminuye y, además se producen alteraciones en el isotipo, afinidad y en el proceso de maduración de la afinidad de éstos (Frasca and Blomberg, 2011; Howard et al., 2006). Esto permite explicar en parte la reducida respuesta a las vacunas en personas de edad avanzada contra antígenos nuevos tales como, influenza o tétanos con respecto a personas jóvenes (Fulop et al., 2007). Con la edad, también se produce una alteración en las subpoblaciones de las células B, hay estudios que indican una disminución en el número de células B de memoria y un aumento en las células B naïve (Chong et al., 2005; Franceschi et al., 1995; Frasca et al., 2008; McKenna et al., 2001; Paganelli et al., 1992; Shi et al., 2005; Stephan et al., 1996), mientras que en otros las células B naïve no cambian con la edad (Rossi et al., 2003). Por otro lado, se produce un incremento en la producción de autoanticuerpos, que debido a su baja afinidad por el antígeno, no parecen tener consecuencias patológicas relevantes (Weksler and Szabo, 2000).

La funcionalidad de los linfocitos B también se ve afectada si la población de linfocitos T colaboradores fundamentales en la producción de anticuerpos está alterada, como suele suceder en los ancianos.

### **1.1.2.2. Efecto de la edad sobre los linfocitos T.**

A pesar de que la senescencia inmunitaria afecta a muchos aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, los defectos en la inmunidad de las células T son los mejor documentados y los más marcados (Nikolich-Zugich, 2005). De hecho, en las personas de edad avanzada la restauración del equilibrio de la población de células T se correlaciona con una mejora en la respuesta al antígeno o al patógeno (Haynes et al., 2005). La interrupción en el equilibrio de células T se debe a cuatro eventos interrelacionados: la involución del timo, la disminución del número de células T naïve, la reducción en la diversidad de los receptores de células T (TCR) y la acumulación de células T de memoria. Todos estos fenómenos tienen el potencial de reducir la reserva de células T naïve necesaria para la protección contra agentes o patógenos nuevos (Nikolich-Zugich, 2008). Los linfocitos T se originan a partir de progenitores derivados de las células madre hematopoyéticas pluripotentes de la médula ósea que migran a través de la sangre al timo, órgano linfoide primario cuyo papel es crucial en el desarrollo de linfocitos T, aquí se proporciona un microambiente adecuado donde estas células pueden proliferar, reordenar el TCR y madurar, con el fin de desarrollar una respuesta inmune adecuada contra patógenos y tumores. El timo proporciona células T naïve hasta la pubertad, momento en el que empieza a reducirse de tamaño y peso, fenómeno que resulta en una pérdida del espacio epitelial y menor eficiencia en el desarrollo de células T. Dicho fenómeno se conoce como involución o atrofia del timo (Lynch et al., 2009). A partir de los 40-50 años casi todo el suministro de células T se produce a partir de células T naïve existentes y células T de memoria (Hakim et al., 2005).

En paralelo con la involución del timo se produce una reducción en el número de emigrantes recientes de timo (EMR), es decir, así como disminuye la celularidad del timo, se reduce la salida de las células T naïve a la periferia (Gruver et al., 2007; Hale et al., 2006). Por otro lado, con la disminución de las células T naïve se produce un aumento en el número de células T de memoria, en particular aquellas que presentan un fenotipo de memoria efectora. Las células T naïve son células que han superado con éxito la selección dentro del timo, pero no han entrado en contacto con el antígeno. Por otro lado, si tras la activación y proliferación desencadenada por la estimulación antigénica y si esta estimulación continua de manera crónica se da lugar a una acumulación de células T de

memoria que ocuparán el espacio fisiológico que no podrán ocupar las células T naïve (Berard and Tough, 2002). Los cambios en la población de células T naïve están conectados con la involución del timo, mientras que la diversidad de los receptores TCR se mantienen hasta edad avanzada (Cavaliere et al., 2003; Linton and Dorshkind, 2004) (Figura 3).

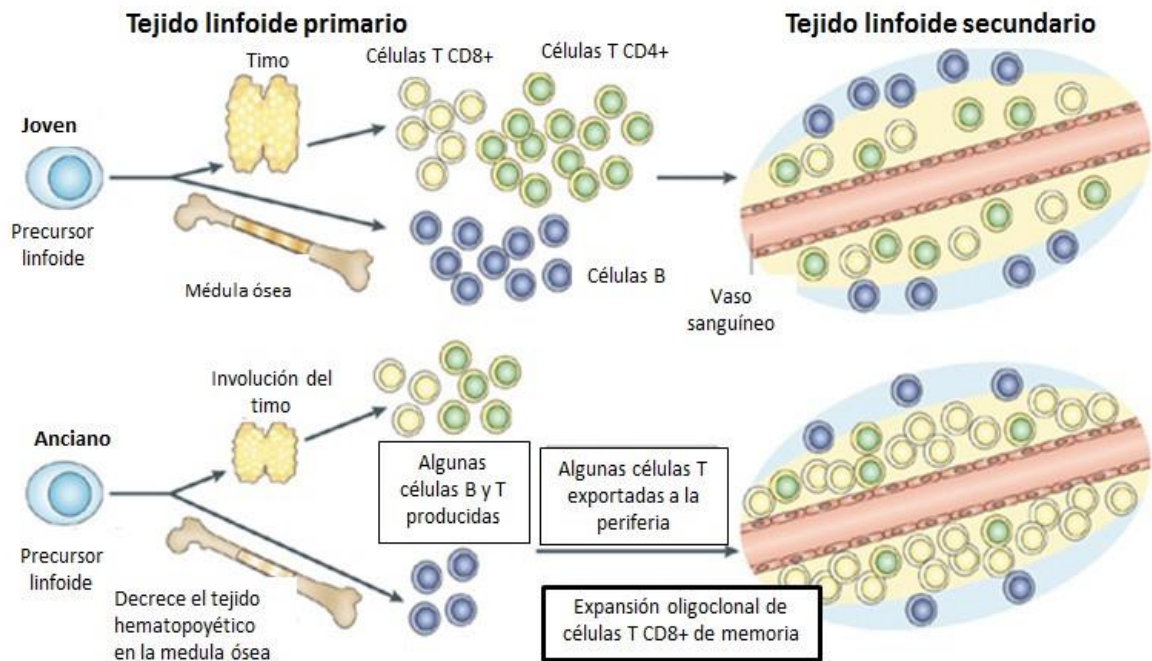


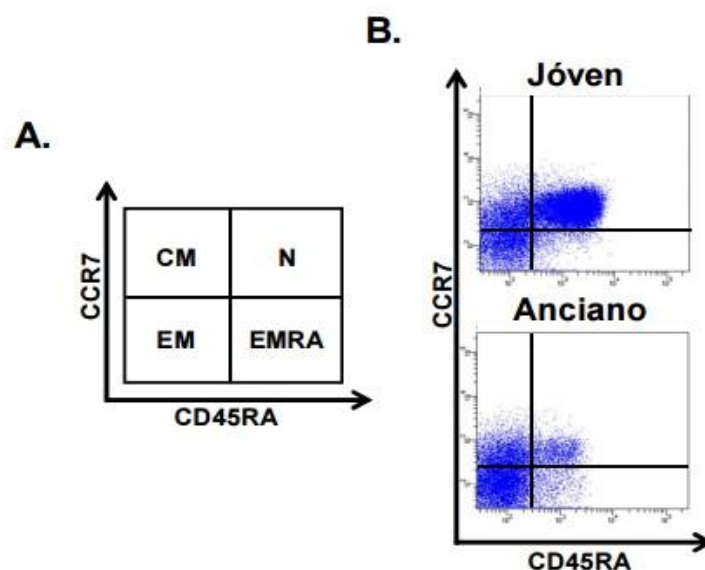
Figura 3. Efecto de la edad sobre la inmunidad adaptativa (Dorshkind et al., 2009).

### 1.1.2.2.1 Diferenciación de células T CD4+.

Las células T naïve circulan por la sangre expresando L-selectina (CD62L), el receptor de quimiocinas 7 (CCR7) y el antígeno asociado a la función del linfocito-1 (la integrina  $\alpha$ L $\beta$ 2 LFA-1). Estas moléculas median la adhesión y extravasación de los linfocitos a los ganglios y órganos linfoides de la mucosa. La supervivencia de las células T naïve requiere una baja afinidad en la interacción entre el TCR y su MHC, y la presencia de IL-7 (Alves et al., 2009; Boyman et al., 2007). Al entrar en contacto con su antígeno, estas células se convierten en células T efectoras que se enfrentan directamente a éste y posteriormente, se convierten en células T de memoria que se diferencian a su vez en células T de memoria central y células T de memoria efectora. Las células T de memoria a diferencia de las células T naïve son menos dependientes del contacto con el complejo MHC-péptido antigénico para su supervivencia, ya que son capaces de sobrevivir en

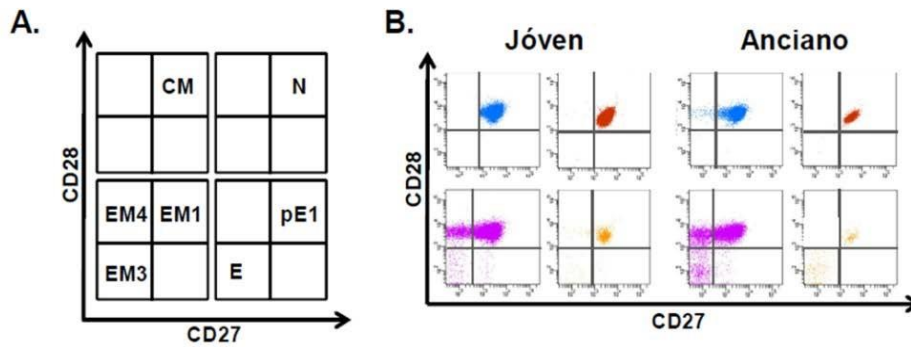
ausencia de las moléculas del complejo de histocompatibilidad (Caserta and Zamoyska, 2007; Swain et al., 1999; Tanchot et al., 1997).

Para clasificar las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> se utilizan dos marcadores de superficie celular, la isoforma de la tirosina fosfatasa (CD45RA) y el receptor de quimiocinas (CCR7). Con estos marcadores las células T se subdividen en naïve (NAÏVE: CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), memoria central (CM: CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), memoria efectora (EM: CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) y memoria efectora diferenciada de forma terminal (EMRA: CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) (Sallusto et al., 1999) (Figura 4).



**Figura 4.** Clasificación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en subpoblaciones utilizando la expresión de CD45RA y CCR7. (A) Modelo esquemático. (B) Dot-plots representativos de las distintas poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en personas jóvenes y de edad avanzada (Moro-Garcia et al., 2013).

EM y EMRA son poblaciones altamente heterogéneas, mediante la expresión de CD27 (familia del receptor TNF) y CD28 (familia del receptor de B7) se pueden identificar las células más o menos diferenciadas. Las células T CD4<sup>+</sup> EM se pueden clasificar en EM1 (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>), EM3 (CD27<sup>null</sup>CD28<sup>null</sup>) y EM4 (CD27<sup>null</sup>CD28<sup>+</sup>). Funcionalmente, EM1 y EM4 son parecidas y exhiben propiedades de memoria, mientras que EM3 muestra propiedades efectoras. Del mismo modo, las células T CD4<sup>+</sup> EMRA se pueden dividir en una subpoblación poco diferenciada, pE1 (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) y en una más diferenciada, E (CD27<sup>null</sup>CD28<sup>null</sup>) (Alonso-Arias et al., 2011; Koch et al., 2008; Romero et al., 2007) (Figura 5).



**Figura 5.** Distribución de EM y EMRA en linfocitos T CD4+ en función de la expresión de CD27 y CD28. (A) Modelo esquemático. (B) Dot-plots representativos de las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en personas jóvenes y de edad avanzada (Moro-Garcia et al., 2013).

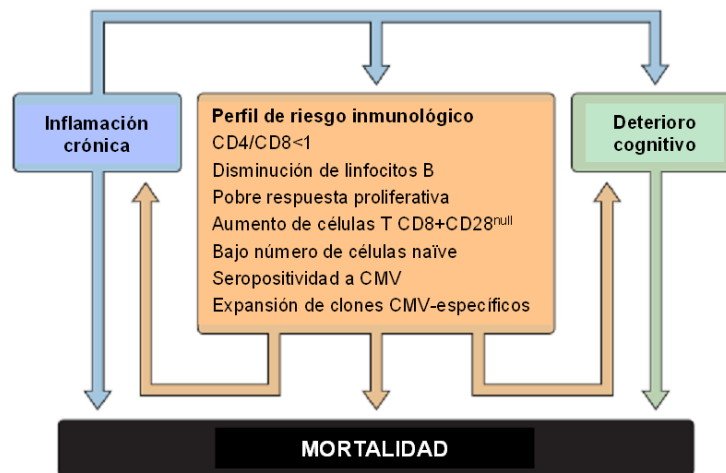
Dentro de la secuencia de diferenciación de los linfocitos T CD4+ existen poblaciones diferentes que presentan presencia o ausencia de la expresión de la molécula co-estimuladora, CD28. Podemos diferenciar las poblaciones de memoria EM3 y E, más diferenciadas, sin expresión de CD28 y subpoblaciones de memoria menos diferenciadas como es el caso de CM, EM1 y EM4, con expresión de CD28.

#### 1.1.2.2.2 Perfil de riesgo inmunológico.

La falta de expresión de la molécula co-estimuladora CD28 junto con otros parámetros inmunológicos conforma el perfil de riesgo inmunológico (IRP). El IRP se asocia con una mayor mortalidad a corto plazo en estudios longitudinales llevados a cabo en personas de edad avanzada (Ouyang et al., 2002). Este parámetro fue definido por los estudios inmunológicos longitudinales OCTO y NONA, llevados a cabo en una población sueca de octogenarios y nonagenarios para establecer los factores predictivos de la longevidad en individuos que presentan diversos grados de discapacidad funcional (Wikby et al., 2002; Wikby et al., 1998). El IRP en principio se caracterizó por altos niveles de células T CD8+, niveles disminuidos de células T CD4+ y de células B CD19+, cociente invertido CD4/CD8, disminuida respuesta proliferativa a concanavalina A, mayor número de células T CD8+CD28<sup>null</sup> efectoras y de memoria y una disminución en el número de células T naïve (Ferguson et al., 1995; Wikby et al., 2005). Un análisis exhaustivo para buscar asociaciones entre este IRP y varios parámetros psicosociales reveló que el IRP se asocia con una infección persistente por CMV (Olsson et al., 2000; Wikby et al., 2005). Por lo tanto, el CMV parece tener un mayor impacto en el sistema

inmune del que se creía anteriormente y también en comparación con otros virus de herpes examinados en estos estudios (Olsson et al., 2000). La acumulación de grandes cantidades de linfocitos T CD8+ (Wikby et al., 2002), así como una mayor expansión clonal de éstos, ha proporcionado un apoyo a la hipótesis de que el CMV contribuye al desarrollo del IRP y, por lo tanto constituye un buen marcador de inmunosenescencia (Hadrup et al., 2006). En los últimos años los parámetros que mejor definen el perfil de riesgo inmunológico son el cociente invertido CD4/CD8, el aumento de la población linfocitaria CD8+CD28<sup>null</sup> y la seropositividad a CMV (Hadrup et al., 2006; Ouyang et al., 2003a).

Se concluye que tanto el IRP como la inflamación crónica de bajo grado son importantes predictores de la supervivencia independientemente del estado de salud del individuo (Wikby et al., 2006) (Figura 6).



**Figura 6.** Interacción entre el IRP, la inflamación crónica de bajo grado y el deterioro cognitivo y su relación con la mortalidad (Larbi et al., 2008).

## 1.2 Marcadores de inmunosenescencia.

La evaluación cuantitativa de la tasa de envejecimiento, se basa en el análisis de las curvas de mortalidad, es decir, se realiza un seguimiento del individuo hasta el final de su vida para determinar su “edad biológica”. Por lo tanto, a nivel de individuo vivo, la evaluación del estado de envejecimiento, incluyendo la disminución de la capacidad funcional no es posible con este método (Burkle et al., 2015). Para evaluarlo se utilizan biomarcadores, algunos de ellos relacionados con los linfocitos, permitiendo una correcta

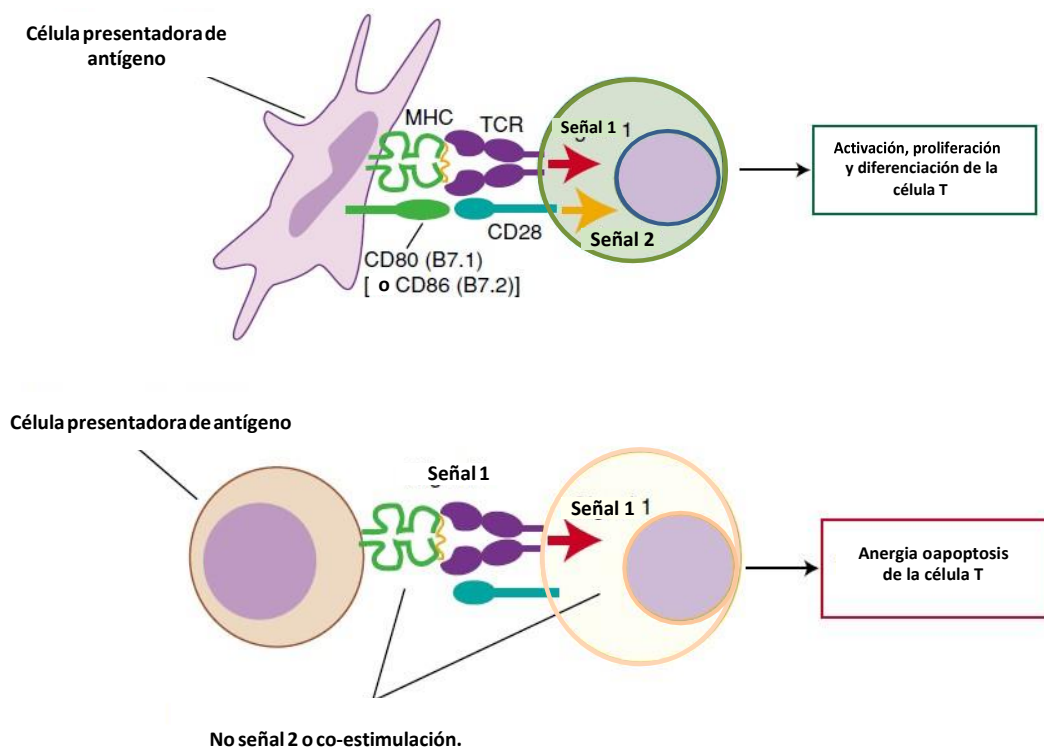
compresión del envejecimiento basado en la inmunosenescencia, las respuestas inflamatorias y el estrés oxidativo. Como hemos dicho anteriormente, la exposición de los linfocitos T a patógenos a lo largo de la vida conduce a una disminución en el número de células T naïve y a un aumento en las células T de memoria, acompañado de una reducción en el repertorio de los receptores TCR producido por un aumento exponencial de linfocitos T oligoclonales (Moro-Garcia et al., 2012). Diversos estudios han demostrado que la inmunosenescencia en los linfocitos T oligoclonales no solo incluye una disminución de la proliferación y la producción de IL-2 en respuesta a mitógenos, sino que también se produce la pérdida en la expresión de CD28 (Pawelec et al., 1999) y se gana la expresión de receptores relacionados con las células NK y linfocitos T CD8+, tales como CD16, CD56, CD94, KLRG1, varios miembros de las moléculas de membrana de tipo 2 (NKG2D) y los receptores de NK tipo inmunoglobulina (KIR) (Borrego et al., 1999; McNerlan et al., 1998; Miyaji et al., 1997; Rea et al., 1999).

### **1.2.1 Receptor CD28.**

Las células T necesitan varias etapas para su completa activación y ganancia de funciones efectoras (Janeway and Bottomly, 1994). La primera señal para que se produzca la activación de las células T se basa en la unión del receptor TCR a través de los coreceptores CD4 y CD8 al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo II o de tipo I, respectivamente, que llevará unido su antígeno específico y que se presentará en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) (Cochran et al., 2001). El complejo TCR es un heterodímero que consta de dos cadenas polipéptidicas transmembrana,  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  unidas entre sí por puentes disulfuro. En el complejo TCR, las proteínas no polimórficas CD3 (formadas por tres monómeros  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) (Borst et al., 1984) y la proteína  $\zeta$  se asocian de forma no covalente al heterodímero  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  (de la Hera et al., 1991). Estas proteínas transducen las señales a través de los motivos basados en la activación de la tirosina (ITAM) (Irving and Weiss, 1991; Letourneur and Klausner, 1992). La unión del TCR y el MHC da lugar a la fosforilación de los motivos ITAM, esto hace que un gran número de quinasas, moléculas adaptadoras y mediadores intermediarios sean reclutados. Sin embargo, el reconocimiento antigénico no es suficiente para que se produzca la activación de las células T (Iwashima et al., 1994; Straus and Weiss, 1992).



Otra señal que se requiere es el receptor CD28, una glicoproteína de membrana tipo 1 de 44 kDa que se expresa de manera constitutiva como un homodímero unido por puentes disulfuro en los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Gross et al., 1990; Vallejo, 2005). La activación de CD28 esta mediada por uno de sus dos ligandos que son expresados en la superficie de las células presentadoras de antígeno, CD80 y CD86, los cuales se asocian con un motivo conservado en la región extracelular de CD28 (Kariv et al., 1996). La unión de CD28 con su ligando proporciona señales co-estimuladoras que complementan o actúan en sinergia con las proporcionadas por el TCR, lo que lleva a la activación de las células T (Thompson et al., 1989) (Figura 7).



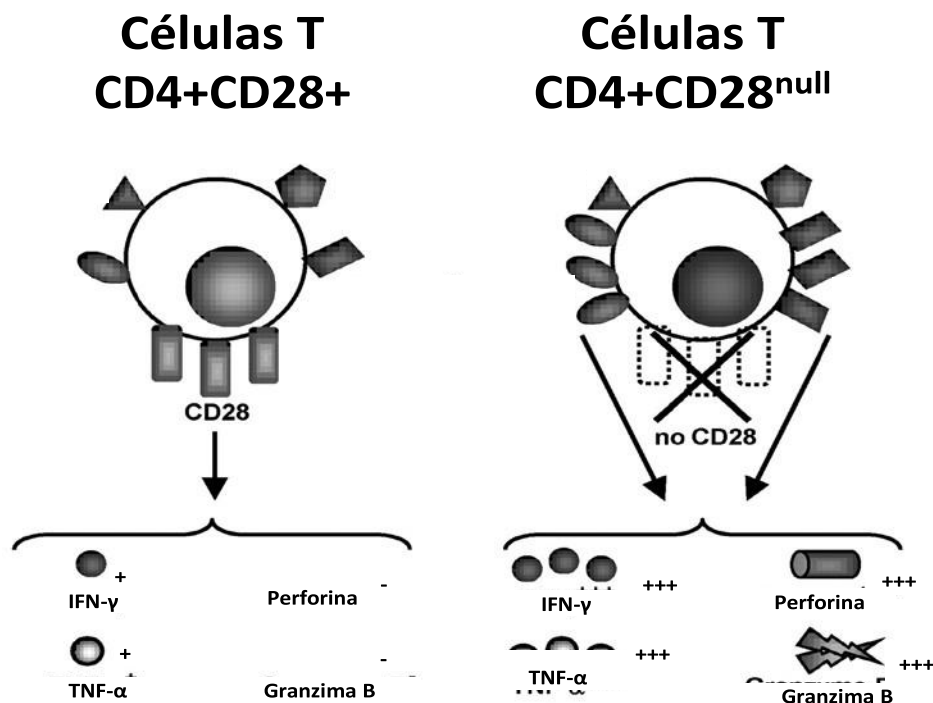
**Figura 7.** Reconocimiento simultáneo del complejo mayor de histocompatibilidad por el TCR y de B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) por la molécula co-estimuladora del receptor CD28, esto permite la activación, proliferación, diferenciación y producción de citocinas por las células T. En ausencia del ligando de CD28 las células T sufren apoptosis o se vuelven anérgicas (Harber et al., 2000).

Pero cuando la célula T es expuesta a una continua activación antigénica y/o a un medio rico en TNF- $\alpha$ , la expresión de la molécula CD28 se pierde de forma definitiva (Bryl et al., 2001). Las células T CD28<sup>null</sup> difieren de las convencionales células T CD28+ en su fenotipo y función. Estas células son menos susceptibles a la regulación de las células T reguladoras CD4+CD25+, lo que las hace potencialmente importantes impulsoras de la inflamación. Por otro lado, tienen funciones pro-inflamatorias



caracterizadas por la producción de altos niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Weyand et al., 1998). Además, presentan capacidad citotóxica mediada por granzima y perforina (Namekawa et al., 1998), enzimas citolíticas presentes normalmente en linfocitos T CD8+ y en células NK (Figura 8). Otras características típicas de estas células, son su elevada oligoclonalidad (Schmidt et al., 1996), su baja capacidad proliferativa (Appay et al., 2002), la presencia de telómeros cortos (Schmidt et al., 1996) y la expresión de receptores relacionados con las células NK, como el NKG2D o el CX3CR1, receptores que permiten a las células responder ante nuevas señales ambientales (Warrington et al., 2001).

La expansión de células T CD4+CD28<sup>null</sup> en circulación periférica ha sido descrita en pacientes con enfermedades autoinmunes (Duftner et al., 2003), inmunodeficiencias y enfermedades crónicas inflamatorias (Alber et al., 2009; Allez et al., 2007). En estas patologías se ha descrito que los linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup> se originan debido a una repetida estimulación antigénica, conduciendo a una continua activación del sistema inmune. La acumulación de estas células se asocia con inmunosenescencia, reducida respuesta inmune a patógenos y reducida protección inducida por las vacunas (Saurwein-Teissl et al., 2002).



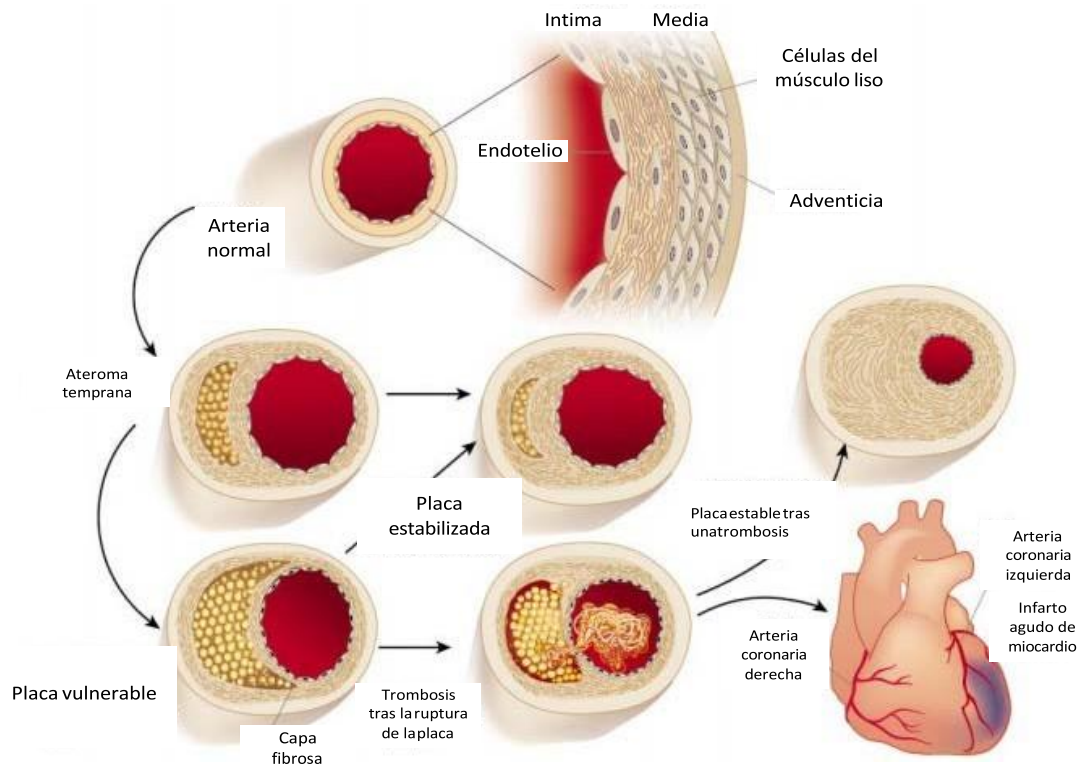
**Figura 8.** Representación esquemática de algunas características de las células T CD28<sup>null</sup> y CD28+ (Dumitriu et al., 2012).

### **1.3 Enfermedades cardiovasculares.**

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la principal causa de muerte en Europa, generando más de 4 millones de muertes al año (45% de todas las muertes), mayor en mujeres (49%) que en hombres (40%). Aunque la proporción de muertes por enfermedades cardiovasculares aumenta con la edad y es poco común en personas jóvenes, causa más de 1,4 millones de muertes en menores de 75 años y 700.000 muertes en menores de 65 años. El síndrome coronario agudo (SCA) considerado individualmente, es una de las principales causas de muerte por estas enfermedades, supone un 19% de muertes en hombres y un 20% de muertes en mujeres (Townsend et al., 2015).

#### **1.3.1 Cardiopatía isquémica.**

La cardiopatía isquémica incluye una serie de alteraciones que tienen lugar en el miocardio como consecuencia de un aporte insuficiente de sangre por parte de las arterias coronarias. Su principal causa es la aterosclerosis, enfermedad inflamatoria que produce un incremento de grosor en la pared de las arterias debido al depósito de lípidos y otras sustancias capaces de desencadenar una reacción inflamatoria, causando lesión en el endotelio vascular y la formación de la placa de ateroma (Methe and Weis, 2007). El daño en el endotelio permite la infiltración de células del sistema inmune propiciando la ruptura de la placa de ateroma, lo que origina las manifestaciones clínicas del síndrome coronario agudo (Hansson and Libby, 2006) (Figura 9). El término de Síndrome Coronario Agudo introducido por Fuster en 1985 (Fuster et al., 1985) incluye diferentes entidades clínicas que conducen a isquemia coronaria (Antman et al., 2004), englobando: el infarto agudo de miocardio (IAM), cuando la isquemia produce necrosis en la porción del miocardio (Thygesen et al., 2007), la angina inestable (AI) cuando la isquemia no llega a producir necrosis en el tejido miocárdico (Braunwald, 1998) y la muerte súbita cuando los impulsos eléctricos del corazón se alteran provocando el paro cardíaco (Khasawneh and Shankar, 2014).



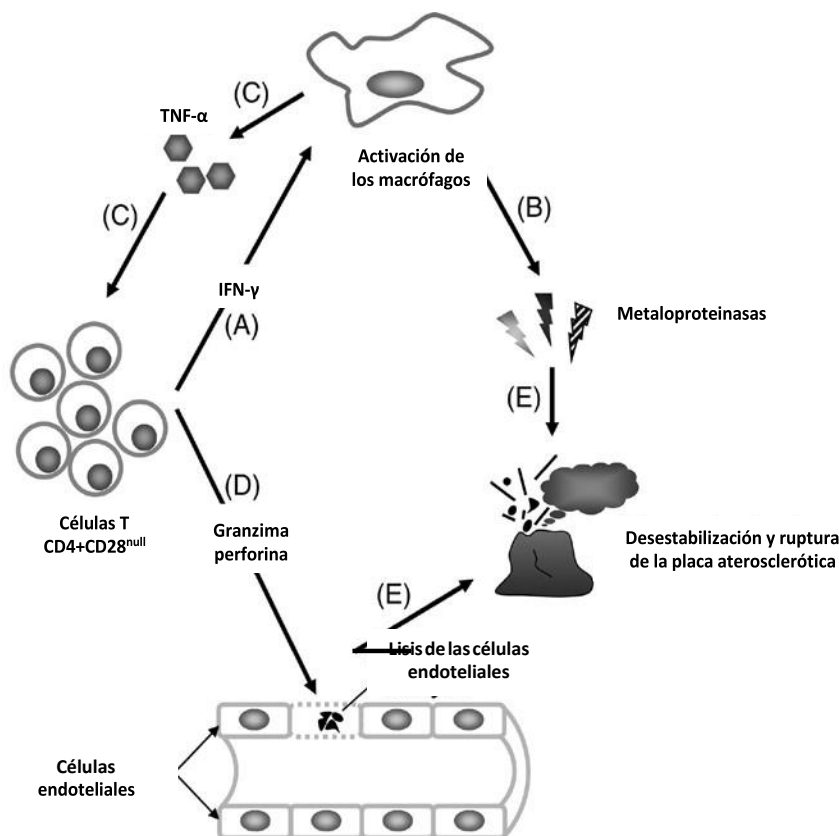
**Figura 9.** Representación esquemática del proceso de formación de la placa de ateroma desde las primeras etapas con la posibilidad de una placa estabilizada o una ruptura de ésta y en último caso la trombosis (Libby, 2002).

Estudios recientes han demostrado que en el desarrollo del SCA una respuesta inmune no controlada juega un papel muy importante y que los linfocitos T desempeñan un papel principal en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Falk et al., 2013; Hansson and Libby, 2006).

### 1.3.2 Implicaciones patogénicas de los linfocitos T CD4+ CD28<sup>null</sup> en individuos con síndrome coronario agudo.

Los pacientes con SCA presentan una elevada proporción de linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup>, estas células tienden a producir IFN- $\gamma$ , provocando la activación de monocitos y macrófagos, por ello, se cree que podrían estar involucrados en la infiltración de éstos hacia la placa (Ammirati et al., 2012; Liuzzo et al., 2007), dando lugar a una placa inestable y a la aparición de eventos coronarios agudos, como el infarto de miocardio y la angina inestable (Figura 10). Evidencias recientes apuntan a la existencia de algún estímulo antigénico crónico en pacientes con enfermedad coronaria, por ello la identificación de antígenos podría ser de gran relevancia clínica. En las fases iniciales, el reclutamiento de células T a las lesiones es mediada a través de señales inflamatorias

no específicas e independientes de antígeno (Dumitriu et al., 2009). Mientras que en etapas avanzadas se cree que antígenos locales presentes en la placa aterosclerótica desencadenan la expansión de las células T CD4+CD28<sup>null</sup> (Wikby et al., 2006). Entre los posibles candidatos a antígenos en las placas ateroscleróticas se encuentran: *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, CMV, lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y proteínas de *choque térmico* (HSP60) (Anwar et al., 2002; Kuo et al., 1993; Yla-Herttuala et al., 1994; Zal et al., 2004), sin embargo el antígeno diana para los linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup> no está todavía claro. La caracterización de los linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup> permitirá definir su implicación en el síndrome coronario agudo, así como identificar posibles mecanismos moduladores de su actividad de cara a diseñar nuevas estrategias terapéuticas en estos pacientes.



**Figura 10.** Efectos patogénicos de las células T CD4+CD28<sup>null</sup> en el síndrome coronario agudo. (A) Las células T CD4+CD28<sup>null</sup> secretan altas concentraciones de IFN- $\gamma$ , que induce la activación de los macrófagos. (B) Los macrófagos liberan metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular. (C) La secreción del factor de necrosis tumoral por los macrófagos contribuye a la generación de células T CD4+CD28<sup>null</sup>. (D) Por lo tanto, las células T CD4+CD28<sup>null</sup> median la lisis de las células endoteliales y posiblemente la de las células del músculo liso vascular mediante la liberación de enzimas citolíticas (perforina, granzima). (E) La destrucción de las células endoteliales, las células del músculo liso y de la matriz extracelular resulta en la desestabilización y ruptura de la placa aterosclerótica lo que causa eventos coronarios agudos (Dumitriu et al., 2009).

## 2 Objetivos.

Como se ha mencionado anteriormente, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo desarrollado. El síndrome coronario agudo considerado individualmente supone un gran número de muertes en Europa con respecto al total. Actualmente, se ha demostrado que gran parte de las causas de esta enfermedad se debe a una respuesta inmune no controlada y que los linfocitos T desempeñan un importante papel en la progresión de la enfermedad. Más específicamente, nosotros estudiamos los linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup> en pacientes con SCA, ya que dicha población se cree que tiene un papel patogénico, relacionándose con una mayor recurrencia de eventos coronarios agudos y una mayor vulnerabilidad de la placa de ateroma. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es la caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos T de memoria CD4+CD28<sup>+</sup> y CD4+CD28<sup>null</sup> en pacientes con SCA. Este objetivo se divide a su vez en los siguientes puntos:

- Cuantificación de las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ para determinar su grado de diferenciación.
- Fenotipado por citometría de flujo de las distintas poblaciones linfocitarias T de memoria CD4+CD28<sup>+</sup> y CD4+CD28<sup>null</sup>.
- Cuantificación de la respuesta funcional linfocitaria *in vitro* tanto basal como en respuesta a la estimulación con anti-CD3.
  - Activación de los linfocitos T de memoria CD4+CD28<sup>+</sup> y CD4+CD28<sup>null</sup> en medio y en respuesta a anti-CD3, evaluándolo mediante la cuantificación de la expresión de la molécula de activación CD69.
  - Capacidad citotóxica de los linfocitos T de memoria CD4+CD28<sup>+</sup> y CD4+CD28<sup>null</sup> mediante la cuantificación de los acúmulos intracitoplasmáticos de granzima B y perforina y el estudio de la expresión de CD107a en respuesta a la activación celular.
  - Producción intracelular de citocinas, como IFN- $\gamma$  e IL-2 por los linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup>.

### 3 Material y métodos.

#### 3.1 Reactivos.

- Anticuerpos para citometría de flujo: Multiset CD3-FITC/CD16+CD56-PE/CD45-PerCP/CD19-APC (BD Biosciences, San José, CA, USA), anti-CD4 (APC), anti-CD8 (PE o PerCP), anti-CD31 (PE), anti-CD45 (PE), anti-CD45RA (FITC) (Immunostep, Salamanca, Spain), anti-CD4 (PerCP), anti-CD28 (PE o PerCP), anti-CCR7 (APC), anti-CD27 (PE-cy7), anti-HLADR (PE-cy7), anti-CD45RA (APC-H7), anti-CD56 (FITC), anti-NKG2D (PE), anti-CD28 (APC), anti-KLRG1 (PE-cy7), anti-CD69 (FITC), anti-CD27 (APC), anti-CD127 (APC), anti-CD16 (PE-cy7), anti-Granzima (FITC), anti-Perforina (PE), anti-CD8 (PB), anti-IFN- $\gamma$  (FITC), anti-IL2 (APC), anti-CD4 (PE-cy7), anti-CD107a (FITC) (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-CD3 (FITC), anti-CD28 (APC-H7), anti-CD45RO (FITC), anti-CD25 (APC) (BD Biosciences, San José, CA, USA).
- Reactivos para cultivos celulares:
  - Medio de cultivo: medio RPMI 1640 con L-glutamina y 25mM HEPES (BioWhitaker, Verviers, Belgium), suero bovino fetal (SFB o FBS) (Biowest, Rue de la Caille, France), antibiótico/antifúngico (HyClone, GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) y polimixina B (Sigma-Aldrich, Spruce Street, St Louis, USA).
- Tampón fosfato salino (PBS) (Oxoid limited, Basigstoke, Hampshire, England).
- Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Nycomed, Oslo, Norway).
- Albúmina de suero bovino (ASB o BSA) (Sigma-Aldrich, Spruce Street, St Louis, USA).
- Reactivos para estudios celulares funcionales de activación y cuantificación de citocinas intracelulares:
  - Monensina (eBioscience, San Diego, CA, USA).
  - Brefeldina (eBioscience, San Diego, CA, USA).
  - Solución de lisis (BD Bioscience, San José, CA, USA).
  - Solución permeabilizadora (BD Bioscience, San José, CA, USA).
  - Anti-CD3 (eBioscience, San Diego, CA, USA).

### 3.2 Materiales.

- Micropipetas de 5-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L (“HTL” Discovery, Warszawa, Poland).
- Pipetas serológicas de 5 mL (Cellstar, Greiner Bio-One, North America, Capital Drive, Monroe), 10 mL y 25 mL (Deltalab S.L., Plaza Verneda, RUBÍ, Barcelona).
- Tubos de ensayo de 10 mL (Soria Genlab, Valdemoro, Ronda del Prado, Madrid).
- Tubos cónicos de 15 mL (Deltalab S.L., Plaza Verneda, RUBÍ, Barcelona).
- Pipeteador electrónico (Pipetus, Hirschmann, Germany).
- Cámara de Neubauer (Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Germany).
- Tubos de citómetro (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA).
- Placas de cultivo (Corning Incorporated-Life Sciences, One Becton Circle, Durham, USA).

### 3.3 Instrumentación.

- Citómetro de flujo Gallios (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) y citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San José, CA, USA).
- Centrífugas (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Cabinas de flujo laminar (Telstar Bio II Advance, Terrasaa, Barcelona).
- Incubadores de CO<sub>2</sub> (SMART CELL, Shangai Lishen Scientific Equipment Co., Ltd., China).
- Equipos de frío: Congelador -80°C (Ing. Climas, Barcelona, España), -20°C y 4°C.
- Microscopio óptico (Leica DM 1000 LED; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany).
- Sysmex XT-2000i (Sysmex, Hamburg-Nordestedt, Germany).

### 3.4 Métodos.

#### *Población de estudio.*

Ciento dos participantes fueron reclutados para el estudio (40 mujeres y 62 hombres). Los individuos del estudio pertenecían a dos grupos diferentes: controles sanos (C) (n=50) y pacientes con SCA (n=52). El grupo control fue reclutado por el Centro de Transfusiones

del Principado de Asturias (Oviedo, España). El grupo SCA fue reclutado por el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Central de Asturias, este grupo comprende pacientes que fueron hospitalizados debido a un síndrome coronario agudo con o sin elevación del segmento ST, de acuerdo con la actual guía de la Sociedad Española de Cardiología. Todos los sujetos fueron sometidos a un examen físico, además respondieron un cuestionario estandarizado donde se evaluó su historia médica, enfermedades recientes y la medicación que estaban tomando. Se consideraron criterios de exclusión todas las posibles condiciones con influencia sobre el sistema inmunológico, tales como infección reciente o actual, enfermedades autoinmunes o tumorales, desnutrición, datos anormales de laboratorio (hemoglobina  $<12$  mg/dL, leucopenia  $<3500$  células/ $\mu$ L, neutropenia  $<1500$  células/ $\mu$ L, leucocitosis  $>15000$  células/ $\mu$ L, plaquetas  $<10^5$  células/ $\mu$ L y PCR  $>5$  mg/dL), y posibles interferencias farmacológicas (esteroides, fármacos antiinflamatorios y fármacos inmunosupresores). Todos los voluntarios participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Central de Asturias.

#### *Análisis hematológico y fenotipado inmunológico.*

Los parámetros hematológicos fueron determinados mediante Sysmex XT-2000i. El fenotipado inmunológico se obtuvo mediante marcajes superficiales en sangre periférica anti-coagulada con EDTA. Para realizar estos marcajes se utilizaron, Multiset CD3-FITC/CD16+CD56-PE/CD45-PerCP/CD19-APC, anti-CD4 (APC), anti-CD8 (PE), anti-CD45RA (FITC), anti-CD4 (PerCP), anti-CD28 (PE), anti-CCR7 (APC), anti-CD27 (PE-Cy7), anti-HLADR (PE-Cy7), anti-CD45RA (APC-H7), anti-CD56 (FITC), anti-NKG2D (PE), anti-CD28 (APC), anti-KLRG1 (PE-Cy7), anti-CD69 (FITC), anti-CD27 (APC), anti-CD127 (APC), anti-CD16 (PE-Cy7), anti-CD45RA (APC-H7), anti-granzima (FITC), anti-perforina (PE), anti-CD28 (APC-H7), anti-CD45RO (FITC), anti-CD25 (APC). Se marcaron 100  $\mu$ L de sangre total con diferentes combinaciones de los anticuerpos anteriores y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras de sangre fueron lisadas con la solución de lisis, lavadas en PBS, adquiridas en el citómetro de flujo Gallios y se analizaron con el software Kaluza (Beckman-Coulter, BREA, CA, USA). Para el marcaje intracelular de perforina y granzima, se marcaron 100  $\mu$ L de sangre total con los anticuerpos de superficie, se



incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, las muestras se lisaron con la solución de lisis y se permeabilizaron con la solución permeabilizadora. Posteriormente, se marcaron con los anticuerpos intracitoplasmáticos, anti-granzima (FITC) y anti-perforina (PE), se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron con PBS+BSA al 0,5%, se adquirieron con el citómetro de flujo Gallios y, posteriormente fueron analizadas con el software Kaluza.

#### *Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y cultivo celular.*

Aislamos células mononucleares de sangre periférica anticoagulada con EDTA por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. Los cultivos celulares se realizaron en medio RPMI 1640 enriquecido con 10% SFB descomplementado, 10 mL/L de una solución 100X de antibiótico/antifúngico y 50 mg/mL de polimixina B. Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono.

#### *Ensayo de activación.*

Los cultivos de activación se realizaron con células mononucleares aisladas de sangre periférica ajustadas a  $4 \times 10^6$  células/mL en medio solo y en presencia de anti-CD3 (10 ng/mL) durante 18 horas. La activación se evaluó marcando en superficie las células con anti-CD69 (FITC). Las poblaciones linfocitarias se identificaron mediante el marcaje con anti-CD28 (PE), anti-CD4 (PerCP), anti-CCR7 (APC), anti-CD27 (PE-Cy7), anti-CD45RA (APC-H7) y anti-CD8 (PB). Posteriormente, se lavaron con PBS, se adquirieron con el citómetro de flujo Gallios y fueron analizadas con el software Kaluza.

#### *Ensayo de estimulación para cuantificación intracitoplasmática de citocinas.*

Cultivamos células mononucleares de sangre periférica ajustadas a  $4 \times 10^6$  células/mL, en medio solo y en presencia de anti-CD3 (10 ng/mL) (eBioscience). Los cultivos para la detección intracitoplasmática de citocinas fueron tratados después de 2 horas con un inhibidor de la secreción extracelular, la Brefeldina A (10 µg/mL). Pasadas las 3 horas adicionales, las células fueron tratadas con 2 mM EDTA durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas con PBS y marcadas con anticuerpos contra los antígenos de superficie anti-CD28 (PE), anti-CD8 (PerCP), anti-CD4 (PE-Cy7) y anti-CD45RA (APC-H7) y se procesaron según el protocolo de marcaje intracitoplasmático descrito

previamente. Finalmente, se marcaron con los anticuerpos intracitoplasmáticos anti-IFN- $\gamma$  (FITC) y anti-IL-2 (APC).

#### *Ensayo de degranulación lisosomal.*

La expresión de CD107a, una proteína de membrana asociada al lisosoma-1 (LAMP-1) fue usada para medir la degranulación de las células mononucleares. Las células mononucleares fueron cultivadas en medio solo y en presencia de anti-CD3 (10 ng/mL) y, se incubaron durante 5 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Después de la primera hora de cultivo se añadió la monensina (2  $\mu$ M), un protector de la degranulación celular. Finalmente, las células fueron marcadas con anti-CD107a (FITC), anti-CD8 (PE), anti-CD4 (PerCP), anti-CD28 (APC), anti-CD27 (PE-Cy7) y anti-CD45RA (APC-H7). Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo gallios y fueron analizadas mediante el programa Kaluza.

#### *Análisis estadístico.*

Los resultados se expresaron como mediana y rango intercuartílico o como media y desviación estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney, cuando los datos no se distribuían normalmente, o con la prueba *t* de Student, cuando éstos se distribuían normalmente. Los análisis se realizaron utilizando el programa PASW Statistics 17 (SPSS Inc. Chicago, IL) y los valores de “p” de 0,05 o inferiores fueron considerados significativos.

## 4 Resultados.

### 4.1 Características demográficas y hematológicas de la población de estudio.

Las características de los 102 individuos incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 1. La relación mujer/hombre difiere entre los grupos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres para los parámetros examinados. Todos los pacientes con SCA y los controles eran caucásicos. El recuento de células sanguíneas y el fenotipo inmunológico fue determinado en todos los individuos. La comparación entre los grupos reveló diferencias significativas en el número absoluto de leucocitos y monocitos y en el número absoluto y porcentaje de neutrófilos y linfocitos (*t* de Student) (Tabla 1).

**Tabla 1. Características clínicas y parámetros hematológicos en pacientes e individuos sanos.**

|   | Síndrome coronario agudo (SCA) (n = 52) | Controles (C), población general (n = 50) | p-valor SCA vs C |
|---|---|---|------------------|
| Edad±SD (años)                              | 57,6±9,3                                | 59,6±7,1                                  | NS               |
| Hombres (%)                                 | 45 (86,5)                               | 17 (34)                                   | 0,001            |
| <b>Factores de riesgo, n (%)</b>            |   |   |                  |
| Fumador, actualmente (%)                    | 36 (69,2)                               | 19 (36,5)                                 | 0,03             |
| Hipertensión (%)                            | 31 (59,6)                               | 4 (8,0)                                   | 0,025            |
| Hipercolesterolemia (%)                     | 30 (57,7)                               | 7 (14,0)                                  | 0,02             |
| Diabetes mellitus (%)                       | 31 (59,6)                               | 0 (0)                                     | 0,001            |
| <b>Medicación</b>                           |   |   |                  |
| β-bloqueantes                               | 42 (80,7)                               | 2 (4,0)                                   | <0,001           |
| Aspirina                                    | 49 (94,2)                               | 0 (0,0)                                   | NA               |
| Inhibidores ECA                             | 20 (38,5)                               | 2 (4,0)                                   | <0,001           |
| Clopidogrel                                 | 30 (57,7)                               | 0 (0,0)                                   | NA               |
| Estatinas                                   | 49 (94,2)                               | 7 (14,0)                                  | <0,001           |
| <b>Variables bioquímicas (media ± SD)</b>   |   |   |                  |
| Colesterol total (mg/dL)                    | 170,5±34,9                              | 176,8±47,7                                | 0,034            |
| LDL (mg/dL)                                 | 129,7±33,9                              | 119,1±36,0                                | NS               |
| HDL (mg/dL)                                 | 42,1±10,25                              | 57,2±9,8                                  | <0,001           |
| Triglicéridos (mg/dL)                       | 158,8±103                               | 119,0±38,5                                | 0,002            |
| Troponina T (ng/L)                          | 4331±4430                               | NR  | NA               |
| <b>Variables hematológicas (media ± SD)</b> |   |   |                  |
| Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μl)            | 9,46±3,7                                | 6,36±1,7                                  | <0,001           |
| Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μl)           | 6,68±3,6                                | 3,48±1,0                                  | <0,001           |
| Neutrófilos (%)                             | 67,7±10,9                               | 54,2±8,4                                  | <0,001           |
| Linfocitos (10 <sup>3</sup> /μl)            | 1,8±0,8                                 | 2,51±0,8                                  | 0,01             |
| Linfocitos (%)                              | 21,9±8,5                                | 35,1±8,8                                  | <0,001           |
| Monocitos (10 <sup>3</sup> /μl)             | 0,64±0,2                                | 0,45±0,1                                  | <0,001           |
| Monocitos (%)                               | 7,4±2,6                                 | 7,2±1,8                                   | NS               |

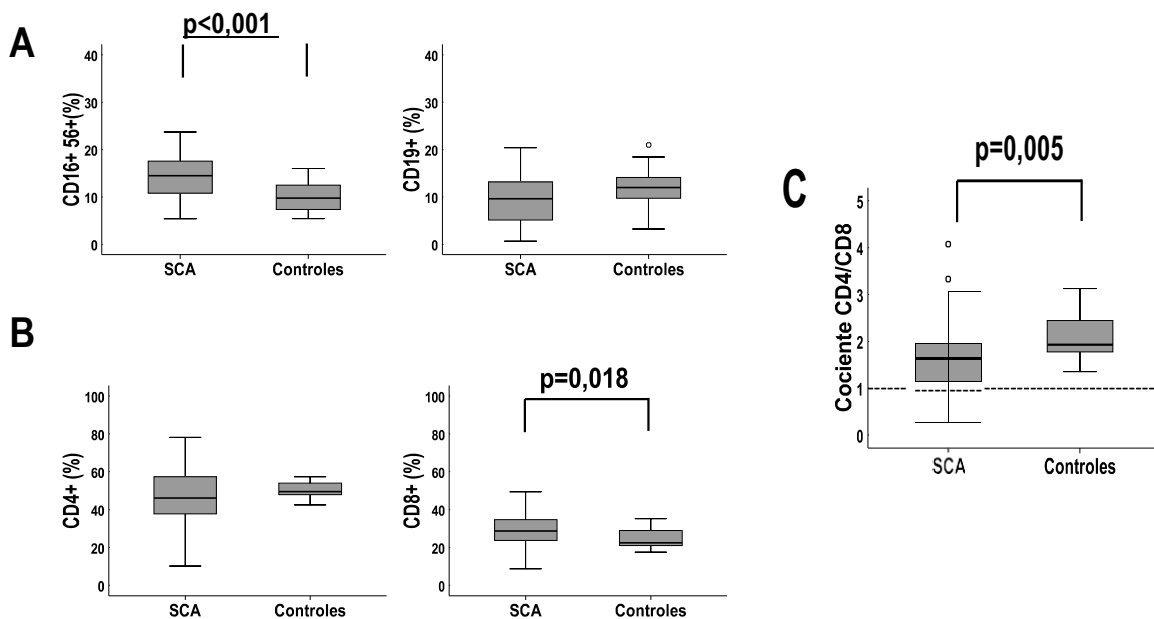
SD, desviación estándar.

NA, no aplicable.

NR, no realizado.

NS, no significativo.

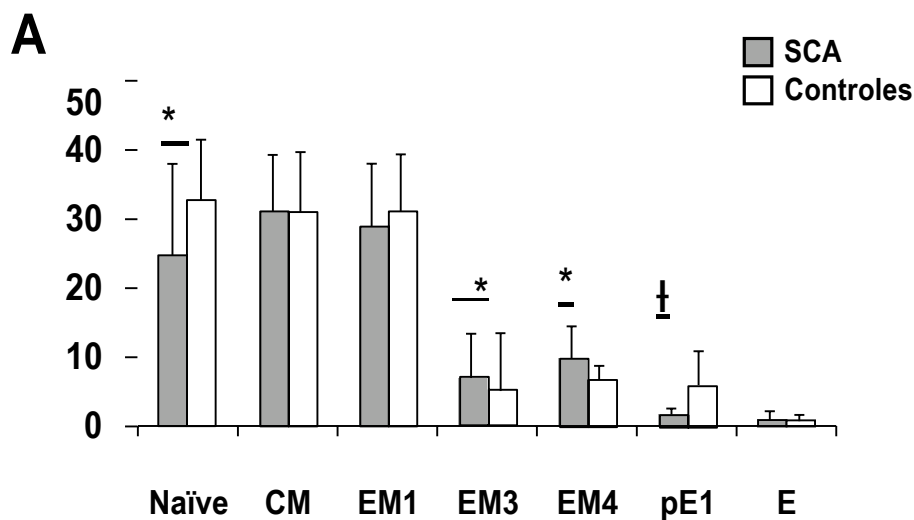
El fenotipo inmunológico de las subpoblaciones de linfocitos reveló que el grupo de pacientes con SCA presenta un elevado porcentaje de células NK (CD16+CD56+) con respecto al grupo C (*t* de Student,  $p < 0,001$ ), mientras que el porcentaje de células B (CD19+) no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 11A). Respecto a las poblaciones de células T, no se encontraron diferencias en el porcentaje de células T CD4+, sin embargo, se observó un aumento en las células T CD8+ en pacientes con SCA (*t* de Student:  $p = 0,018$ ) (Figura 11B). Uno de los parámetros que define el perfil de riesgo inmunológico (IRP) es el cociente invertido CD4/CD8 (cociente  $< 1$ ). Un gran número de pacientes con SCA presentan un cociente invertido CD4/CD8 con respecto al grupo control (Método *U* de Mann-Whitney:  $p = 0,005$ ) (Figura 11C). En resumen, estos resultados demuestran que los pacientes con SCA exhiben un perfil más diferenciado en sus subpoblaciones de leucocitos y linfocitos en comparación con los individuos sanos.

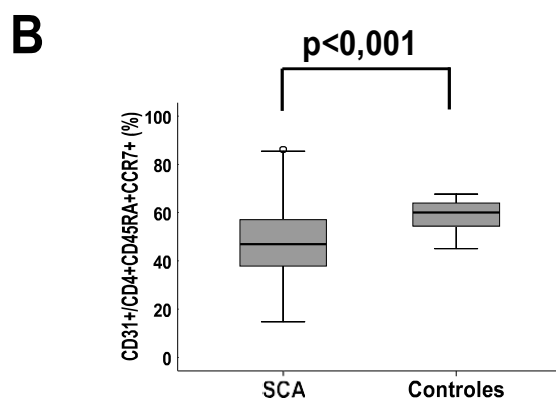


**Figura 11.** Fenotipo inmunológico en sangre periférica. El número de individuos en cada grupo fue el siguiente SCA= 52, C=50. A, Se comparó el porcentaje de células CD16+CD56+ y células CD19+ en sangre total de ambos grupos. Las células fueron teñidas con “Multiset CD3-FITC/CD6+56-PE/CD45-PerCP/CD19-APC” y el porcentaje de células CD16+56+ y CD19+ fue analizado en la ventana CD45+. El porcentaje de células T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ fue determinado y comparado entre los grupos. Las células fueron marcadas con anti-CD3-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD8-PerCP y anti-CD4-APC. Los valores atípicos están representados con círculos, calculados añadiendo 1,5 veces el rango intercuartílico al percentil 75. C, se calculó el cociente CD4/CD8. Los individuos por debajo de la línea de puntos muestran un cociente invertido de CD4/CD8 ( $< 1$ ). La prueba *t* de Student fue utilizada para datos normales, mientras que el método no paramétrico *U* de Mann-Whitney se utilizó en datos que no presentaban normalidad. Los valores de *p*- se representan en los paneles.

## 4.2 Diferenciación de células T CD4+.

Uno de los modelos más ampliamente aceptados en inmunosenescencia es que el compartimento de células T CD4+ se deteriora con la edad. Las células T CD4+ se pueden separar en poblaciones funcionalmente distintas, utilizando distintas combinaciones de marcadores de la superficie celular como el CD45RA, el CCR7, el CD27 y el CD28, como se ha comentado anteriormente. Para detectar cualquier posible asociación entre el SCA y el grado de diferenciación de las subpoblaciones de células T CD4+ se comparó su distribución en ambos grupos. El análisis de estas subpoblaciones reveló que el SCA se relaciona con subpoblaciones no diferenciadas más reducidas (naïve y pE1) y un aumento en las subpoblaciones altamente diferenciadas (EM3, EM4) (Figura 12A) con respecto al grupo control. Para corroborar las diferencias encontradas en el grado de diferenciación de las subpoblaciones de células T CD4+, se evaluó el contenido de emigrantes recientes del timo, que expresan CCR7+CD45RA+ y CD31+, esta co-expresión es alta en células T CD45RA+ en sujetos jóvenes, pero disminuye continuamente durante el envejecimiento. Examinamos si las frecuencias de células CD45RA+ que co-expresan la molécula CD31+ cambian entre los dos grupos del estudio. La subpoblación CD31+CD45RA+ fue significativamente mayor en el grupo control con respecto al grupo de pacientes con SCA (*t* de Student:  $p < 0,001$ ) (Figura 12B). Estos resultados indican que los pacientes con SCA muestran un alto grado de diferenciación con respecto a los controles sanos.

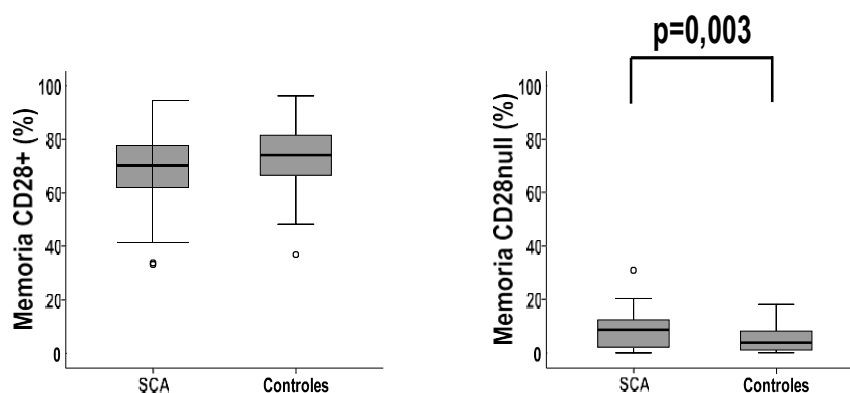




**Figura 12.** Distribución de las células T CD4+ entre naïve, memoria central (CM) y subpoblaciones de EM y EMRA definidas por la expresión de CD27 y CD28. La expresión de CD45RA, CCR7, CD27 y CD28 fue analizada mediante citometría de flujo en las células T CD4+ de los grupos estudiados. (A) Las células T CD4+ en los grupos (SCA: barras grises y C: barras blancas). (B) Frecuencia de células T CD4+ CD31+ de los grupos estudiados. La prueba *t* de Student fue usada para comparar las células CD45RA+CD31+ en pacientes con SCA con respecto al grupo control. Los datos son media  $\pm$  el error estándar de la media. \*  $p < 0,05$  and <sup>†</sup> $p < 0,001$ , respectivamente.

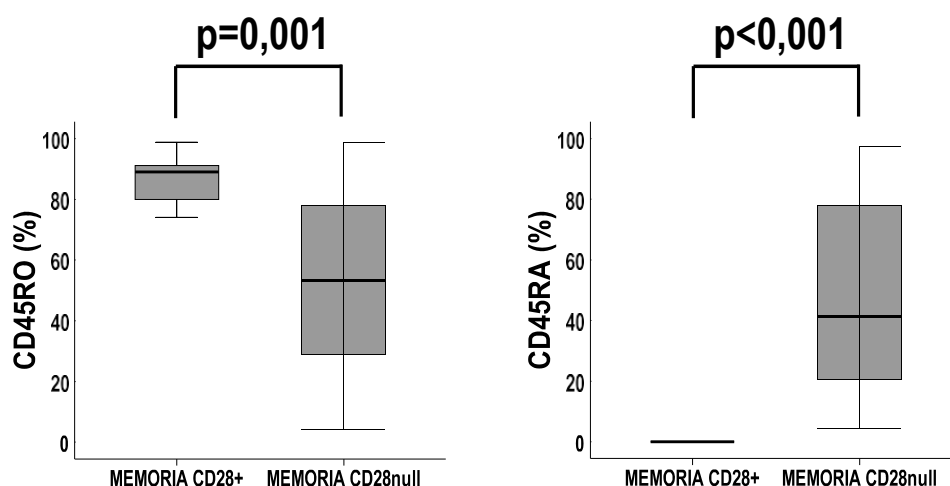
### 4.3 Diferenciación de las células T CD4+ de memoria.

Como pudimos ver en el apartado anterior las poblaciones memoria presentan diferencias significativas entre los pacientes con SCA y los controles. Cuando comparamos estas poblaciones en los dos grupos de estudio (SCA, controles), teniendo en cuenta la expresión de la molécula co-estimuladora CD28, no encontramos diferencias significativas entre las poblaciones de linfocitos T CD4+ de memoria CD28+ (subpoblaciones CM, EM1, EM4), pero si vimos un aumento significativo de la población de memoria CD28<sup>null</sup> (EM3, E) más diferenciada que la población de memoria CD28+ en pacientes con SCA (método no paramétrico *U* de Mann-Whitney,  $p = 0,003$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Poblaciones de linfocitos T de memoria CD4+CD28+ y CD4+CD28<sup>null</sup> en los dos grupos de estudio (SCA y controles) teniendo en cuenta la expresión de la molécula co-estimuladora CD28.

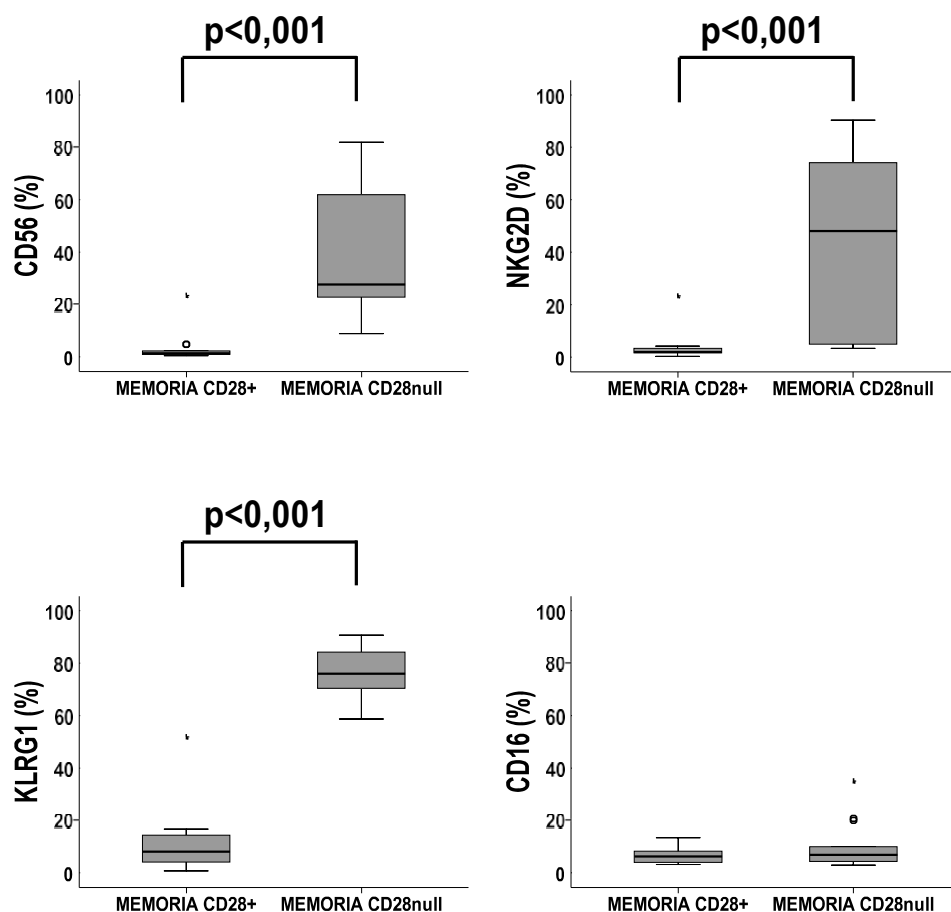
Para evaluar las posibles diferencias entre las células de memoria en el compartimento de las células T CD4<sup>+</sup> en los pacientes con SCA, se compararon los cambios fenotípicos que se producen en células de memoria CD28<sup>null</sup> y CD28<sup>+</sup>, ambas asociadas con diferentes respuestas inmunes. Para ello, se midió la capacidad de maduración de las células T utilizando la expresión del marcador CD45RO, el cual se encuentra más elevado en poblaciones de memoria menos diferenciadas con respecto a las poblaciones más diferenciadas (*t* de Student:  $p=0,001$ ) (Figura 14). Estos resultados indican que las células diferenciadas en fase terminal pierden de forma gradual la expresión de CD45RO a medida que recuperan la expresión de CD45RA. La expresión de CD45RA fue significativamente mayor en el grupo de células T de memoria CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> con respecto a las células T de memoria CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (*t* de Student:  $p<0,001$ ).



**Figura 14.** Expresión de CD45RO y CD45RA en ambos grupos de células T CD4<sup>+</sup> de memoria. Las células de sangre total fueron marcadas con CD45RO y CD45RA y su expresión fue evaluada mediante citometría de flujo.

Por otro lado, se evaluó la expresión de marcadores relacionados con el envejecimiento celular, CD56, NKG2D, KLRG1 y CD16 en ambos grupos de células T CD4<sup>+</sup> de memoria. Los resultados indican que las expresiones de los marcadores relacionados con el envejecimiento se encuentran significativamente más altos en poblaciones de memoria más diferenciadas con respecto a las subpoblaciones de memoria menos diferenciadas (prueba no paramétrica *U* de Mann Whitney:  $p<0,001$  para CD56,  $p<0,001$  para NKG2D,  $p<0,001$  para KLRG1), excepto en el caso del marcador CD16 donde no se encontraron diferencias significativas (Figura 15).

Los resultados obtenidos muestran que los marcadores relacionados con una mayor diferenciación celular y que normalmente se encuentran en las células NK presentan mayor expresión en las células T CD4+ de memoria más diferenciadas, indicando que tienen un fenotipo más diferenciado, más senescente.

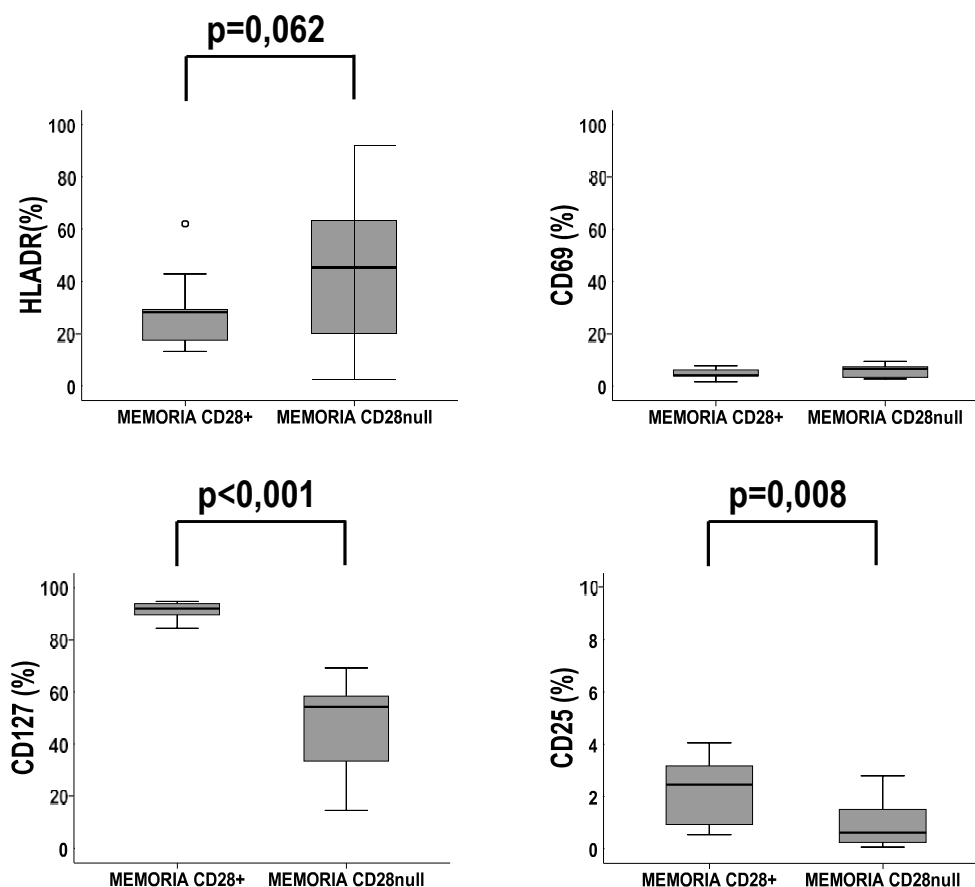


**Figura 15.** Expresión de los marcadores de diferenciación celular, CD56, NKG2D, KLRG1 y CD16 en ambos grupos de células T CD4+ de memoria. Las células de sangre total fueron marcadas con los marcadores anteriormente mencionadas y su expresión fue evaluada mediante citometría de flujo. Los datos que presentaban normalidad fueron evaluados mediante la prueba *t* de Student y aquellos que no presentaban normalidad fueron evaluados mediante el método *U* de Mann-Whitney.

También estudiamos algunos de los marcadores de activación más representativos en ambos grupos de células T CD4+ de memoria, comparando la expresión basal de HLA-DR, CD69, CD127 y CD25 (*t* de Student,  $p=0,062$  para HLA-DR,  $p<0,001$  para CD127 y la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney,  $p=0,008$  para CD25) (Figura 16). Los resultados indican que la expresión del marcador HLA-DR es mayor en las poblaciones de memoria CD28<sup>null</sup> con respecto a las poblaciones de memoria CD28+, la expresión de CD69 no mostró diferencias entre ambos grupos de células T CD4+ de memoria,



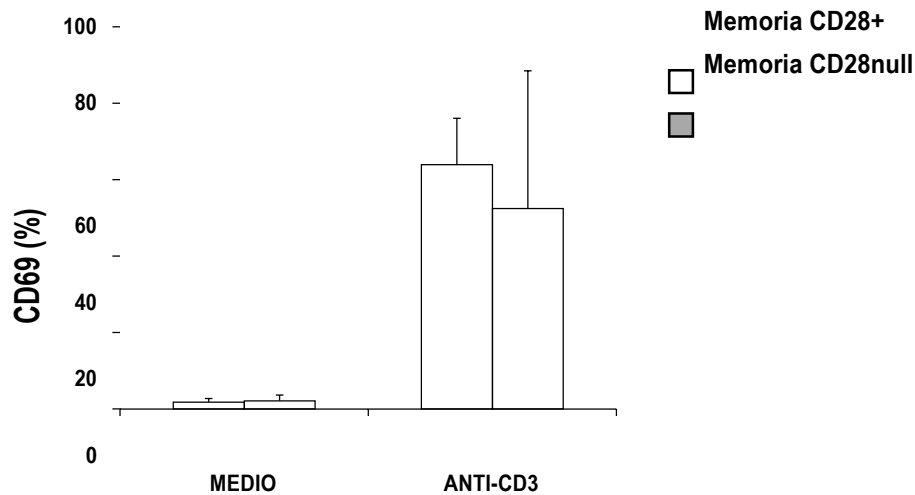
mientras que la expresión de CD127 y CD25 fue significativamente mayor en las subpoblaciones de memoria CD28+ con respecto a las CD28<sup>null</sup>.



**Figura 16.** Expresión de marcadores de activación en ambos grupos de células T CD4+. Las células de la sangre total fueron marcadas con HLA-DR, CD69, CD127 y CD25. Los datos fueron evaluados con la prueba *t* de Student cuando eran normales, mientras que para aquellos que no presentaban normalidad se utilizó la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney.

#### 4.4 Activación celular *in vitro* de las células T CD4+ de memoria.

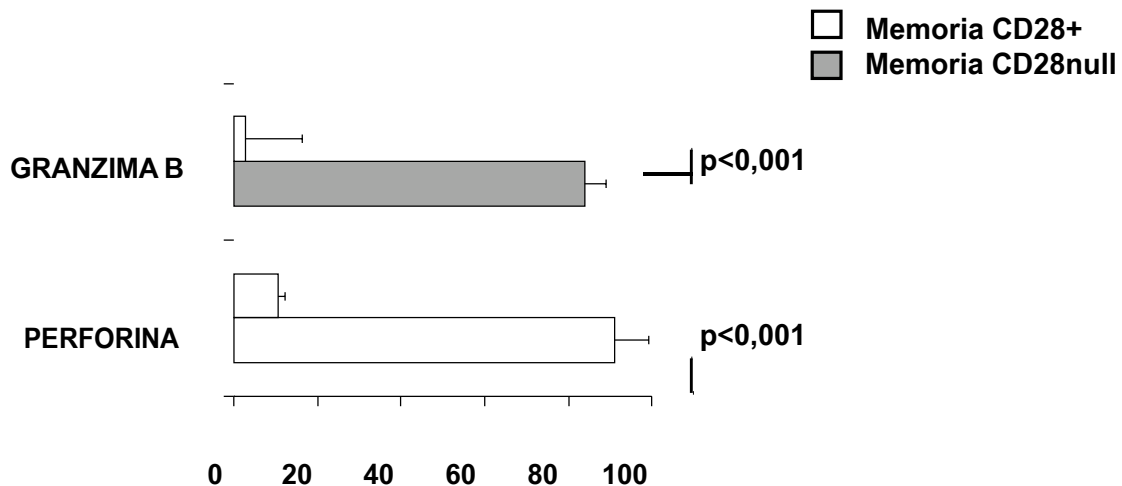
Para comprobar si los cambios fenotípicos encontrados en los estudios anteriores se corroboraban en una capacidad funcional alterada analizamos la expresión del marcador de activación precoz CD69 en cultivos sin estimulación y en presencia del activador policlonal anti-CD3. Los resultados no muestran diferencias significativas en la expresión de CD69 tanto en medio como en presencia de anti-CD3 entre ambos grupos de células, sin embargo, la expresión de CD69 fue mayor en presencia de anti-CD3 (Figura 17).



**Figura 17.** Expresión de CD69 en ambos grupos de células T CD4+ de memoria. Las células mononucleares aisladas de sangre periférica fueron cultivadas durante 18h en medio y en presencia de anti-CD3 y posteriormente se evaluó la expresión de CD69 mediante citometría de flujo. La prueba *t* de Student fue utilizada para comparar las frecuencias de expresión entre ambos grupos de células T CD4+.

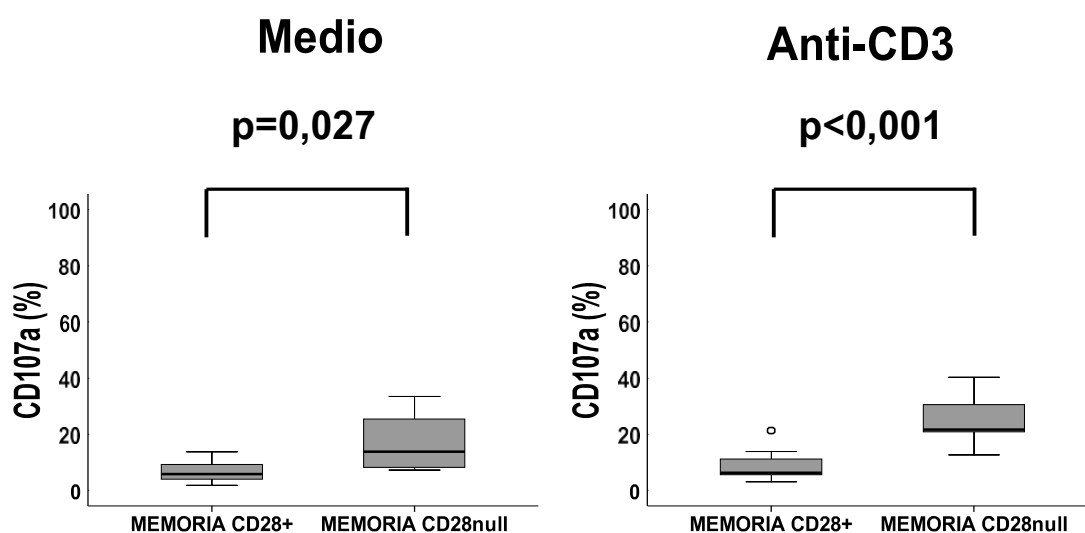
#### 4.5 Capacidad citotóxica *in vitro* de las poblaciones de linfocitos T de memoria CD4+.

Las células T CD4+ no han sido clásicamente consideradas células citotóxicas, aunque se ha descrito que las células T CD4+CD28<sup>null</sup> presentan gránulos intracitoplasmáticos de granzima B y perforina (Appay et al., 2002). En nuestro estudio, la expresión de granzima B y perforina fue significativamente superior en el grupo de células T CD4+ de memoria CD28<sup>null</sup> con respecto a las CD28+ (prueba no paramétrica *U* de Mann Whitney:  $p < 0,001$  para granzima B y  $p < 0,001$  para perforina) (Figura 18).



**Figura 18.** La expresión de granzima B y perforina fue determinada mediante el marcaje intracelular realizado en células T CD4+ de memoria más y menos diferenciadas.

Los gránulos de granzima y perforina se contienen en los lisosomas unidos a proteínas de membrana asociadas a éstos (LAMP). Estas proteínas no están presentes normalmente en la superficie de las células T, pero se exponen solo durante la degranulación. Para medir la degranulación celular se mide la expresión de CD107a (LAMP-1), el cual ha sido descrito como un buen marcador de la actividad celular citotóxica (Aktas et al., 2009). Las células mononucleares aisladas de sangre periférica fueron cultivadas durante 5 horas en medio de cultivo solo y en presencia de anti-CD3. Tanto en medio como en presencia de anti-CD3, la expresión de CD107a mostró diferencias significativas, siendo superior en el grupo de células T CD4+ de memoria altamente diferenciadas (*t* de Student:  $p=0,027$  en medio y  $p<0,001$  en presencia de anti-CD3) (Figura 19).

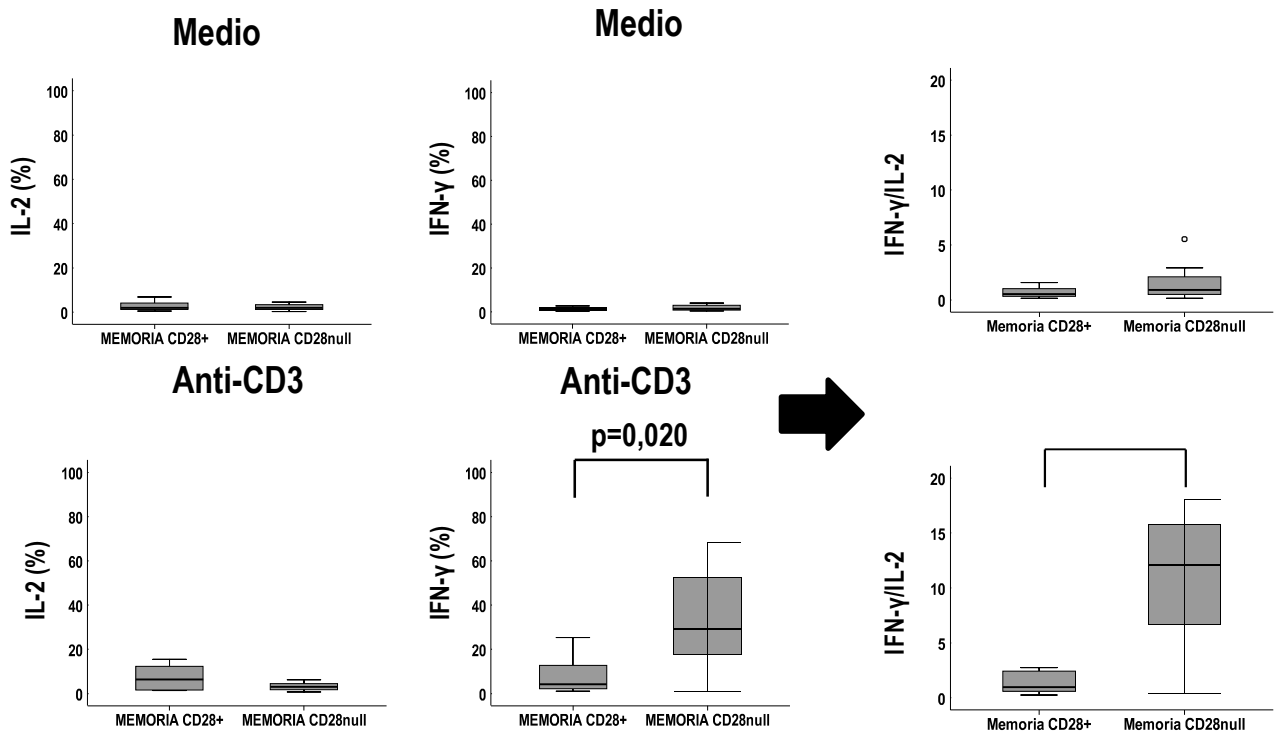


**Figura 19.** Degranulación celular en ambos grupos de células T CD4+ de memoria. (B) Cultivamos células mononucleares de sangre periférica en medio y en presencia de anti-CD3 durante 5 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de CD107a en la superficie celular mediante citometría de flujo. La prueba *t* de Student fue utilizada para comparar la expresión de éste.

#### 4.6 Producción intracelular de citocinas.

La producción intracelular de IFN- $\gamma$  e IL-2 fue evaluada en ambos grupos de células T CD4+ de memoria. La frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 en medio no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, siendo prácticamente indetectables. En presencia de anti-CD3, la producción de IL-2 no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de células, mientras que la producción de IFN- $\gamma$  fue superior en células T CD4+ de memoria más diferenciadas (*t* de Student:  $p=0,020$ ). El

cociente  $IFN-\gamma/IL-2$  es un marcador de diferenciación de linfocitos T, en presencia de anti-CD3 mostró diferencias significativas, siendo superior en las células de memoria más diferenciadas (método *U* de Mann-Whitney,  $p=0,007$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** La producción de  $IFN-\gamma$  e  $IL-2$  fue analizada en ambos grupos de células T  $CD4^+$  de memoria en medio y en presencia de anti-CD3. También, se calculó el cociente  $IFN-\gamma/IL-2$  en ambos grupos de células tanto en medio como en presencia de anti-CD3. La prueba *t* de Student se utilizó para comparar los datos que presentaban normalidad y el método *U* de Mann Whitney para aquellos que no presentaban normalidad.

## 5 Discusión.

El SCA es la manifestación más frecuente y nociva de las enfermedades cardiovasculares (Botnar, 2009), engloba la angina de pecho inestable, el infarto agudo de miocardio y la muerte súbita, que se producen en respuesta a la inflamación vascular, la ruptura de la placa de ateroma y la posterior trombosis (Braunwald, 1998). La respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso aterosclerótico, sino que también contribuye al posterior crecimiento de la placa de ateroma y la precipitación de sucesos trombóticos agudos (Libby, 2002; Ross, 1999). El grado de inmunosenescencia se asocia con la comorbilidad presente en los pacientes con SCA (Maeder, 2014). La condición inflamatoria que produce el envejecimiento de la respuesta inmune adaptativa hace que estos pacientes sean más susceptibles y tengan menos respuestas a ciertas infecciones relacionadas con personas de edad avanzada (Sacks, 2011; Udell et al., 2013). Al mismo tiempo esta inmunodepresión favorece el contacto repetido con antígenos, a través de la reactivación crónica de estos patógenos o de recientes infecciones, incrementando así el grado de inmunosenescencia y con ello, la inmunosupresión y la comorbilidad asociada a la enfermedad (Moro-Garcia et al., 2015).

En nuestro estudio hemos encontrado diferencias significativas en el número absoluto de leucocitos y en el porcentaje y número de neutrófilos y linfocitos. Recientes estudios, han demostrado que el elevado número de leucocitos es un indicador de la presencia de infección e inflamación y juega un importante papel en la aterogénesis, la ruptura de la placa aterosclerótica y la trombosis (Madjid et al., 2004). Por otro lado, otro indicador de la inflamación sistémica es el cociente N/L (neutrófilos/linfocitos), este cociente predice la mortalidad a largo plazo en pacientes ingresados con infarto agudo de miocardio y con elevación del segmento ST (Nunez et al., 2008; Zahorec, 2001). Además, está más asociado con la mortalidad en pacientes con síndromes coronarios estables e inestables que el elevado número de leucocitos (Papa et al., 2008; Tamhane et al., 2008). Tanto el número de leucocitos como el cociente N/L fue mayor en nuestro grupo de pacientes con SCA con respecto al grupo control, esto podría explicar la incrementada inflamación y la progresión del proceso aterosclerótico.

Las subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> presentaron diferencias significativas entre pacientes con SCA y el grupo control, las células menos diferenciadas como las

células T CD4+ naïve se encontraron más aumentadas en el grupo control. Esto, podría deberse a que la respuesta del sistema inmune adaptativo en enfermedades ateroscleróticas se puede iniciar por el reconocimiento antigénico de las células T naïve y que posteriormente habría una rápida expansión clonal y diferenciación de las células T naïve a células efectoras. Siguiendo con la diferenciación a células T de memoria capaces de responder a un futuro contacto antigénico (McKinstry et al., 2010). Para corroborar las diferencias encontradas en las subpoblaciones de células T CD4+, se evaluó el porcentaje de células T CD4+ naïve con expresión de CD31+. Los controles se asociaron con poblaciones celulares más inmaduras y con una alta frecuencia de células con co-expresión de CD45RA y CD31, mientras que en el grupo de pacientes con SCA estas poblaciones de células se encontraron más reducidas. Se sabe que la frecuencia de estas células T CD4+ inmaduras disminuye a medida que aumenta la edad (Kohler and Thiel, 2009).

La expresión de CD28 distingue dos tipos de células T CD4+ con diferentes propiedades funcionales y estado de diferenciación. Las células T CD4+CD28<sup>null</sup> expresan en gran proporción marcadores como CD45RA, CD56, NKG2D, KLRG1, HLA-DR, granzima B y perforina, pero reducida expresión de CD127 y CD25. Por lo tanto, las células T CD4+CD28<sup>null</sup> muestran propiedades de células NK y/o linfocitos T CD8+ citotóxicos y además presentan gránulos intracitoplasmáticos de granzima B y perforina. En contraste, las células T CD4+CD28+ muestran expresión de CD25 y CD127, pero, disminuida la expresión de HLA-DR y ausencia de granzima B y perforina. La expresión de HLA-DR nos permite determinar que las células más diferenciadas se encuentran más activadas basalmente que las menos diferenciadas, quizás debido a una continua estimulación antigénica. Por otro lado, las células menos diferenciadas expresan más el receptor de IL-7 (CD127) y el receptor de IL-2 (CD25), el receptor de IL-7 se ha asociado con un incremento en la supervivencia y proliferación de los linfocitos T naïve. En cuanto al receptor de IL-2 (CD25), su expresión se encuentra disminuida en linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup>, además se sabe que la producción de IL-2 disminuye con la edad. Recientes estudios han demostrado que el receptor de células NK, el NKG2D podría estar jugando un importante papel en la aterosclerosis, ya que la elevada expresión de sus ligandos ha sido descrita en aortas ateroscleróticas y la inhibición de la interacción entre NKG2D y sus ligandos inhibe la formación de la placa y la inflamación local y sistémica

en situaciones de dislipemia y disglucemia (Xia et al., 2011).

La población celular CD4<sup>+</sup> de memoria CD28<sup>null</sup> presentó un aumento muy significativo de los gránulos intracitoplasmáticos de perforina y granzima B. Además, las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> también presentaron una elevada expresión del marcador CD107a respecto a las células T de memoria CD28<sup>+</sup>, su expresión aumenta cuando se estimulan las células vía TCR con anti-CD3. La expresión de CD107a (LAMP-1) ha sido descrita como un buen marcador de la actividad celular citotóxica (Aktas et al., 2009). Por todo esto, podemos afirmar que estas células de memoria CD28<sup>null</sup> presentan características propias de células citotóxicas (NKs, CD8<sup>+</sup>), además hemos comprobado que estas células no solo expresan las moléculas citotóxicas perforina y granzima B, sino que también son capaces de secretarla al medio, cosa que hemos demostrado mediante la cuantificación del marcador CD107a.

En cuanto a la expresión del marcador de activación CD69 tanto en sangre total a nivel basal como en células mononucleares aisladas de sangre periférica en cultivo no se encontraron diferencias. Sin embargo, la expresión de CD69 en células mononucleares aisladas de sangre periférica fue mayor cuando se estimuló a través del TCR con anti-CD3, lo que demuestra que ambas poblaciones incrementan su capacidad de retención una vez que se han encontrado con su antígeno específico. CD69 es un marcador utilizado para detectar la activación de las células T de forma temprana después de la exposición a un estímulo y, además media la retención de los linfocitos activados en los órganos linfoides secundarios (Craston et al., 1997; Grigorova et al., 2010; Grigorova et al., 2009).

La producción de IFN- $\gamma$  fue mayor en las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en presencia de anti-CD3 y el cociente IFN- $\gamma$ /IL-2 también se encontró aumentado en esta población. La producción de IL-2 es alta en las etapas tempranas de diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup>, predominando su producción en células T de memoria central, mientras que la producción de IFN- $\gamma$  está presente en todas las etapas de diferenciación celular, pero más aumentada en estadios finales en los que las células T pierden la capacidad de producir IL-2, predominando así en las células T de memoria efectora (Harari et al., 2005). Este cociente refleja el tipo de respuesta de las células T CD4<sup>+</sup> (Sallusto et al., 1999). Se postula que una alta relación IFN- $\gamma$ /IL-2 indica predominio de células T efectoras y

células T de memoria efectora, como resultado de la estimulación inmunológica consecuencia de una infección persistente en curso (Schoffelen et al., 2015). Por lo tanto, un cociente IFN- $\gamma$ /IL-2 aumentado indica una mayor diferenciación celular.

Se postula que las células T CD4+CD28<sup>null</sup> podrían presentar una alta especificidad por los antígenos localizados en las placas ateroscleróticas, como la LDL-oxidada, las proteínas de choque térmico, y los agentes infecciosos como *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* y el Citomegalovirus (CMV). Estos antígenos favorecen la activación de los linfocitos T y la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como, la IL-1, el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  (Almanzar et al., 2012; Kol et al., 1999; Stemme et al., 1995; Streblow et al., 2008). La elevada producción de IFN- $\gamma$  juega un papel importante en la desestabilización de la placa aterosclerótica, por un lado, una de sus funciones es activar a los monocitos y macrófagos y por otro lado inhibir la proliferación de células del músculo liso y reducir la síntesis de colágeno (Grivel et al., 2011). Los monocitos una vez en la pared arterial adquieren las propiedades típicas de los macrófagos de los tejidos y secretan especies reactivas de oxígeno, citocinas pro-inflamatorias, metaloproteinasas, factor de crecimiento y factor tisular, lo que conlleva a la degradación del colágeno y la matriz extracelular, debilitando así la estructura de la placa de ateroma y predisponiéndola a su ruptura (Leatham et al., 1995; Wilcox et al., 1989). Además, estos linfocitos T CD4+CD28<sup>null</sup> contribuyen a potenciar la respuesta inflamatoria y el daño tisular como consecuencia de su elevada capacidad citotóxica y su bajo umbral de activación, pudiendo así desestabilizar la placa (Zal et al., 2004).

En resumen, podemos afirmar que, en comparación con el resto de linfocitos T CD4 de memoria, las células T CD4+CD28<sup>null</sup> presentan características de células altamente diferenciadas, muy cercanas funcionalmente a las células NK y linfocitos T CD8+ citotóxicos. Además, esta población celular produce IFN- $\gamma$  en altas cantidades, el cual podría jugar un papel predominante en la desestabilización y ruptura de la placa.



## 6 Conclusiones.

- En pacientes con SCA, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentan un fenotipo más diferenciado que los individuos control.
- Los linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> expresan receptores relacionados con la diferenciación y que normalmente se encuentran en células citotóxicas como las células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.
- Las células T de memoria CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> presentan una elevada expresión de granzima B, perforina y CD107a con respecto a las células T de memoria CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>.
- En respuesta a anti-CD3 los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> presentan una mayor activación y producción de IFN- $\gamma$  con un cociente IFN- $\gamma$ /IL-2 aumentado respecto a la población de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>.

## 7 Bibliografia.

- Aktas, E., Kucuksezer, U.C., Bilgic, S., Erten, G., Deniz, G., 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 254, 149-154.
- Alber, H.F., Duftner, C., Wanitschek, M., Dorler, J., Schirmer, M., Suessenbacher, A., Frick, M., Dichtl, W., Pachinger, O., Weidinger, F., 2009. Neopterin, CD4+CD28- lymphocytes and the extent and severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol* 135, 27-35.
- Almanzar, G., Ollinger, R., Leuenberger, J., Onestingel, E., Rantner, B., Zehm, S., Cardini, B., van der Zee, R., Grundtman, C., Wick, G., 2012. Autoreactive HSP60 epitope-specific T-cells in early human atherosclerotic lesions. *J Autoimmun* 39, 441-450.
- Alonso-Arias, R., Moro-Garcia, M.A., Vidal-Castineira, J.R., Solano-Jaurrieta, J.J., Suarez-Garcia, F.M., Coto, E., Lopez-Larrea, C., 2011. IL-15 preferentially enhances functional properties and antigen-specific responses of CD4+CD28(null) compared to CD4+CD28+ T cells. *Aging Cell* 10, 844-852.
- Alves, N.L., Richard-Le Goff, O., Huntington, N.D., Sousa, A.P., Ribeiro, V.S., Bordack, A., Vives, F.L., Peduto, L., Chidgey, A., Cumano, A., Boyd, R., Eberl, G., Di Santo, J.P., 2009. Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1512-1517.
- Allez, M., Tieng, V., Nakazawa, A., Treton, X., Pacault, V., Dulphy, N., Caillat-Zucman, S., Paul, P., Gornet, J.M., Douay, C., Ravet, S., Tamouza, R., Charron, D., Lemann, M., Mayer, L., Toubert, A., 2007. CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology* 132, 2346-2358.
- Ammirati, E., Monaco, C., Norata, G.D., 2012. Antigen-dependent and antigen-independent pathways modulate CD4+CD28null T-cells during atherosclerosis. *Circ Res* 111, e48-49; author reply e50-41.
- Antman, E.M., Anbe, D.T., Armstrong, P.W., Bates, E.R., Green, L.A., Hand, M., Hochman, J.S., Krumholz, H.M., Kushner, F.G., Lamas, G.A., Mullany, C.J., Ornato, J.P., Pearle, D.L., Sloan, M.A., Smith, S.C., Jr., Alpert, J.S., Anderson, J.L., Faxon, D.P., Fuster, V., Gibbons, R.J., Gregoratos, G., Halperin, J.L., Hiratzka, L.F., Hunt, S.A., Jacobs, A.K., 2004. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction; A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol* 44, E1-E211.
- Anwar, A., Zahid, A.A., Scheidegger, K.J., Brink, M., Delafontaine, P., 2002. Tumor necrosis factor-alpha regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle. *Circulation* 105, 1220-1225.
- Appay, V., Almeida, J.R., Sauce, D., Autran, B., Papagno, L., 2007. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol* 42, 432-437.
- Appay, V., Sauce, D., Prelog, M., 2010. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY)* 2, 78-81.

- Appay, V., Zaunders, J.J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A.J., Cooper, D.A., Rowland-Jones, S.L., Kelleher, A.D., 2002. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 168, 5954-5958.
- Berard, M., Tough, D.F., 2002. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology* 106, 127-138.
- Bonafe, M., Olivieri, F., Cavallone, L., Giovagnetti, S., Mayegiani, F., Cardelli, M., Pieri, C., Marra, M., Antonicelli, R., Lisa, R., Rizzo, M.R., Paolisso, G., Monti, D., Franceschi, C., 2001. A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 31, 2357-2361.
- Borrego, F., Robertson, M.J., Ritz, J., Pena, J., Solana, R., 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97, 159-165.
- Borst, J., Coligan, J.E., Oettgen, H., Pessano, S., Malin, R., Terhorst, C., 1984. The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature* 312, 455-458.
- Botnar, R.M., 2009. Coronary plaque characterization by T (1)-weighted cardiac magnetic resonance. *JACC Cardiovasc Imaging* 2, 729-730.
- Boyman, O., Purton, J.F., Surh, C.D., Sprent, J., 2007. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol* 19, 320-326.
- Bradley, B.A., Takemoto, S., Gjertson, D., Reed, E., Cecka, M., 2001. Elderly transplant recipients may require less immunosuppression. *Transplant Proc* 33, 1115-1116.
- Braunwald, E., 1998. Unstable angina: an etiologic approach to management. *Circulation* 98, 2219-2222.
- Bryl, E., Vallejo, A.N., Weyand, C.M., Goronzy, J.J., 2001. Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J Immunol* 167, 3231-3238.
- Burkle, A., Moreno-Villanueva, M., Bernhard, J., Blasco, M., Zondag, G., Hoeijmakers, J.H., Toussaint, O., Grubeck-Loebenstein, B., Mocchegiani, E., Collino, S., Gonos, E.S., Sikora, E., Gradinaru, D., Dolle, M., Salmon, M., Kristensen, P., Griffiths, H.R., Libert, C., Grune, T., Breusing, N., Simm, A., Franceschi, C., Capri, M., Talbot, D., Caiafa, P., Friguet, B., Slagboom, P.E., Hervonen, A., Hurme, M., Aspinall, R., 2015. MARK-AGE biomarkers of ageing. *Mech Ageing Dev* 151, 2-12.
- Candore, G., Caruso, C., Colonna-Romano, G., 2010. Inflammation, genetic background and longevity. *Biogerontology* 11, 565-573.
- Caserta, S., Zamojska, R., 2007. Memories are made of this: synergy of T cell receptor and cytokine signals in CD4(+) central memory cell survival. *Trends Immunol* 28, 245-248.
- Cavaliere, S., Cazzaniga, S., Geuna, M., Magnani, Z., Bordignon, C., Naldini, L., Bonini, C., 2003. Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood* 102, 497-505.

- Cicin-Sain, L., Messaoudi, I., Park, B., Currier, N., Planer, S., Fischer, M., Tackitt, S., Nikolich-Zugich, D., Legasse, A., Axthelm, M.K., Picker, L.J., Mori, M., Nikolich-Zugich, J., 2007. Dramatic increase in naive T cell turnover is linked to loss of naive T cells from old primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19960-19965.
- Cipriano, C., Caruso, C., Lio, D., Giacconi, R., Malavolta, M., Muti, E., Gasparini, N., Franceschi, C., Mocchegiani, E., 2005. The -308G/A polymorphism of TNF-alpha influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases. *Int J Immunogenet* 32, 13-18.
- Cochran, J.R., Aivazian, D., Cameron, T.O., Stern, L.J., 2001. Receptor clustering and transmembrane signaling in T cells. *Trends Biochem Sci* 26, 304-310.
- Craston, R., Koh, M., Mc Dermott, A., Ray, N., Prentice, H.G., Lowdell, M.W., 1997. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. *J Immunol Methods* 209, 37-45.
- Chong, Y., Ikematsu, H., Yamaji, K., Nishimura, M., Nabeshima, S., Kashiwagi, S., Hayashi, J., 2005. CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int Immunol* 17, 383-390.
- de la Hera, A., Muller, U., Olsson, C., Isaaz, S., Tunnacliffe, A., 1991. Structure of the T cell antigen receptor (TCR): two CD3 epsilon subunits in a functional TCR/CD3 complex. *J Exp Med* 173, 7-17.
- DelaRosa, O., Pawelec, G., Peralbo, E., Wikby, A., Mariani, E., Mocchegiani, E., Tarazona, R., Solana, R., 2006. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology* 7, 471-481.
- Della Bella, S., Bierti, L., Presicce, P., Arienti, R., Valenti, M., Saresella, M., Vergani, C., Villa, M.L., 2007. Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin Immunol* 122, 220-228.
- Dorshkind, K., Montecino-Rodriguez, E., Signer, R.A., 2009. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* 9, 57-62.
- Duftner, C., Goldberger, C., Falkenbach, A., Wurzner, R., Falkensammer, B., Pfeiffer, K.P., Maerker-Hermann, E., Schirmer, M., 2003. Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4+CD28- T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 5, R292- 300.
- Dumitriu, I.E., Araguas, E.T., Baboonian, C., Kaski, J.C., 2009. CD4+ CD28 null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. *Cardiovasc Res* 81, 11-19.
- Dumitriu, I.E., Baruah, P., Finlayson, C.J., Loftus, I.M., Antunes, R.F., Lim, P., Bunce, N., Kaski, J.C., 2012. High levels of costimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterize CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndrome. *Circ Res* 110, 857-869.
- Falk, E., Nakano, M., Bentzon, J.F., Finn, A.V., Virmani, R., 2013. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J* 34, 719-728.

- Ferguson, F.G., Wikby, A., Maxson, P., Olsson, J., Johansson, B., 1995. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50, B378-382.
- Flores, K.G., Li, J., Sempowski, G.D., Haynes, B.F., Hale, L.P., 1999. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J Clin Invest* 104, 1031-1039.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G., 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908, 244-254.
- Franceschi, C., Campisi, J., 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1, S4-9.
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M.P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G.C., Salvioli, S., 2007. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 128, 92-105.
- Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., Cossarizza, A., 1995. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* 16, 12-16.
- Franceschi, C., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cardelli, M., Cavallone, L., Capri, M., Salvioli, S., Valensin, S., De Benedictis, G., Di Iorio, A., Caruso, C., Paolisso, G., Monti, D., 2005. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech Ageing Dev* 126, 351-361.
- Frasca, D., Blomberg, B.B., 2011. Aging affects human B cell responses. *J Clin Immunol* 31, 430-435.
- Frasca, D., Landin, A.M., Lechner, S.C., Ryan, J.G., Schwartz, R., Riley, R.L., Blomberg, B.B., 2008. Aging down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells. *J Immunol* 180, 5283-5290.
- Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Fortin, C., Guerard, K.P., Lesur, O., Khalil, A., Dupuis, G., 2004. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3, 217-226.
- Fulop, T., Larbi, A., Hirokawa, K., Mocchegiani, E., Lesourds, B., Castle, S., Wikby, A., Franceschi, C., Pawelec, G., 2007. Immunosupportive therapies in aging. *Clin Interv Aging* 2, 33-54.
- Fuster, V., Steele, P.M., Chesebro, J.H., 1985. Role of platelets and thrombosis in coronary atherosclerotic disease and sudden death. *J Am Coll Cardiol* 5, 175B-184B.
- Gavazzi, G., Krause, K.H., 2002. Ageing and infection. *Lancet Infect Dis* 2, 659-666.
- Grigorova, I.L., Panteleev, M., Cyster, J.G., 2010. Lymph node cortical sinus organization and relationship to lymphocyte egress dynamics and antigen exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20447-20452.

- Grigorova, I.L., Schwab, S.R., Phan, T.G., Pham, T.H., Okada, T., Cyster, J.G., 2009. Cortical sinus probing, S1P1-dependent entry and flow-based capture of egressing T cells. *Nat Immunol* 10, 58-65.
- Grivel, J.C., Ivanova, O., Pinegina, N., Blank, P.S., Shpektor, A., Margolis, L.B., Vasilieva, E., 2011. Activation of T lymphocytes in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2929-2937.
- Gross, J.A., St John, T., Allison, J.P., 1990. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol* 144, 3201-3210.
- Gruver, A.L., Hudson, L.L., Sempowski, G.D., 2007. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 211, 144- 156.
- Hadrup, S.R., Strindhall, J., Kollgaard, T., Seremet, T., Johansson, B., Pawelec, G., thor Straten, P., Wikby, A., 2006. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus- specific T cells in the very elderly. *J Immunol* 176, 2645-2653.
- Hakim, F.T., Memon, S.A., Cepeda, R., Jones, E.C., Chow, C.K., Kasten-Sportes, C., Odom, J., Vance, B.A., Christensen, B.L., Mackall, C.L., Gress, R.E., 2005. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 115, 930-939.
- Hale, J.S., Boursalian, T.E., Turk, G.L., Fink, P.J., 2006. Thymic output in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8447-8452.
- Hansson, G.K., Libby, P., 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6, 508-519.
- Harari, A., Vallelian, F., Meylan, P.R., Pantaleo, G., 2005. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 174, 1037-1045.
- Harber, M., Sundstedt, A., Wraith, D., 2000. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2, 1-20.
- Haynes, L., Eaton, S.M., Burns, E.M., Randall, T.D., Swain, S.L., 2005. Newly generated CD4 T cells in aged animals do not exhibit age-related defects in response to antigen. *J Exp Med* 201, 845- 851.
- Howard, W.A., Gibson, K.L., Dunn-Walters, D.K., 2006. Antibody quality in old age. *Rejuvenation Res* 9, 117-125.
- Irving, B.A., Weiss, A., 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64, 891-901.
- Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S., Chan, A.C., Weiss, A., 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263, 1136-1139.
- Janeway, C.A., Jr., Bottomly, K., 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, 275-285.

- Kariv, I., Truneh, A., Sweet, R.W., 1996. Analysis of the site of interaction of CD28 with its counter-receptors CD80 and CD86 and correlation with function. *J Immunol* 157, 29-38.
- Khasawneh, F.T., Shankar, G.S., 2014. Minimizing cardiovascular adverse effects of atypical antipsychotic drugs in patients with schizophrenia. *Cardiol Res Pract* 2014, 273060.
- Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Ozcelik, D., Naumova, E., Pawelec, G., 2008. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing* 5, 6.
- Koch, S., Solana, R., Dela Rosa, O., Pawelec, G., 2006. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. *Mech Ageing Dev* 127, 538-543.
- Kohler, S., Thiel, A., 2009. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* 113, 769-774.
- Kol, A., Bourcier, T., Lichtman, A.H., Libby, P., 1999. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 103, 571-577.
- Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., Marrack, P., 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288, 675-678.
- Kuo, C.C., Shor, A., Campbell, L.A., Fukushi, H., Patton, D.L., Grayston, J.T., 1993. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 167, 841- 849.
- Larbi, A., Franceschi, C., Mazzatti, D., Solana, R., Wikby, A., Pawelec, G., 2008. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda)* 23, 64-74.
- Leatham, E.W., Bath, P.M., Tooze, J.A., Camm, A.J., 1995. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. *Br Heart J* 73, 10-13.
- Letourneur, F., Klausner, R.D., 1992. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 255, 79-82.
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Linton, P.J., Dorshkind, K., 2004. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 133-139.
- Liuzzo, G., Biasucci, L.M., Trotta, G., Brugaletta, S., Pinnelli, M., Digianuario, G., Rizzello, V., Rebuzzi, A.G., Rumi, C., Maseri, A., Crea, F., 2007. Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol* 50, 1450-1458.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
- Lord, J.M., Butcher, S., Killampali, V., Lascelles, D., Salmon, M., 2001. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 122, 1521-1535.

- Lynch, H.E., Goldberg, G.L., Chidgey, A., Van den Brink, M.R., Boyd, R., Sempowski, G.D., 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 30, 366-373.
- Ma, Y., Fang, M., 2013. Immunosenescence and age-related viral diseases. *Sci China Life Sci* 56, 399- 405.
- Mackall, C.L., Granger, L., Sheard, M.A., Cepeda, R., Gress, R.E., 1993. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 82, 2585-2594.
- Madjid, M., Awan, I., Willerson, J.T., Casscells, S.W., 2004. Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. *J Am Coll Cardiol* 44, 1945-1956.
- Maeder, M.T., 2014. Comorbidities in patients with acute coronary syndrome: rare and negligible in trials but common and crucial in the real world. *Heart* 100, 268-270.
- Mannucci, P.M., Mari, D., Merati, G., Peyvandi, F., Tagliabue, L., Sacchi, E., Taioli, E., Sansoni, P., Bertolini, S., Franceschi, C., 1997. Gene polymorphisms predicting high plasma levels of coagulation and fibrinolysis proteins. A study in centenarians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 755-759.
- McKenna, R.W., Washington, L.T., Aquino, D.B., Picker, L.J., Kroft, S.H., 2001. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 98, 2498-2507.
- McKinstry, K.K., Strutt, T.M., Swain, S.L., 2010. The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* 130, 1-9.
- McNerlan, S.E., Rea, I.M., Alexander, H.D., Morris, T.C., 1998. Changes in natural killer cells, the CD57CD8 subset, and related cytokines in healthy aging. *J Clin Immunol* 18, 31-38.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr., 2000. Innate immunity. *N Engl J Med* 343, 338-344.
- Methe, H., Weis, M., 2007. Atherogenesis and inflammation--was Virchow right? *Nephrol Dial Transplant* 22, 1823-1827.
- Miyaji, C., Watanabe, H., Minagawa, M., Toma, H., Kawamura, T., Nohara, Y., Nozaki, H., Sato, Y., Abo, T., 1997. Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *J Clin Immunol* 17, 420-429.
- Mocchegiani, E., Giacconi, R., Cipriano, C., Malavolta, M., 2009. NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins. *J Clin Immunol* 29, 416-425.
- Moro-Garcia, M.A., Alonso-Arias, R., Lopez-Larrea, C., 2012. Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. *Curr Genomics* 13, 589-602.
- Moro-Garcia, M.A., Alonso-Arias, R., Lopez-Larrea, C., 2013. When Aging Reaches CD4+ T-Cells: Phenotypic and Functional Changes. *Front Immunol* 4, 107.



- Moro-Garcia, M.A., Lopez Iglesias, F., Avanzas, P., Echeverria, A., Lopez-Larrea, C., Moris de la Tassa, C., Alonso-Arias, R., 2015., Disease complexity in acute coronary syndrome is related to the patient's immunological status. *Int J Cardiol* 189, 115-123.
- Namekawa, T., Wagner, U.G., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 1998. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 41, 2108-2116.
- Nikolich-Zugich, J., 2005. T cell aging: naive but not young. *J Exp Med* 201, 837-840.
- Nikolich-Zugich, J., 2008. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol* 8, 512-522.
- Nunez, J., Nunez, E., Bodi, V., Sanchis, J., Minana, G., Mainar, L., Santas, E., Merlos, P., Rumiz, E., Darmofal, H., Heatta, A.M., Llacer, A., 2008. Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 101, 747-752.
- Olsson, J., Wikby, A., Johansson, B., Lofgren, S., Nilsson, B.O., Ferguson, F.G., 2000. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev* 121, 187-201.
- Ortman, C.L., Dittmar, K.A., Witte, P.L., Le, P.T., 2002. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int Immunol* 14, 813-822.
- Ostan, R., Bucci, L., Capri, M., Salvioli, S., Scurti, M., Pini, E., Monti, D., Franceschi, C., 2008. Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation* 15, 224-240.
- Ouyang, Q., Wagner, W.M., Voehringer, D., Wikby, A., Klatt, T., Walter, S., Muller, C.A., Pircher, H., Pawelec, G., 2003a. Age-associated accumulation of CMV-specific CD8+ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Exp Gerontol* 38, 911-920.
- Ouyang, Q., Wagner, W.M., Walter, S., Muller, C.A., Wikby, A., Aubert, G., Klatt, T., Stevanovic, S., Dodi, T., Pawelec, G., 2003b. An age-related increase in the number of CD8+ T cells carrying receptors for an immunodominant Epstein-Barr virus (EBV) epitope is counteracted by a decreased frequency of their antigen-specific responsiveness. *Mech Ageing Dev* 124, 477-485.
- Ouyang, Q., Wagner, W.M., Wikby, A., Remarque, E., Pawelec, G., 2002. Compromised interferon gamma (IFN-gamma) production in the elderly to both acute and latent viral antigen stimulation: contribution to the immune risk phenotype? *Eur Cytokine Netw* 13, 392-394.
- Paganelli, R., Quinti, I., Fagiolo, U., Cossarizza, A., Ortolani, C., Guerra, E., Sansoni, P., Pucillo, L.P., Scala, E., Cozzi, E., et al., 1992. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clin Exp Immunol* 90, 351-354.
- Pamer, E.G., 1999. Antigen presentation in the immune response to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 28, 714-716.

- Panda, A., Arjona, A., Sapey, E., Bai, F., Fikrig, E., Montgomery, R.R., Lord, J.M., Shaw, A.C., 2009. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 30, 325-333.
- Papa, A., Emdin, M., Passino, C., Michelassi, C., Battaglia, D., Cocci, F., 2008. Predictive value of elevated neutrophil-lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 395, 27-31.
- Pawelec, G., 2012. Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 9, 15.
- Pawelec, G., Akbar, A., Caruso, C., Solana, R., Grubeck-Loebenstien, B., Wikby, A., 2005. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev* 205, 257-268.
- Pawelec, G., Barnett, Y., Forsey, R., Frasca, D., Globerson, A., McLeod, J., Caruso, C., Franceschi, C., Fulop, T., Gupta, S., Mariani, E., Mocchegiani, E., Solana, R., 2002. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 7, d1056-1183.
- Pawelec, G., Koch, S., Franceschi, C., Wikby, A., 2006. Human immunosenescence: does it have an infectious component? *Ann N Y Acad Sci* 1067, 56-65.
- Pawelec, G., Wagner, W., Adibzadeh, M., Engel, A., 1999. T cell immunosenescence in vitro and in vivo. *Exp Gerontol* 34, 419-429.
- Ponnappan, S., Ponnappan, U., 2011. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal* 14, 1551-1585.
- Prelog, M., 2006. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun Rev* 5, 136-139.
- Rea, I.M., McNerlan, S.E., Alexander, H.D., 1999. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. *Exp Gerontol* 34, 79-93.
- Riley, R.L., 2013. Impaired B lymphopoiesis in old age: a role for inflammatory B cells? *Immunol Res* 57, 361-369.
- Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Corthesy, P., Devevre, E., Speiser, D.E., Rufer, N., 2007. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 178, 4112-4119.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-420.
- Rossi, M.I., Yokota, T., Medina, K.L., Garrett, K.P., Comp, P.C., Schipul, A.H., Jr., Kincade, P.W., 2003. B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood* 101, 576-584.
- Sacks, H.S., 2011. ACP Journal Club. Influenza vaccination reduced cardiovascular events in patients hospitalized with an acute coronary syndrome. *Ann Intern Med* 155, JC5-05.

- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- Saurwein-Teissl, M., Lung, T.L., Marx, F., Gschosser, C., Asch, E., Blasko, I., Parson, W., Bock, G., Schonitzer, D., Trannoy, E., Grubeck-Loebenstien, B., 2002. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+) CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol* 168, 5893-5899.
- Schmidt, D., Martens, P.B., Weyand, C.M., Goronzy, J.J., 1996. The repertoire of CD4+ CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 2, 608-618.
- Schoffelen, T., Wegdam-Blans, M.C., Ammerdorffer, A., Pronk, M.J., Soethoudt, Y.E., Netea, M.G., van der Meer, J.W., Bleeker-Rovers, C.P., van Deuren, M., 2015. Specific in vitro interferon-gamma and IL-2 production as biomarkers during treatment of chronic Q fever. *Front Microbiol* 6, 93.
- Schroder, A.K., Rink, L., 2003. Neutrophil immunity of the elderly. *Mech Ageing Dev* 124, 419-425.
- Sedivy, J.M., Banumathy, G., Adams, P.D., 2008. Aging by epigenetics--a consequence of chromatin damage? *Exp Cell Res* 314, 1909-1917.
- Shaw, A.C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., Lord, J.M., 2010. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 22, 507-513.
- Shi, Y., Yamazaki, T., Okubo, Y., Uehara, Y., Sugane, K., Agematsu, K., 2005. Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J Immunol* 175, 3262-3267.
- Solana, R., Pawelec, G., Tarazona, R., 2006. Aging and innate immunity. *Immunity* 24, 491-494.
- Steinmann, G.G., Klaus, B., Muller-Hermelink, H.K., 1985. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* 22, 563-575.
- Stemme, S., Faber, B., Holm, J., Wiklund, O., Witztum, J.L., Hansson, G.K., 1995. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3893-3897.
- Stephan, R.P., Sanders, V.M., Witte, P.L., 1996. Stage-specific alterations in murine B lymphopoiesis with age. *Int Immunol* 8, 509-518.
- Straus, D.B., Weiss, A., 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-593.
- Streblow, D.N., Dumortier, J., Moses, A.V., Orloff, S.L., Nelson, J.A., 2008. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. *Curr Top Microbiol Immunol* 325, 397-415.
- Swain, S.L., Hu, H., Huston, G., 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286, 1381-1383.

- Tamhane, U.U., Aneja, S., Montgomery, D., Rogers, E.K., Eagle, K.A., Gurm, H.S., 2008. Association between admission neutrophil to lymphocyte ratio and outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 102, 653-657.
- Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A., Rocha, B., 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, 2057-2062.
- Thewissen, M., Linsen, L., Somers, V., Geusens, P., Raus, J., Stinissen, P., 2005. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 255-262.
- Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M., June, C.H., 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1333-1337.
- Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D., 2007. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 28, 2525-2538.
- Townsend, N., Nichols, M., Scarborough, P., Rayner, M., 2015. Cardiovascular disease in Europe--epidemiological update 2015. *Eur Heart J* 36, 2696-2705.
- Udell, J.A., Zawi, R., Bhatt, D.L., Keshtkar-Jahromi, M., Gaughran, F., Phrommintikul, A., Ciszewski, A., Vakili, H., Hoffman, E.B., Farkouh, M.E., Cannon, C.P., 2013. Association between influenza vaccination and cardiovascular outcomes in high-risk patients: a meta-analysis. *JAMA* 310, 1711-1720.
- Vallejo, A.N., 2005. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 205, 158-169.
- van Duin, D., Mohanty, S., Thomas, V., Ginter, S., Montgomery, R.R., Fikrig, E., Allore, H.G., Medzhitov, R., Shaw, A.C., 2007. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J Immunol* 178, 970- 975.
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C.R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M.P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D., Caruso, C., 2007. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 128, 83-91.
- Vescovini, R., Telera, A., Fagnoni, F.F., Biasini, C., Medici, M.C., Valcavi, P., di Pede, P., Lucchini, G., Zanlari, L., Passeri, G., Zanni, F., Chezzi, C., Franceschi, C., Sansoni, P., 2004. Different contribution of EBV and CMV infections in very long-term carriers to age-related alterations of CD8+ T cells. *Exp Gerontol* 39, 1233-1243.
- Warrington, K.J., Takemura, S., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2001. CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum* 44, 13-20.
- Weinberger, B., Herndler-Brandstetter, D., Schwanninger, A., Weiskopf, D., Grubeck-Loebenstien, B., 2008. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clin Infect Dis* 46, 1078- 1084.

- Weiskopf, D., Weinberger, B., Grubeck-Loebenstein, B., 2009. The aging of the immune system. *Transpl Int* 22, 1041-1050.
- Weksler, M.E., Szabo, P., 2000. The effect of age on the B-cell repertoire. *J Clin Immunol* 20, 240-249.
- Weyand, C.M., Brandes, J.C., Schmidt, D., Fulbright, J.W., Goronzy, J.J., 1998. Functional properties of CD4+ CD28- T cells in the aging immune system. *Mech Ageing Dev* 102, 131-147.
- Wikby, A., Ferguson, F., Forsey, R., Thompson, J., Strindhall, J., Lofgren, S., Nilsson, B.O., Enerudh, J., Pawelec, G., Johansson, B., 2005. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, 556-565.
- Wikby, A., Johansson, B., Olsson, J., Lofgren, S., Nilsson, B.O., Ferguson, F., 2002. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: The Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol* 37, 445-453.
- Wikby, A., Maxson, P., Olsson, J., Johansson, B., Ferguson, F.G., 1998. Changes in CD8 and CD4 lymphocyte subsets, T cell proliferation responses and non-survival in the very old: the Swedish longitudinal OCTO-immune study. *Mech Ageing Dev* 102, 187-198.
- Wikby, A., Nilsson, B.O., Forsey, R., Thompson, J., Strindhall, J., Lofgren, S., Enerudh, J., Pawelec, G., Ferguson, F., Johansson, B., 2006. The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study of very late life functioning. *Mech Ageing Dev* 127, 695-704.
- Wilcox, J.N., Smith, K.M., Schwartz, S.M., Gordon, D., 1989. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2839-2843.
- Xia, M., Guerra, N., Sukhova, G.K., Yang, K., Miller, C.K., Shi, G.P., Raulet, D.H., Xiong, N., 2011. Immune activation resulting from NKG2D/ligand interaction promotes atherosclerosis. *Circulation* 124, 2933-2943.
- Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Butler, S.W., Picard, S., Steinberg, D., Witztum, J.L., 1994. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 14, 32-40.
- Zahorec, R., 2001. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy* 102, 5-14.
- Zal, B., Kaski, J.C., Arno, G., Akiyu, J.P., Xu, Q., Cole, D., Whelan, M., Russell, N., Madrigal, J.A., Dodi, I.A., Baboonian, C., 2004. Heat-shock protein 60-reactive CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 109, 1230-1235.
- Zanni, F., Vescovini, R., Biasini, C., Fagnoni, F., Zanlari, L., Telera, A., Di Pede, P., Passeri, G., Pedrazzoni, M., Passeri, M., Franceschi, C., Sansoni, P., 2003. 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. *Exp Gerontol* 38, 981-987.
- Zhu, X., Gui, J., Dohkan, J., Cheng, L., Barnes, P.F., Su, D.M., 2007. Lymphohematopoietic progenitors do not have a synchronized defect with age-related thymic involution. *Aging Cell* 6, 663-672.

