

## Trabajo Fin de Grado

Grado en Medicina

# Valoración de las poblaciones linfocitarias a largo plazo en pacientes con cardiopatía congénita tipo D–T.G.V a los que se les realizó “Timectomía” en período neonatal

**Autor:**

**Andrea Alonso Marín**

**Director:**

**Dr. José Miguel Galdeano Miranda**

**Co-Director/a:**

**Dra. Marta Alonso Varela**

**Dr. Miguel Ángel Vázquez Ronco**

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCIÓN	1
1.El timo	1
2.Subpoblaciones linfocitarias	3
3.Transposición de los grandes vasos y timectomía	7
4.Inmunodeficiencia celular	11
5.Síndrome de DiGeorge (DGS)	11
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
1.Pacientes	14
2.Procedimientos	15
3.Test de laboratorio	16
4.Análisis estadístico	17
5.Valores de referencia	18
RESULTADOS	19
1.Sexo	19
2.Edad actual	19
3.Linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias	20
4.Infecciones	29
5.Enfermedades autoinmunes	30
DISCUSIÓN	31
1.Análisis de linfocitos y subpoblaciones linfocitarias	31
2.La timectomía	33
3.Relación con el síndrome de DiGeorge	37
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	45

## **ABREVIACIONES**

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- CMV: Citomegalovirus
- DGS: síndrome de DiGeorge
- D-TGV: D- Transposición de los Grandes Vasos
- EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
- Linfocitos T NK: Linfocitos T Citolíticos Naturales (Natural Killer)
- LT: Linfocitos T
- MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- MIg: Inmunoglobulina de la Membrana Celular
- TCR: Receptor Específico para Antígenos de los Linfocitos T
- TEC: Células Epiteliales del Timo
- TRECs: círculos de excisión de los receptores de células T
- Treg: Linfocitos T reguladores
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## RESUMEN

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto que se produce a largo plazo en la respuesta inmune en pacientes con Transposición de Grandes Vasos que han sido timectomizados en período neonatal durante la cirugía de su cardiopatía.

Se han seleccionado 30 pacientes con D-T.G.V. con un rango de edad de 6-17 años, los cuales fueron sometidos a cirugía extracorpórea debido a su cardiopatía congénita en el primer mes de vida. Dichos pacientes se han comparado con un grupo control (sujetos sanos no timectomizados en el rango de edad de 11-17 años), así como con un grupo seleccionado de 22 pacientes diagnosticados de Síndrome de DiGeorge.

Tanto a los casos objetos del estudio como a los controles se les ha realizado un hemograma completo junto a un recuento linfocitario, tanto de los linfocitos totales como de las subpoblaciones linfocitarias, con objeto de medir varios parámetros del sistema inmune.

Los resultados obtenidos muestran que los niños timectomizados en la edad neonatal presentan una disminución de los linfocitos totales (17 sujetos mostraron niveles de linfocitos totales  $<500$ ) y de las subpoblaciones linfocitarias, especialmente de los linfocitos T naive ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), así como las subpoblaciones de linfocitos T reguladores y de emigrantes tímicos también se encontraron disminuidos. Por contra, se objetivó un aumento de los linfocitos T memoria ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ).

A pesar del déficit linfocitario objetivado, en este estudio no se ha observado una mayor incidencia de clínica infecciosa ni enfermedades autoinmunes comparadas con el grupo control.

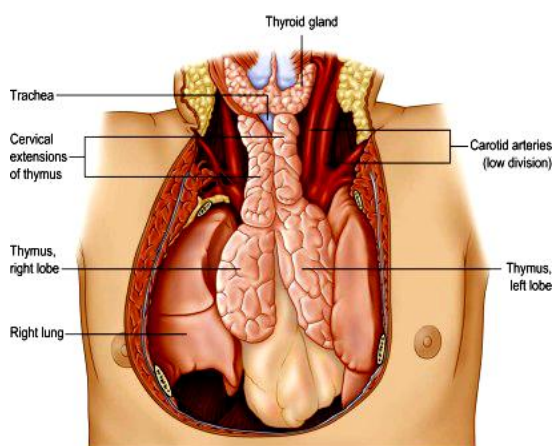
Resaltar que la timectomía parcial o completa al suprimir la timopoyesis puede dar lugar a una inmunosenescencia acelerada del sistema inmune y reducir la diversidad de células T. En consecuencia, se podría dar un incremento de las enfermedades autoinmunes, infecciones y neurodegenerativas en la edad adulta, por lo que resulta crucial un seguimiento a largo plazo.

**PALABRAS CLAVE:** cardiopatía congénita, timectomía, linfocito T naive.

# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1. EL TIMO

El timo es un órgano linfoide encapsulado formado por dos lóbulos, que se encuentra en el mediastino anterior tal y como se encuentra representado en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Localización del timo. Anatómicamente se ubica en el mediastino inferior anterior, delante del corazón y detrás del esternón.

En él maduran y se desarrollan los linfocitos T a partir de precursores linfoides que han migrado desde la médula ósea. <sup>1</sup> Aunque el espacio perivascular del timo es progresivamente reemplazado por grasa y la producción tímica de células T disminuye significativamente con la edad, incluso en los adultos, el timo ha demostrado ser capaz de producir nuevas linfocitos T. <sup>1, 2, 3</sup>

En adultos jóvenes, se estima que aproximadamente el 10% de las células T naive fueron originalmente formadas por el timo, mientras que el 90% restante fue producido a través de la proliferación de células T periféricas. A pesar de ello, se cree que el timo es crucial en la generación de células T, especialmente en edades más tempranas, ya que es la única fuente de diversidad de los linfocitos T. <sup>2</sup>

### 1.1.1 El timo prenatal

Las células T derivan del hígado fetal o de las células madre de la médula ósea y migran en una etapa muy temprana al primordio tímico o al timo respectivamente (**Figura 2**). Este órgano linfoide central proporciona el microambiente especializado en el cual los precursores T maduran y reordenan los genes de su receptor TCR bajo la influencia de las Células Epiteliales del Timo (TEC), con su posterior liberación a la periferia como linfocitos T vírgenes funcionales (sin experiencia antigénica).<sup>3</sup>

En humanos, el timo comienza a ser funcional durante el desarrollo embrionario, y un repertorio diverso de células T ya se establece al final del primer trimestre de gestación.<sup>4</sup>

Gracias al riguroso control del proceso de maduración intratímico (selección positiva y negativa) se asegura que el brazo adaptativo del sistema inmunitario sea capaz de generar una respuesta eficaz ante patógenos y tumores, evitando la autoinmunidad y controlando el desarrollo canceroso. Para conseguirlo, cerca del 99% de los precursores que colonizan el timo serán catalogados como “no satisfactorios”. Éstos activarán programas de muerte celular y nunca saldrán del timo. Durante las primeras etapas de la vida, el timo tiene una tasa muy elevada de mitosis y muerte celular.<sup>3</sup>

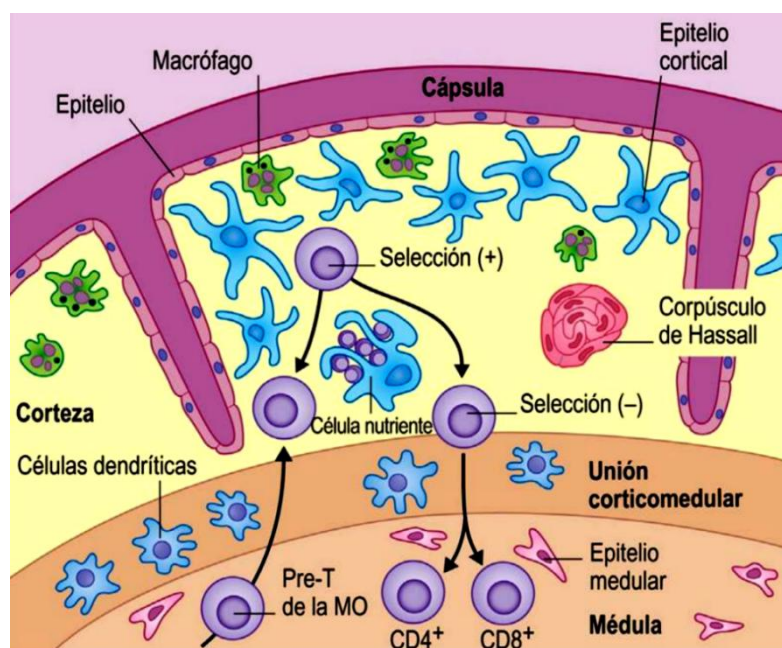


Figura 2. Estructura del timo que muestra la entrada de prelinfocitos T procedentes de la médula ósea.

### **1.1.2 La involución del timo**

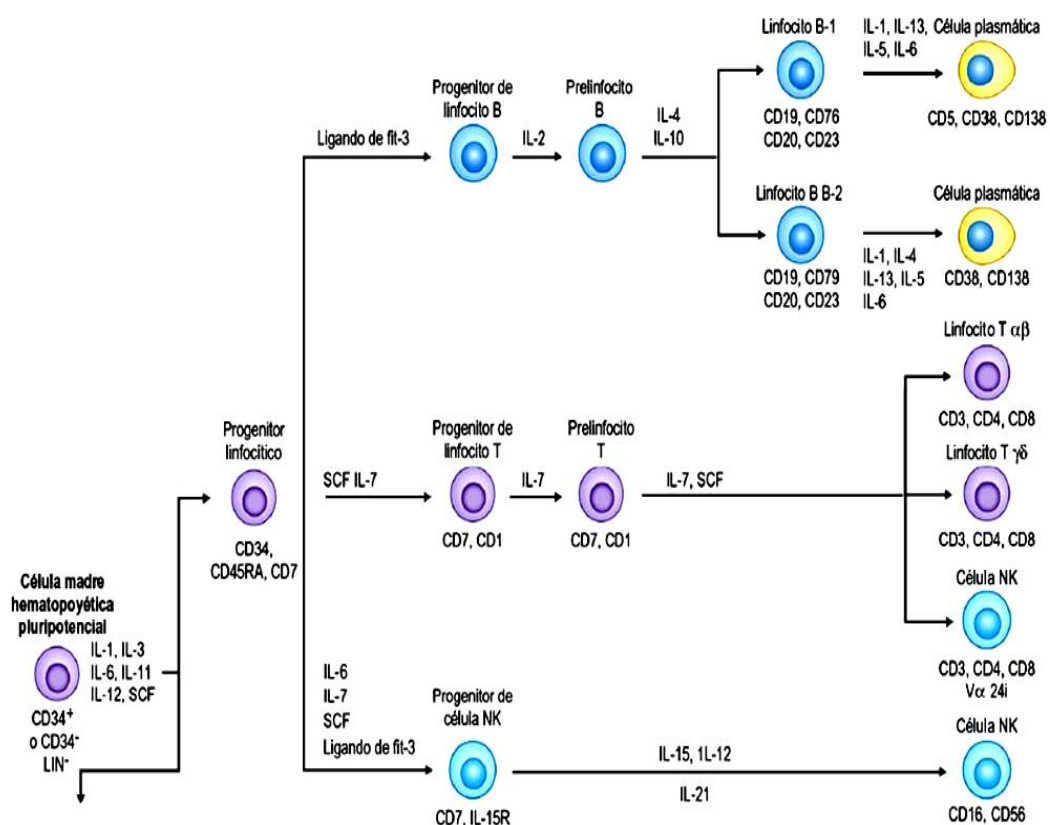
La involución del timo comienza a la edad de 1 año y disminuye en una proporción de aproximadamente 3% por año hasta la adolescencia, y en una proporción de 1% tras ella. En este proceso se da un reemplazamiento progresivo del espacio perivascular por tejido graso, pero a pesar de ello, la corteza y el tejido medular del timo adulto persiste siendo histológicamente normal. <sup>5</sup>

Desde un punto de vista evolutivo, la involución del timo ha sido propuesto como un método de ahorro para disminuir el alto gasto energético que la tasa de división y muerte celular suponen y que no puede ser mantenido de forma rentable a lo largo de la vida. <sup>3</sup>

Se sabe que este proceso de atrofia tímica supone una reducción progresiva en la producción de nuevas células T <sup>4</sup>. Dicho de otra forma, a medida que envejecemos, el timo involuciona y empieza a prevalecer la producción de linfocitos T por expansión clonal periférica. <sup>6</sup>

## **1.2 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS**

Las células T constituyen el 80% de los linfocitos circulantes siendo el linfocito T el “director de orquesta” de la respuesta adaptativa. Puede actuar directamente (linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>), o bien indirectamente, regulando el funcionamiento (linfocitos T helper CD4<sup>+</sup>) de su propio linaje, así como el de otros (linfocitos B, monocitos...) por medio de contactos celulares y/o citoquinas. <sup>7</sup>



**Figura 3. Subpoblaciones linfocitarias.** Diferenciación de la célula madre hematopoyética pluripotencial en las 3 vías diferentes de progenitores linfocíticos: progenitor de linfocito B, progenitor de linfocito T y progenitor de célula NK.

Los linfocitos T expresan marcadores de superficie comunes como el CD3<sup>+</sup> y el Receptor Específico para Antígenos (TCR).<sup>1</sup> Dentro de ellos podemos observar los siguientes subgrupos:

-Linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup>, que constituyen el 66% de los linfocitos T y presentan restricción de histocompatibilidad con moléculas de clase II (**Figura 4**). Al activarse, liberan citoquinas que favorecen su proliferación y diferenciación en células efectoras y de memoria, además de ser capaces de modular la práctica totalidad de las células del sistema inmune.<sup>7, 8</sup>



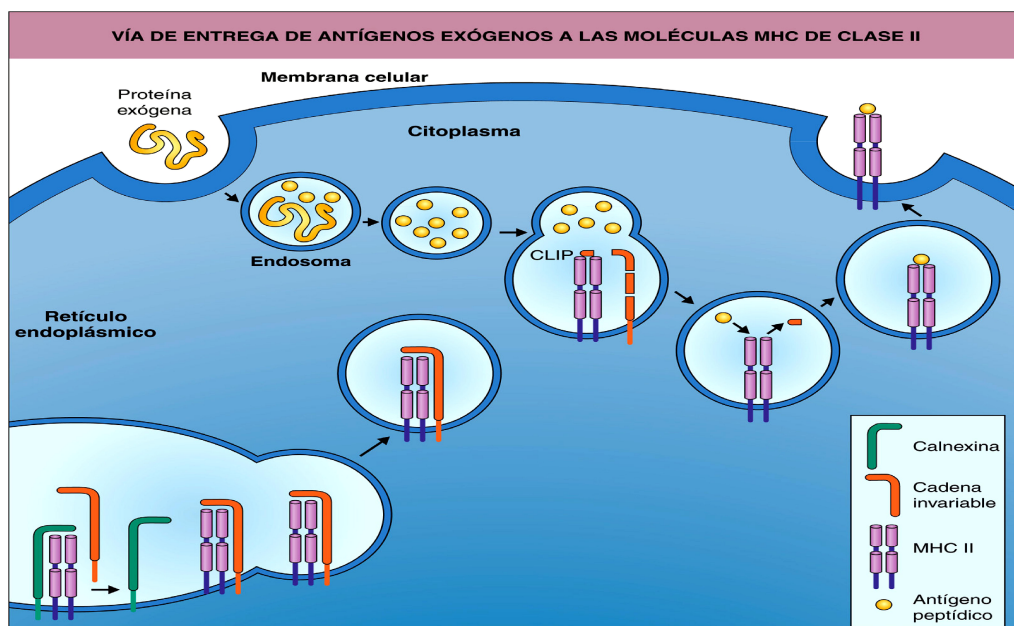
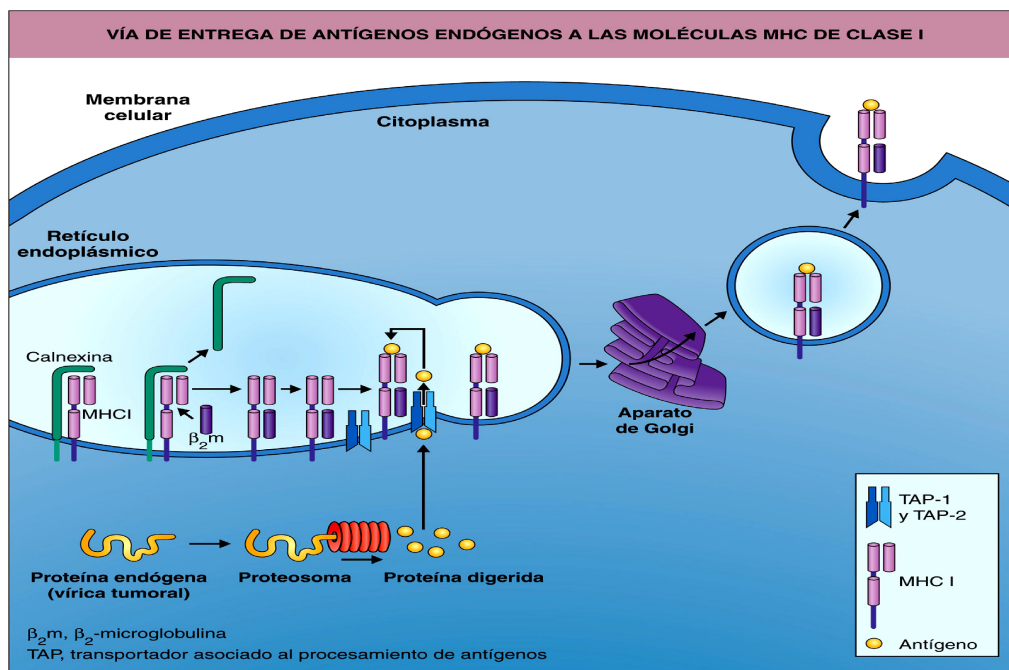


Figura 4. Linfocitos T cooperadores  $CD4^+$ . Vía de entrega de antígenos exógenos a las moléculas MHC de clase II.

-Los linfocitos T reguladores (Treg) son una subpoblación especializada de linfocitos T  $CD4^+$  que se caracterizan por presentar de forma constitutiva en la superficie celular la molécula CD25 y el factor de transcripción FOXP3. Cuentan con una serie de mecanismos supresores que les permite controlar tanto clones autorreactivos como linfocitos convencionales (inhibiendo la respuesta inmunitaria), correspondiendo únicamente al 5-10% de las células  $CD4^+$ . Su ausencia se ha relacionado con el desarrollo de patologías autoinmunes y condiciones proinflamatorias.<sup>7</sup>

-Linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$  los cuales son el 33% de los linfocitos T y presentan restricción de histocompatibilidad con moléculas de clase I (**Figura 5**). Reconocen péptidos endógenos (originarios de citosol) y mediante mecanismos de citotoxicidad y apoptosis destruyen directamente la célula presentadora del antígeno (células infectadas por virus o tumorales).<sup>7</sup>



**Figura 5. Linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>.** Vía de entrega de antígenos endógenos a las moléculas MHC de clase I.

-Los linfocitos T NK y los linfocitos T $\gamma\delta$  son dos subgrupos numéricamente inferiores de linfocitos T que expresan TCR con una diversidad limitada.

Además existen diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  dependiendo de su fenotipo o de su estado funcional (según su historia de exposición al antígeno):

-Las células T naive o vírgenes, son linfocitos T maduros que aún no tienen actividad funcional, y migran desde el timo a órganos linfáticos secundarios o periféricos, en la búsqueda de un antígeno. Se caracterizan por la expresión superficial de L-selectina (CD62L) y el receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7); la ausencia de los marcadores de activación CD25, CD44 o CD69; y la ausencia de memoria (isoforma CD45RO).<sup>7, 8</sup>

-Linfocitos T efectores que surgen como consecuencia de la activación de algunos linfocitos T vírgenes, tienen la capacidad de producir moléculas capaces de eliminar antígenos extraños (son los linfocitos T cooperadores y citotóxicos ya mencionados).

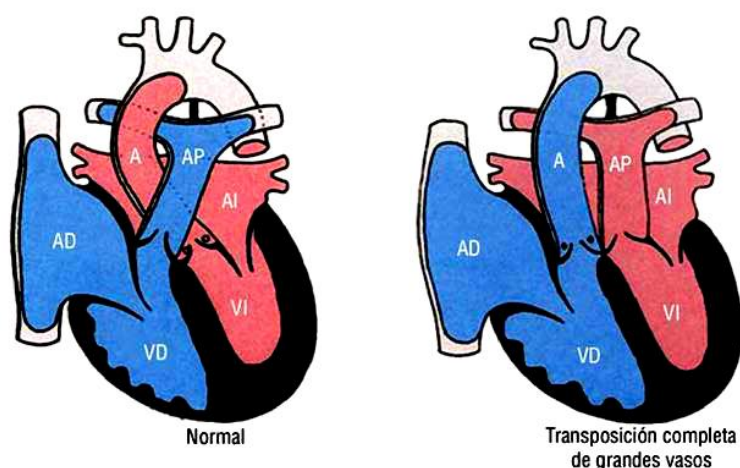
-Las células T de memoria, denominadas de vida larga, cuya función es mediar respuestas rápidas y potenciales (respuesta secundaria) a exposiciones repetidas de un antígeno. Pueden identificarse por su expresión de proteínas de superficie que las distingue de linfocitos efectores (expresan cantidades altas del receptor de la IL-7, CD127, además de la isoforma CD45RO). El fenotipo de la célula T de memoria es diferente para las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, comprendiendo al menos dos grupos denominados como “memoria efector” y “memoria central”. Las células T de memoria central difieren de las efectoras por su continuada supervivencia después de una respuesta aguda, tienen una baja tasa de apoptosis y presentan un menor estado de activación.<sup>8</sup>

Los linfocitos B constituyen del 5 al 10% de los linfocitos de la sangre periférica y expresan inmunoglobulina de la membrana celular (mIg), donde la mayoría expresan tanto IgM como IgD. Un pequeño número de linfocitos B expresa IgG o IgA en su superficie. Las moléculas detectadas en la superficie de los linfocitos B son CD19, CD20, CD23, CD40, CD72, CD79a, moléculas de MHC de la clase II y receptores para las fracciones del complemento C3b B. Son componentes de la inmunidad humoral adaptativa mediante la secreción de anticuerpos.<sup>7,8</sup>

Las células Natural Killer (NK) representan junto con los linfocitos B y T un tercer tipo de población de linfocitos. A diferencia de las otras poblaciones, estas células forman parte del sistema inmune innato. Sus principales funciones son la identificación y destrucción de células anormales (función citotóxica) y la producción de citoquinas (función secretora).<sup>7,8</sup>

### **1.3. TRANSPOSICIÓN DE LOS GRANDES VASOS Y TIMECTOMÍA**

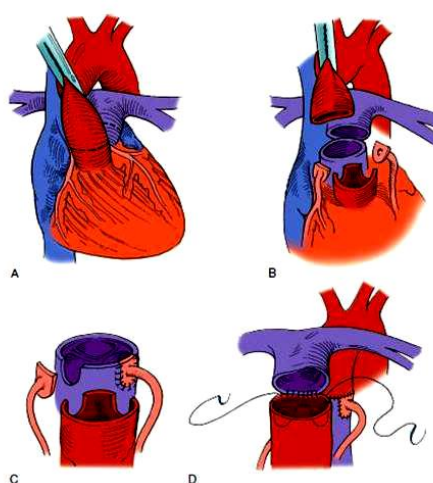
La D-TGV (D- Transposición de los Grandes Vasos) es la cardiopatía cianótica más frecuente en recién nacido. Transposición de los Grandes Vasos significa que el origen de las grandes arterias se encuentra invertido, es decir la aorta se origina del ventrículo derecho y la arteria pulmonar del ventrículo izquierdo, mientras que las conexiones de las aurículas con los ventrículos son normales (**Figura 6**).



**Figura 6.** Izquierda: imagen anatómica normal del corazón. Derecha: patología de la transposición completa de grandes vasos. A (Aorta); AP (Arteria Pulmonar); AI (Aurícula Izquierda); AD (Aurícula Derecha); VI (Ventrículo Izquierdo); VD (Ventrículo Derecho).

Ocurre en 1 de cada 2.000 a 4.000 R.N vivos y corresponden al 7-8% de todas las cardiopatías congénitas. Sin tratamiento los pacientes fallecerían por hipoxia, por lo que es necesaria la cirugía en el período neonatal.<sup>9</sup>

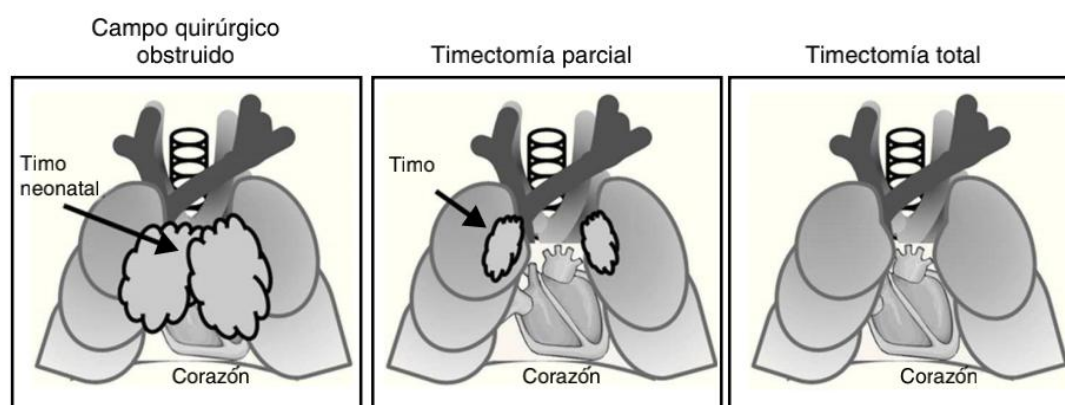
La cirugía de la D-TGV se realiza mediante cirugía extracorpórea en los primeros días de vida, procediéndose a la “transección” de la aorta ascendente y arteria pulmonar y posterior anastomosis con las válvulas semilunares de los ventrículos correctos (operación de Jatene ó Switch Arterial).<sup>3,9</sup> En la **Figura 7** se muestran los pasos a seguir de esta técnica quirúrgica.



**Figura 7. Operación de Jatene ó Switch Arterial.** La técnica quirúrgica consiste en realizar el intercambio de las grandes arterias con la translocación de las arterias coronarias y la anteroposición de las ramas pulmonares por delante de la Aorta.

Como puede observarse en la **Figura 8**, el timo está situado en el mediastino anterior, detrás del esternón, en frente del corazón y los grandes vasos y, por lo tanto, en el campo quirúrgico de la cirugía de la D-T.G.V (operación de Jatene).

Durante este procedimiento el campo quirúrgico debe ser despejado y el timo se extrae, total o parcialmente, de forma rutinaria.<sup>2,3,9</sup>



**Figura 8. Posición anatómica del timo.** En la figura se representa la necesidad de la tímectomía para la corrección en enfermedades cardíacas congénitas y los diferentes procedimientos utilizados.

Esta técnica se realiza de forma rutinaria y hasta el momento no hay descrita ninguna consecuencia clínica a corto plazo de la tímectomía en neonatos.<sup>3,9</sup>

Especialmente en los neonatos, los cuales presentan un timo relativamente largo, los procedimientos quirúrgicos que involucran a los grandes vasos es necesario extirpar el timo de forma completa.<sup>2,3,9</sup>

Varios estudios con ratones han puesto de manifiesto la importancia del timo en las primeras fases de la vida demostrando que la tímectomía da como resultado una inmunodeficiencia parcial, afectando principalmente a la respuesta inmune mediada por células.<sup>9</sup> Durante el primer año posttímectomía humana neonatal se ha observado una disminución en los niveles de linfocitos T y se han descrito numerosas alteraciones periféricas en las subpoblaciones de LT CD4 y CD8.<sup>2,4,5,6</sup>

### 1.3.1. Cuantificación de la actividad del timo

Existe una gran dificultad para cuantificar la actividad del timo, incluso en individuos normales, resultando muy costoso mostrar el impacto de la timectomía en las subpoblaciones de células T naive y por tanto, en los consecuentes efectos de la inmunidad adaptativa.

Los intentos iniciales para cuantificar la contribución de la timopoyesis en el sistema inmune celular durante el desarrollo posnatal y ya dentro de la edad adulta, ha estado focalizado en la medida fenotípica de la población de células T naive de sangre periférica. Estas células, por definición, son maduras, células T circulantes que todavía no han encontrado sus antígenos correspondientes. Las células T naive fueron identificadas como CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que también expresan CD45RA en su superficie.

Se ha visto que los marcadores de la citometría de flujo no permiten diferenciar las células T naive producidas por una expansión clonal en la periferia. Sin embargo, se ha desarrollado una PCR que permite la cuantificación y monitorización del número de círculos de escisión del receptor de linfocitos T (TRECs), las cuales son moléculas de ADN circular no replicativo generadas durante el reordenamiento excisional de las secuencias codificadas para las proteínas receptoras de las células T. Los TREC permanecen en las células T después de su maduración y liberación desde el timo a la periferia. A pesar de que se encuentren diluidos como células proliferativas, el número de TREC sirve como parámetro de la timopoyesis. Por otra parte, la identificación por citometría de flujo de los emigrantes tímicos con el inmunofenotipo CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> también constituiría una medida directa de la capacidad del timo para liberar linfocitos T maduros. En nuestro medio, no tenemos la posibilidad de cuantificar los TRECs, por lo que realizamos una cuantificación de los emigrantes tímicos T. El uso de estas técnicas ha demostrado que el timo normalmente permanece activo bien entrada la edad adulta y que su función es requerida para la reconstitución de la función inmune durante el tratamiento de la infección VIH, y tras ciclos de quimioterapia como tratamiento del cáncer o tras un trasplante de médula ósea. <sup>10</sup>

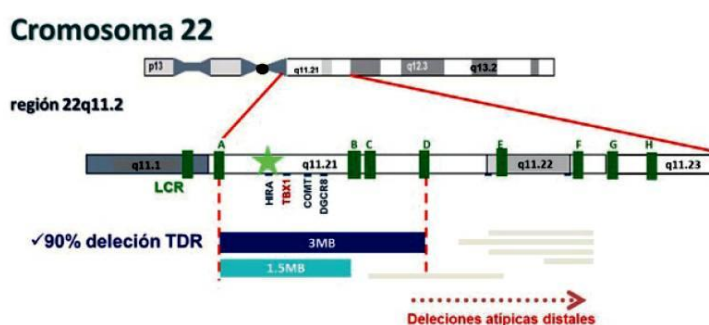
## 1.4. INMUNODEFICIENCIA CELULAR

Las inmunodeficiencias de células T, puesto que el linfocito B necesita la colaboración del linfocito TCD4+ para ejercer su función, comparten las infecciones por bacterias capsuladas con las inmunodeficiencias de células B. Pero, lo más característico son las infecciones oportunistas desde los primeros meses de vida: *Candida albicans* (candidiasis oral persistente); neumonía por *Pneumocystis carinii*; infecciones graves y persistentes por herpesvirus, adenovirus y virus respiratorio sincitial; diarrea por *Cryptosporidium* spp. e infecciones diseminadas por bacilo de Calmette-Guerin (BCG).

Estos pacientes no pueden rechazar los injertos, por lo que padecen enfermedad mortal de injerto contra huésped si reciben transfusiones de sangre no irradiada o trasplante de médula ósea que contiene células T. Por la misma razón, no es infrecuente ver en estos pacientes exantemas persistentes desde poco después del nacimiento.<sup>11</sup>

## 1.5. SÍNDROME DE DIGEORGE (DGS)

El síndrome de DiGeorge tiene su origen en una delección del cromosoma 22q11.2, siendo el síndrome de microdelección más común en los humanos y ocurriendo con una frecuencia de 1:4000 de los recién nacidos (**Figura 9**).<sup>12</sup>



**Figura 9. Síndrome de DiGeorge.** Representación esquemática de la región cromosómica 22q11.2 involucrada en el SD22Q11.2.



Se trata de un conjunto de signos y síntomas precedidos por un desarrollo defectuoso de la tercera y cuarta bolsa faríngea. Los pacientes pueden presentar defectos cardíacos (49-83%), deformidades palatinas (69-100%), hipocalcemia (50%), hipoplasia del timo (79-84%), anomalías renales (36%) y una inmunodeficiencia.

<sup>12</sup>

La mayoría de pacientes con DGS tiene una inmunodeficiencia leve-moderada con linfopenias de células T variables (DGS parcial), mientras que menos del 1% presentan una inmunodeficiencia severa de células T con aplasia del timo (DGS completo). La linfopenia de células T es observada en el 75-80% de los niños con DGS, sin embargo pocos pacientes tendrán una disminución de linfocitos T en su rango de edad, debido a que el rango normal es más bajo. Esto es explicado por la involución fisiológica del timo así como por la proliferación homeostática de células T existente. <sup>12, 13</sup>

La disminución de linfocitos T en pacientes con DGS ha sido asociada con el incremento de riesgo de autoinmunidad, atopia e infecciones. Las enfermedades autoinmunitarias más comunes en el DGS son la púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, artritis autoinmune y enfermedad autoinmune de la glándula tiroides. <sup>13</sup>

Sin embargo, a pesar de la desregulación inmune y de la variabilidad en las cifras de células T en estos individuos, todavía no es bien conocida su relación con el desarrollo de enfermedades autoinmunes. <sup>14</sup>



## 2. OBJETIVOS

1- Analizar el efecto de la respuesta inmune en pacientes timectomizados tras la cirugía cardíaca extracorpórea realizada en el período neonatal a los pacientes con D-T.G.V. Para ello, analizaremos el recuento de las siguientes subpoblaciones linfocitarias: linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores, linfocitos T naive y de memoria, linfocitos B y NK, y emigrantes tímicos.

2- Investigar la posible repercusión clínica (episodios de infecciones severas en los primeros años tras la timectomía, infecciones recidivantes crónicas, infecciones bacterianas, enfermedades autoinmunes, atopias, cáncer...) relacionada con la respuesta inmune tras la timectomía.

3-Otro objetivo será relacionar nuestros pacientes objeto de estudio (pacientes con D-TGV intervenidos en periodo neonatal, "Timectomizados") con pacientes seguidos en nuestro centro diagnosticados de Síndrome de DiGeorge (DGS). Para ello, realizaremos una búsqueda de similitudes/diferencias tanto analíticas como clínicas.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de casos y controles retrospectivo.

#### 3.1. PACIENTES

Fueron seleccionados dentro del estudio 30 pacientes con una edad comprendida entre 6 y 17 años, los cuales habían sido sometidos a una cirugía cardíaca extracorpórea con motivo de su cardiopatía congénita (D- T.G.V.) durante el período neonatal (< 30 días de vida).

Todas las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas en el Hospital Universitario de Cruces. Todos los sujetos fueron sometidos a la cirugía de su cardiopatía congénita (D- T.G.V.) mediante la técnica Switch arterial u operación de Jatene.<sup>5</sup>

La información sobre la eliminación completa o parcial del timo no está incluida en los informes quirúrgicos, pero es sabido que los cirujanos cardíacos tratan de diseccionar el timo entero en un intento de evitar un sangrado.

Dentro de este grupo de casos fueron excluidos los pacientes que padecían síndrome de DiGeorge, es decir aquellos niños que presentaban una delección del cromosoma 22q11.2.

Por otro lado, 16 sujetos (en el rango de edad de 9-17 años) fueron seleccionados como grupo control (cada control fue usado como un único punto en los análisis longitudinales).

Dicho grupo control fue formado a partir de pacientes que acuden a las consultas externas del Servicio de Cardiología del Hospital de Cruces como seguimiento de una patología cardíaca, sin presentar ninguno de ellos el antecedente médico-quirúrgico de haber sufrido una cirugía cardíaca con timectomía. Todos ellos fueron emparejados con el grupo de los casos por edad y género.

Como criterios de exclusión en el grupo de los controles, destacan los siguientes:

-Pacientes pediátricos oncológicos

-Pacientes inmunodeprimidos, ya sea por defectos genéticos, desnutrición,

enfermedades de la médula ósea, enfermedades renales, medicamentos e infecciones como VIH.

-Pacientes mayores de 18 años.

Además, también ha sido incluido en el estudio un grupo seleccionado de 22 pacientes diagnosticados de enfermedad de DiGeorge, todos ellos recuperados de la base de datos del Servicio de Pediatría del Hospital de Cruces. Este grupo será crucial para la relación de ambas patologías y las similitudes o diferencias ante una inmunodeficiencia celular de ambos casos.

La historia clínica de cada paciente, incluyendo el diagnóstico original, el procedimiento quirúrgico y los siguientes episodios clínicos de cada sujeto fueron recuperados de los registros del Hospital de Cruces mediante el programa informático Osabide Global.

### **3.2. PROCEDIMIENTOS**

Tras la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica, en los grupos de los casos y controles del estudio, se realizó una analítica sanguínea con motivo de analizar las diferentes subpoblaciones linfocitarias previamente descritas. Fue imprescindible proporcionar información sobre el objetivo del estudio y la posterior entrega de un consentimiento informado al paciente y familiares en una de las consultas de seguimiento de la cardiopatía congénita del paciente.

En la totalidad de los casos y controles se extrajo una pequeña cantidad de sangre venosa periférica para llevar a cabo una hematimetría y un análisis de las mismas poblaciones linfocitarias.

Remarcar que la filiación de los pacientes con síndrome DiGeorge (DGS) fue totalmente anónima, no precisando de nuevas extracciones de muestras de sangre dado que se les realiza en su seguimiento clínico habitual.

Los consentimientos informados fueron obtenidos de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

Posteriormente, se realizó una búsqueda en las historias clínicas de los sujetos con motivo de conocer si se produjeron episodios de infecciones bacterianas de gravedad

(otitis, bronquitis, neumonía, meningitis, candidiasis y otras), infecciones crónicas de repetición (asma), patología cutánea (eccema, psoriasis...), enfermedades neurológicas, alergia, cáncer o enfermedades autoinmunes (púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, artritis reumatoide, tiroiditis autoinmune, etc) que pudieran ser relacionadas con la alteración de la inmunidad.<sup>5</sup>

Toda la información de los pacientes, tanto las analíticas sanguíneas como la investigación en las historias clínicas ha sido manejada y almacenada de forma anónima, encriptada y confidencial.

### **3.3. TEST DE LABORATORIO**

A todos los pacientes objetos del estudio (“timectomizados”) así como al grupo control se les realizó un hemograma completo junto a un recuento tanto de las poblaciones leucocitarias como de los linfocitos totales (porcentaje y valores absolutos).

Para realizar dicho análisis (hemograma, linfocitos totales, poblaciones linfocitarias) se recoge una muestra de sangre total anticoagulada con etilendiaminotetraacetato (EDTA). La muestra se envía al servicio de Inmunología del H.U. de Cruces donde se lleva a cabo el estudio de las siguientes poblaciones linfocitarias: Linfocitos T CD3<sup>+</sup> (linfocitos T totales), CD4<sup>+</sup> (linfocitos T helper), CD8<sup>+</sup> (linfocitos T citotóxicos), y ratio CD4/CD8, las cuales se realizan de forma automatizada en un citómetro de flujo AQUIOS CL (Beckman Coulter).

Otras poblaciones como linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), linfocitos NK (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>), y de subpoblaciones linfocitarias: linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD127 low), linfocitos T naive (CD27<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup>), linfocitos T memoria central (CD27<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>), linfocitos T memoria efectora (CD27<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>), linfocitos T efectores (CD27<sup>-</sup>/CD45RO<sup>-</sup>) y linfocitos T emigrantes tímicos (CD4<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) fueron determinadas mediante el marcaje de dichas muestras celulares con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos para su posterior determinación fenotípica en un citómetro de flujo (Facs Canto II) y cuyo

análisis y cuantificación se lleva a cabo en un software denominado Infinicyt 1.7.

### **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se ha realizado el estudio con el programa estadístico SPSS.

La estadística descriptiva es un conjunto de técnicas numéricas y gráficas, que en nuestro estudio la hemos utilizado para describir y analizar los grupos de datos sin extraer conclusiones (inferencias). Para ello, hemos utilizado la media, la moda, la varianza, el máximo y el mínimo.

La técnica de análisis de varianza (ANOVA) es la herramienta básica para el estudio del efecto de uno o más factores sobre la media de una variable continua. Es por lo tanto, el test estadístico necesario a emplear en nuestro estudio, ya que deseamos comparar las medias de los valores de los linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias de los grupos de los timectomizados, los controles y los pacientes que sufren síndrome de DiGeorge. ANOVA permite comparar múltiples medias, pero lo hace mediante el estudio de las varianzas.

A su vez, también hemos utilizado la prueba chi-cuadrado como test estadístico, ya que nos permite determinar la existencia de relación entre dos variables categóricas. Así si el valor es igual a cero, podemos decir que sí existe concordancia perfecta entre las frecuencias observadas y las esperadas. En cambio, si el valor estadístico fuera  $> 0$ , diríamos que existe una discrepancia entre estas frecuencias, y consecuentemente se deberá rechazar la hipótesis nula.

En todos los casos un p-valor inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) fue considerado como estadísticamente significativo rechazándose la hipótesis nula.

### **3.5. VALORES DE REFERENCIA**

Los resultados de los pacientes de los tres grupos (timectomizados, controles y síndrome de DiGeorge) incluidos en el estudio serán comparados con “los valores de referencia de la normalidad” extraídos de la literatura médica.

Por un lado, los valores absolutos y porcentajes de los linfocitos totales, los linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y linfocitos NK, son comparados según García-Prat et al.<sup>15</sup>

Por otro lado, los valores de los emigrantes tímicos, las células T reguladoras, las células T naive y las células T de memoria (tanto de memoria central como las efectoras) son comparadas por los valores de referencia de Van Gent et al.<sup>16</sup>

## 4. RESULTADOS

### 4.1. SEXO

El grupo de los casos, es decir, los pacientes que sufrieron una cirugía cardíaca en el periodo neonatal con timectomía incluida a causa de una cardiopatía D- T.G.V, son en total 30 sujetos, de los cuales 17 son mujeres (56,7%) y 13 son varones (44,3%).

En el grupo de los controles contamos con un total de 16 sujetos, de los cuales 9 son mujeres (56,3%) y 7 son varones (43,8%).

El grupo de los pacientes que poseen síndrome de DiGeorge está compuesto por 22 sujetos, de los cuales 14 son mujeres (63,6%) y 8 son varones (36,4%) (**Figura 10**).

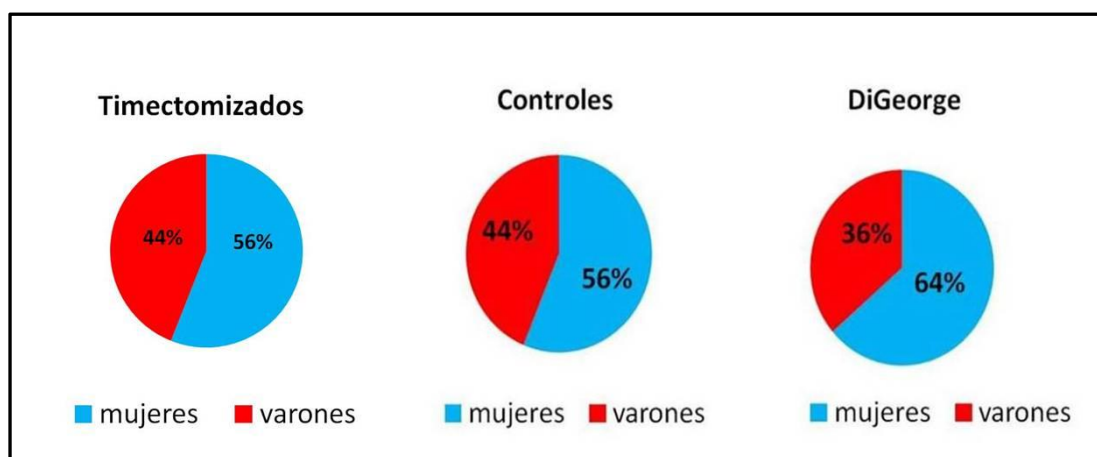


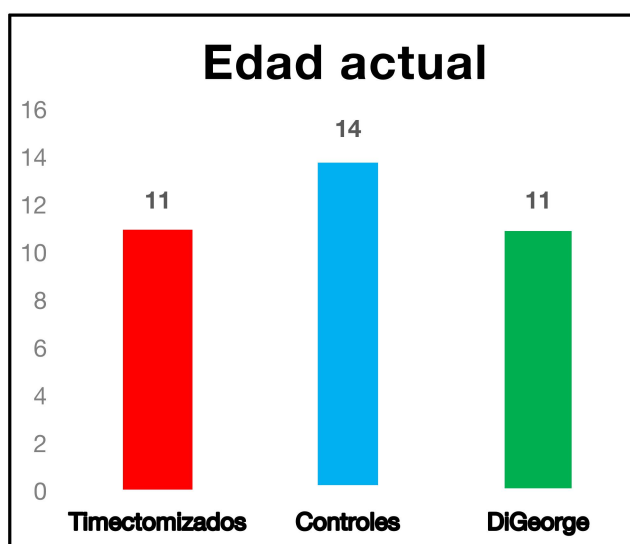
Figura 10. Comparación de la variable "sexo" entre el grupo a estudio (timectomizados), el grupo control y el grupo de los pacientes DiGeorge.

### 4.2. EDAD ACTUAL

Del grupo de los casos, la media de la edad actual es de 141 meses (11 años), con una edad mínima de 6 años y una edad máxima de 17 años.

La edad actual del grupo de los controles, presenta una media de 168,75 meses (14 años aproximadamente), donde el sujeto con menor edad actual tiene 11 años, y el de mayor edad tiene 17 años.

Con respecto a la edad actual de los pacientes que presentan síndrome de DiGeorge, la media se encuentra en 134,73 meses (11 años), con una edad mínima de 9 años y una edad máxima de 16 años respectivamente (**Figura 11**).



**Figura 11.** Comparación de la variable “edad actual” en años entre el grupo a estudio, el grupo control y los pacientes DiGeorge.

#### 4.3. LINFOCITOS TOTALES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

**Tabla 1.** Número total de linfocitos por inmunofenotipo del grupo a estudio (timestomizados) y grupo control. Todos los datos se encuentran descritos por la media.

Linfocitos	Grupo estudio	Grupo control	P-valor
Linfocitos totales	1719,00	2242,50	0,033
CD3	931,03	1528,20	0,001
CD4	557,97	828,40	0,017
CD8	307,30	585,47	0,001
CD19	346,45	274,69	0,283 ns
NK	390,67	322,67	0,460 ns



Inicialmente se comparan los resultados encontrados en los pacientes objetos del estudio (“Timectomizados”) con los sujetos controles **Tabla 1** y **Tabla 2**; así como con el grupo diagnosticado de Síndrome de DiGeorge **Tabla 3** y **Tabla 4**.

Posteriormente se establece una relación entre los resultados encontrados en los pacientes objetos del estudio (“Timectomizados”), el grupo control y los valores de referencia (utilizados en la práctica clínica) **Figuras 14-15-16**.

Finalmente se comparan los resultados encontrados en los pacientes objetos del estudio (“Timectomizados”) con el grupo diagnosticado de Síndrome de DiGeorge y los valores de referencia (utilizados en la práctica clínica) **Figura 18**.

Si analizamos los linfocitos totales del grupo de pacientes timectomizados (n=30), 17 pacientes han presentado valores de linfocitos totales por debajo de 1500, de los cuales 2, han presentado valores inferiores a 1000.

Al valorar los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de estos 17 pacientes, todos presentan valores absolutos por debajo de 500 (valor de referencia de normalidad): 4 de ellos por debajo de 300 (valor de inmunodeficiencia), y sólo uno inferior a 200.

Al analizar los linfocitos totales del grupo de los controles (n=16), solamente 2 sujetos han presentado valores de linfocitos totales por debajo de 1500 y sólo 1 presenta valores absolutos de linfocitos CD4<sup>+</sup> por debajo de 500. Los 15 restantes tienen cifras de CD4<sup>+</sup> consideradas en el rango de los valores de normalidad (**Figura 12**).

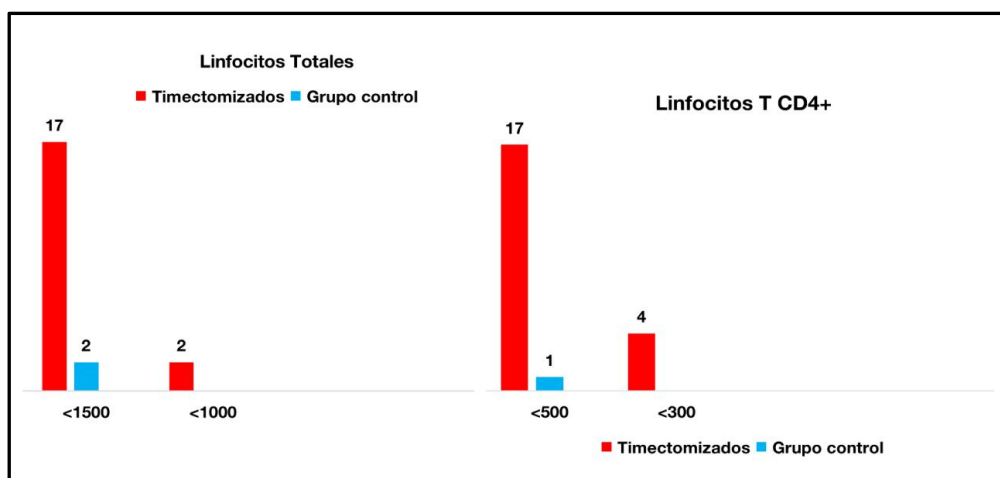


Figura 12. Izquierda: comparación de la variable “Linfocitos Totales” en timentomizados y el grupo control. Derecha: comparación de la variable “Linfocitos T CD4<sup>+</sup>” en timentomizados y grupo control.

Tabla 2. Porcentaje de linfocitos por inmunofenotipo del grupo a estudio (timentomizados) y grupo control. Todos los datos se encuentran descritos por la media.

Linfocitos (%)	Grupo estudio	Grupo control	P-valor
Linfocitos totales	23,65	36,20	0,000
CD3+	53,38	68,22	0,000
CD4+	31,69	37,40	0,033
CD8+	17,65	25,46	0,000
CD19+ (LB)	21,69	13,79	0,006
CD16+/CD56+ (LNK)	24,37	19,59	0,268 ns
ET CD4+	17,96	45,43	0,000
ET CD8+	31,95	51,12	0,002
CD4 naive	33,87	56,53	0,004
CD4 memoria central	49,76	28,70	0,001
CD4+ memoria efectora	14,82	8,01	0,027
CD4+ efectores	1,55	0,80	0,204 ns
CD8+ naive	37,86	57,04	0,007
CD8+ memoria central	37,31	22,52	0,004
CD8+ memoria efectora	14,40	8,98	0,068
CD8+ efectores	10,12	11,46	0,644 ns
LT reguladores	4,09	6,37	0,004

Tabla 2. Porcentaje de linfocitos por inmunofenotipo del grupo a estudio (timentomizados) y grupo control. Todos los datos se encuentran descritos por la media.

Al analizar los linfocitos totales del grupo de los pacientes con síndrome de DiGeorge (n=22), 3 presentan valores de linfocitos totales por debajo de 1500, de los cuales 1 ha resultado poseer valores por debajo de 1000. En cuanto al recuento absoluto de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> cabe destacar que solamente 2 pacientes tienen valores por debajo de 500, donde uno de ellos presenta un valor aún más bajo de 300 (Figura 13).

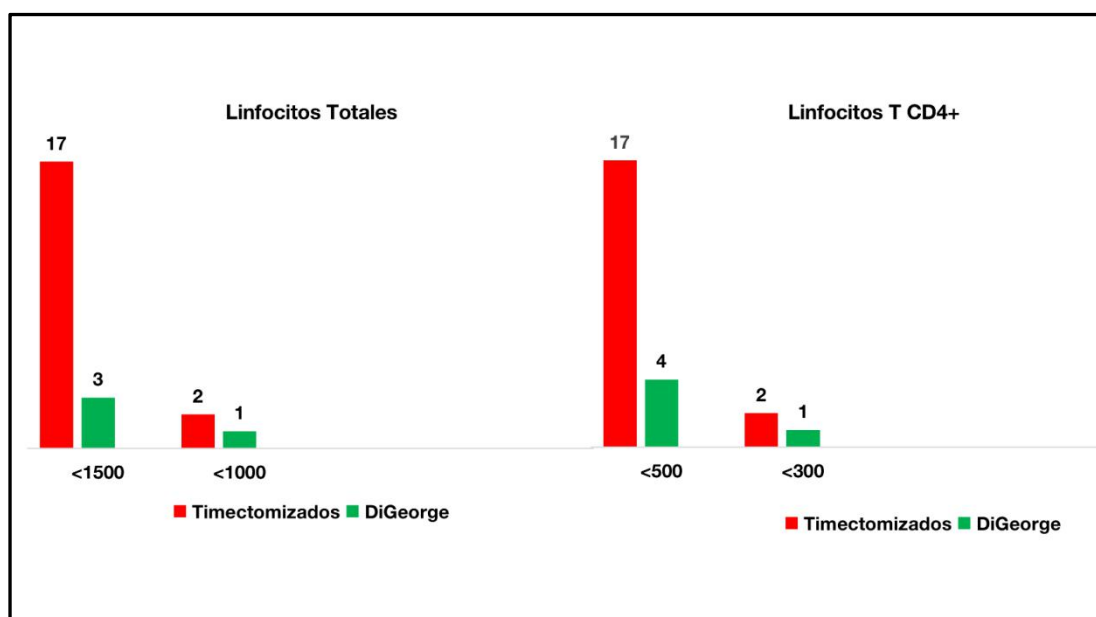


Figura 13. Izquierda: comparación de la variable “Linfocitos Totales” en tinctomizados y pacientes con Síndrome DiGeorge. Derecha: comparación de la variable “Linfocitos T CD4+” en tinctomizados y pacientes con Síndrome DiGeorge.

Tabla 3. Número total de linfocitos por inmunofenotipo del grupo a estudio (tinctomizados) y grupo DiGeorge. Todos los datos se encuentran descritos por la media.

Linfocitos (absolutos)	Grupo estudio	Grupo DiGeorge	P-valor
Linfocitos totales	1719,00	2328,18	0,008
CD3+	931,03	1411,73	0,002
CD4+	557,97	739,05	0,047
CD8+	307,30	538,36	0,001

**Tabla 4. Porcentaje de linfocitos por inmunofenotipo del grupo a estudio (timectomizados) y grupo DiGeorge.** Todos los datos se encuentran descritos por la media.

Linfocitos (%)	Grupo estudio	Grupo DiGeorge	P-valor
Linfocitos totales	23,65	36,12	0,000
CD3+	53,38	60,70	0,021
CD4+	31,69	32,48	0,761 ns
CD8+	17,65	22,73	0,013

#### **4.3.1. Comparación de linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias entre el grupo de los timectomizados, el grupo de los controles y los valores de referencia.**

Tal y como podemos observar en la **Figura 14**, en el grupo de casos, es decir, pacientes con cardiopatía D- T.G.V que sufrieron una cirugía cardíaca con timectomía en el periodo neonatal, se muestra una tendencia a la disminución de linfocitos totales.

Si realizamos una comparación de este grupo de casos con el grupo de controles (pacientes sin cirugía cardíaca) podemos comprobar que se cumple nuestra hipótesis de que el primer grupo presenta una disminución de los linfocitos totales, siendo estadísticamente significativo ( $p=0,033$ ) donde  $p<0,05$ .

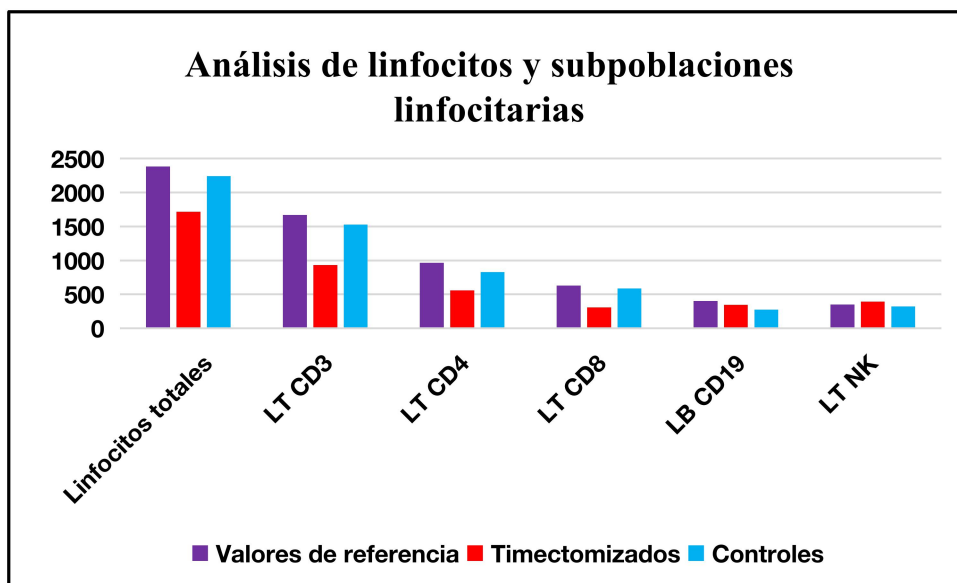


Figura 14. Comparación del número de linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias entre los valores de referencia, el grupo a estudio y el grupo control.

A su vez si observamos la **Figura 14**, los pacientes timectomizados sufren un mayor descenso de las siguientes subpoblaciones linfocitarias en comparación al grupo control: linfocitos CD3<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ); linfocitos CD4<sup>+</sup> ( $p=0,017$ ); linfocitos CD8<sup>+</sup> ( $p=0,001$ ); el porcentaje de emigrantes tímicos de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> ( $p=0,000$  y  $p=0,002$  respectivamente); linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive o vírgenes ( $p=0,004$ ); linfocitos T CD8<sup>+</sup> naive ( $p=0,007$ ) (**Figura 15**). También es característico la disminución de linfocitos T reguladores, siendo mayor en el grupo de los timectomizados que en el de los controles, siendo  $p<0,05$  ( $p=0,004$ ) (**Figura 16**).

En cuanto a los valores absolutos de los linfocitos B y linfocitos NK no se observan diferencias significativas entre los datos de los timectomizados y los valores de referencia y los del grupo control (**Figura 14**).

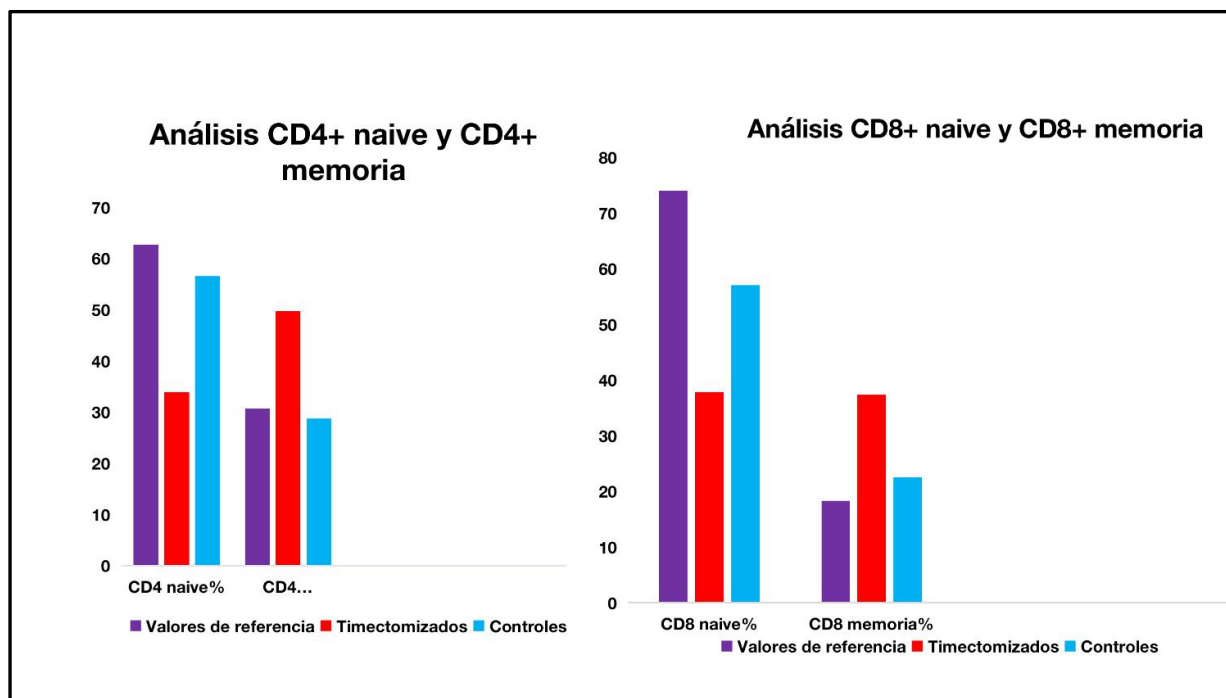


Figura 15. Análisis de Linfocitos T CD4+ y CD8+, tanto naive como de memoria. La comparación ha sido realizada entre los pacientes timectomizados, el grupo control y los valores de referencia.

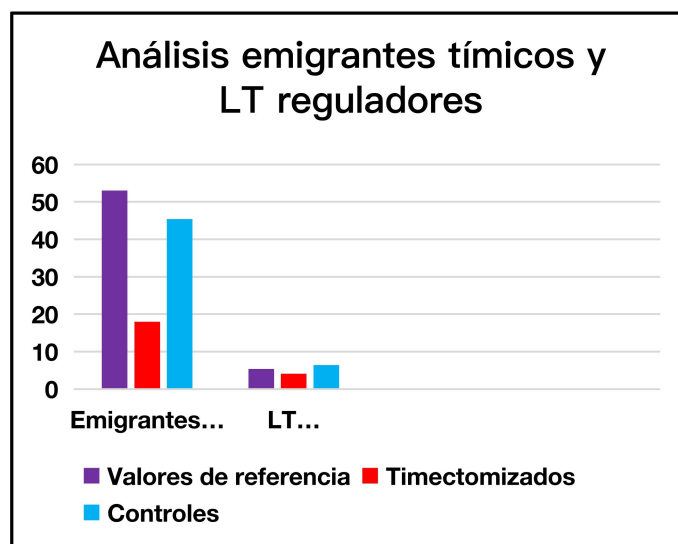
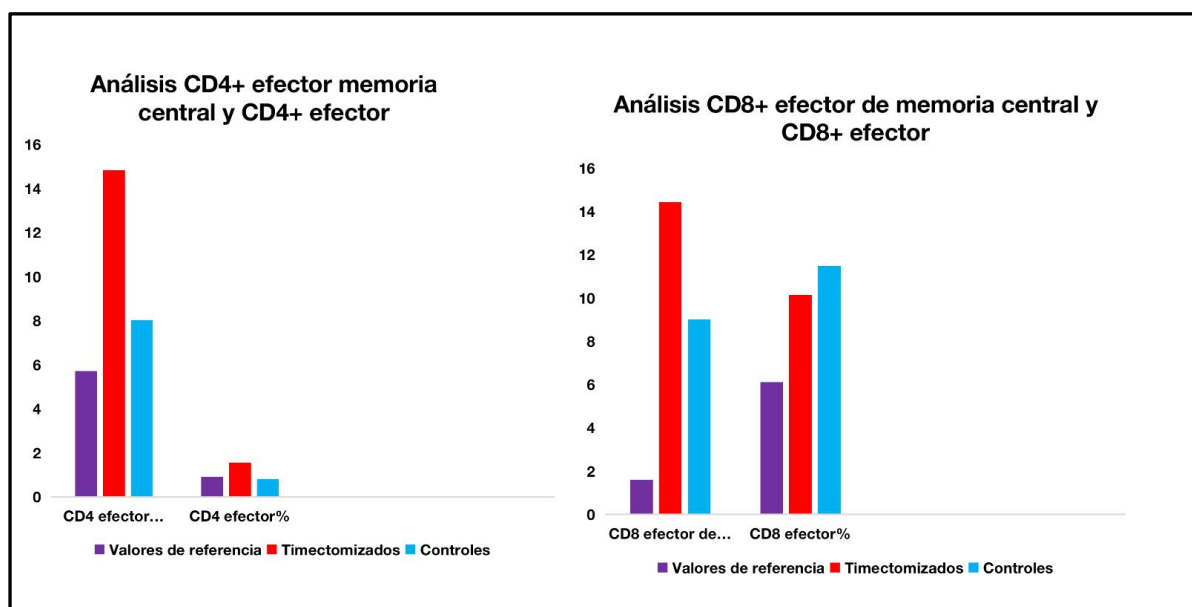


Figura 16. Comparación de los porcentajes de emigrantes tímicos y linfocitos T reguladores entre los valores de referencia, el grupo a estudio y el grupo control.

En la **Figura 15** se ve un aumento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria en los pacientes timentomizados con respecto al grupo control, siendo estadísticamente significativo ya que  $p < 0,05$  ( $p = 0,001$ ).

También se da un aumento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> memoria central y efectora ( $p = 0,001$ ) y ( $p = 0,027$ ) respectivamente y de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria central ( $p = 0,004$ ), sin embargo no se observan diferencias estadísticamente significativas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectores ( $p = 0,204$ ) y ( $p = 0,644$ ). Por lo tanto, el aumento de linfocitos T efectores no se puede relacionar con nuestra hipótesis (**Figura 17**).



**Figura 17. Análisis de Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectores de memoria.** La comparación ha sido realizada entre los pacientes timentomizados, el grupo control y los valores de referencia.

#### 4.3.2. Comparación de linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias entre el grupo de los timentomizados, el grupo de los pacientes con síndrome de DiGeorge y los valores de referencia.

A su vez, también se ha comparado el grupo de casos (pacientes timentomizados en la infancia temprana) con el grupo de pacientes con síndrome de DiGeorge, grupo en el que también cabe esperar una tendencia a la disminución de linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias. Al analizar esta asociación de ambos grupos (**Figura 18**), tenemos como resultado principal que el grupo de pacientes timentomizados posee una mayor disminución de linfocitos totales siendo estadísticamente significativo con  $p < 0.05$  ( $p = 0,008$ ); una disminución de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> ( $p = 0,002$ ), así como de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales ( $p = 0,047$ ) y linfocitos T CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,001$ ).

De esta forma podemos concluir con que tanto los pacientes timentomizados como los DiGeorge presentan una disminución de linfocitos CD4<sup>+</sup>, viendo que el descenso de los valores totales es menor en el grupo de los timentomizados.

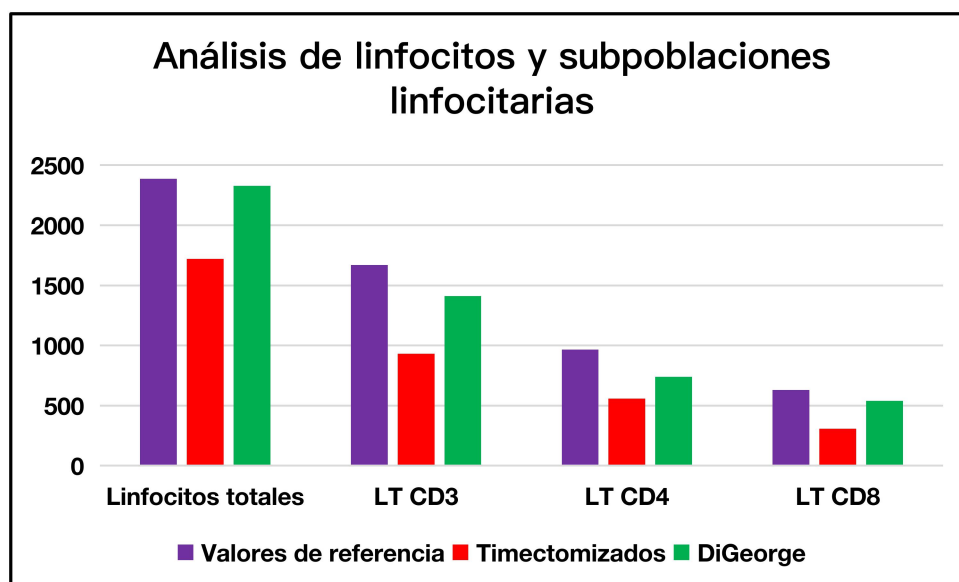


Figura 18. Comparación del número de linfocitos totales entre los valores de referencia, el grupo a estudio y el grupo de los pacientes DiGeorge.



#### 4.4. INFECCIONES

De los 68 sujetos estudiados, 52 de ellos han sido diagnosticados de enfermedades infecciosas a lo largo de su vida, mientras que 16 de ellos no han presentado episodios de infección. De los 52 que han sufrido alguna historia de infección, 21 representan al grupo de los timectomizados (grupo de los casos), 11 al grupo de los controles y 20 al grupo de los pacientes con síndrome de DiGeorge (**Figura 19**).

Sin embargo, al realizar los análisis estadísticos oportunos con las pruebas de chi-cuadrado se observa que  $p=0,151$ , donde la asociación no es estadísticamente significativa. Con lo cual, la tendencia a la disminución de linfocitos y subpoblaciones linfocitarias en los grupos a estudio no explica las historias de infecciones en comparación con los sujetos sanos. Así, los pacientes timectomizados y DiGeorge analizados en nuestro estudio, no presentan mayor clínica infecciosa con respecto al grupo control.

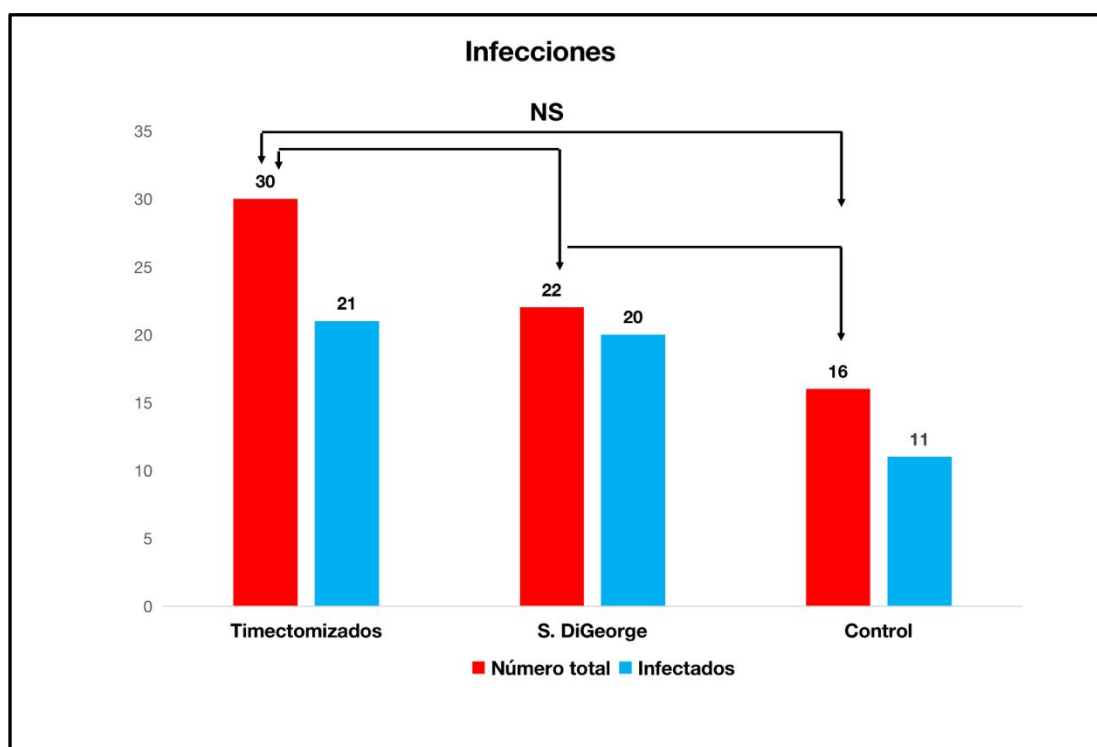


Figura 19. Análisis de la prevalencia de infecciones en el grupo de los timectomizados, el grupo control y los pacientes DiGeorge. NS: no significativo.

#### **4.5. ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

Del total de sujetos de nuestro estudio (n=68), solamente 2 presentan enfermedades autoinmunes hasta la fecha actual. Del grupo de los timectomizados y de los controles, ningún sujeto posee enfermedades autoinmunitarias. Por lo que los 2 citados anteriormente pertenecen al grupo de pacientes con enfermedad de DiGeorge. No obstante, al realizar los análisis estadísticos con las pruebas de chi-cuadrado,  $p=0,116$ , por lo que la asociación no es estadísticamente significativa. Así, la disminución de linfocitos en el grupo de los DiGeorge no parece estar relacionado con la presencia de enfermedades autoinmunes.

## 5. DISCUSIÓN

Nuestros resultados proporcionan evidencia de que la cirugía cardíaca que incluye la timectomía durante los primeros días de vida produce cambios en el número de linfocitos T en sangre periférica de manera significativa y duradera. Dichos cambios se ocasionan por una pérdida del desarrollo de la timopoyesis. Aunque la ausencia del timo durante la edad fetal está asociada a una privación completa del desarrollo de linfocitos T y una profunda inmunodeficiencia (tal y como se ha visto en el síndrome de DiGeorge completo), la contribución posnatal del timo en el desarrollo de la inmunidad no es del todo conocida. Sin embargo, recientes estudios han confirmado que en los individuos normales hay cierta contribución tímica en el mantenimiento de los linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias durante la edad adulta.<sup>10, 17</sup>

Numerosos estudios de pacientes timectomizados a causa de la cirugía de cardiopatías congénitas indican cambios en la producción de linfocitos T a largo plazo. Varios investigadores han demostrado, de modo similar a nuestro estudio, reducciones en el número total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.<sup>18, 19</sup>

A su vez, otros resultados sugirieron que a pesar de la caída del número de células CD4<sup>+</sup>, el número de linfocitos citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) permaneció invariable.<sup>20</sup>

### 5.1. ANÁLISIS DE LINFOCITOS Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

El estudio de Mancebo et al.<sup>4</sup> reveló una progresiva linfopenia, especialmente en la población de linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> naive, a la vez que no se encontraron cambios en los linfocitos B o linfocitos NK. Esta reducción en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fue debido principalmente a la producción alterada de las células T naive. Es interesante mencionar que los valores de referencia de normalidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se encuentran en el rango de 640-1290 en la edad de 9-13 años y en el rango de 560-1450 en la edad de 14-18 años.<sup>15</sup>

Nuestros resultados muestran que 17 pacientes del estudio (57%) timectomizados en la edad temprana, a los 6-17 años presentan valores menores a 500 linfocitos T CD4<sup>+</sup>. 4 tienen valores menores de 300 linfocitos T CD4<sup>+</sup> y 1 sujeto presenta linfocitos T CD4<sup>+</sup> por debajo de 200 células/mm<sup>3</sup>. Estos datos muestran unos niveles de inmunodeficiencia en los pacientes citados, tal y como lo definen las guías de citometría clínica (2019).<sup>15</sup> La disminución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> también se ha dado en nuestro estudio, donde los pacientes timectomizados presentan cifras más bajas en comparación al grupo control ( $p < 0,001$ ). Los linfocitos B y los linfocitos NK tampoco han sufrido grandes variaciones en nuestro estudio, al comparar el grupo de los timectomizados con el grupo control.

El seguimiento a los 18 años de edad de los pacientes timectomizados de Gudmundsdottir et al.<sup>9</sup> reflejó niveles más disminuidos de los linfocitos T helper naive (CD45RA<sup>+</sup>) en el grupo de los timectomizados con respecto al grupo control, mientras que los linfocitos T helper de memoria (CD45RO<sup>+</sup>) no se vieron afectados en ninguno de los grupos. Por el contrario, en nuestro estudio, los linfocitos T helper de memoria se vieron aumentados en comparación al grupo control y a los valores de referencia.

Según Deya-Martínez et al.<sup>19</sup> se observa una disminución progresiva de los niveles de linfocitos T y TRECs, así como un incremento en la proporción de linfocitos T periféricos de memoria que demuestran el fenotipo inmunosenescente. En este estudio, a diferencia del nuestro, también se ha estudiado la expresión y frecuencia de Ki67. La frecuencia de Ki67 expresa un incremento en la proliferación de los linfocitos T naive en los pacientes timectomizados en comparación con los sujetos sanos controles de igual rango de edad, reflejando un aumento de la replicación periférica de estos linfocitos T para mantener la homeostasis periférica en respuesta a la hipofunción tímica.<sup>19</sup>

## 5.2. LA TIMECTOMÍA

El efecto final de la timectomía realizada en la infancia temprana es todavía desconocido aunque las alteraciones inmunológicas ya han sido anteriormente citadas.<sup>9</sup>

Recientes estudios han mostrado que dicha timectomía da lugar a la producción de anticuerpos con disminución de la afinidad por los antígenos.<sup>17, 18</sup> Los resultados de estos estudios indican que el timo controla de forma indirecta el proceso de maduración y selección de las células B, aumentando la afinidad de sus anticuerpos.<sup>18</sup> Además, la timectomía también conlleva una pérdida progresiva de los emigrantes tímicos, una ausencia de hormonas tímicas, un incremento selectivo de la proliferación homeostásica y una alteración del ambiente de las citoquinas.<sup>18, 20</sup>

A medio plazo (de uno a cinco años postcirugía) los niveles de linfocitos T periféricos siguen siendo bajos, sugiriendo que la homeostasis periférica no es suficiente para mantener unos niveles normales de linfocitos T en ausencia de función tímica. También se ha descrito la disminución de los niveles de TRECs y la pérdida de diversidad del TCR.

En cuanto a los efectos a largo plazo (más de cinco años postcirugía) siguen persistiendo bajos los niveles de linfocitos T (como se refleja en nuestro estudio) y de TRECs. Algunos estudios apuntan hacia una normalización tras 20-30 años, mientras otros describen que las alteraciones se mantienen a lo largo de la vida.<sup>4, 5, 29</sup>

Además de las alteraciones en los linfocitos T, también se han descrito alteraciones generales del sistema inmunitario a nivel periférico como la disminución de los niveles de linfocitos T vírgenes (hallazgos similares a los nuestros: Linfocitos T naive CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> disminuidos de modo significativo (**Figura 15**), aumento en la biodisponibilidad de IL-7, respuestas Th2 alteradas, aumento en el número de neutrófilos y bajo número de plaquetas a pesar de los niveles normales de linfocitos B y células NK.<sup>3, 21</sup>

Por ello, los individuos que han sido timectomizados tras el nacimiento muestran alteraciones inmunológicas definitorias de fragilidad inmune en el anciano: mayor tasa de proliferación de linfocitos T vírgenes, fuertes respuestas oligoclonales frente

a citomegalovirus (CMV), linfocitos T que expresan el marcador de agotamiento CD57, biomarcadores de inflamación y menor capacidad de respuesta a vacunas (nuevos antígenos) pese a una respuesta de memoria conservada.<sup>3, 21, 22</sup>

### **5.2.1 La timectomía parcial**

El fenotipo inmunosenescente previamente descrito (disminución de linfocitos T naive, disminución de TRECs, incremento de linfocitos T periféricos de memoria) es reversible si ocurre la regeneración del timo, dando ejemplo de la importancia de mantener parte del tejido tímico en la timectomía neonatal.<sup>19</sup>

Cabe remarcar la importancia de que el timo no se regenere en los niños que previamente han sufrido una timectomía parcial. Esto podría ser atribuido a la edad en la cual este órgano es extraído, observándose una mejor regeneración tímica en los niños que se sometieron al procedimiento quirúrgico durante el primer mes de vida. Otros factores que pueden influir en la regeneración del timo incluyen el tamaño, la forma o la localización del fragmento preservado del timo. Así mismo debe señalarse que varios estudios excluyen la regeneración tímica en humanos.<sup>20</sup> Por lo tanto, parece evidente que la preservación de fragmentos tímicos durante la cirugía cardíaca es el hecho más importante para aumentar las posibilidades de regeneración tisular.<sup>18</sup>

### **5.2.2 Consecuencias clínicas de la timectomía en la infancia**

Aunque no se ha demostrado una mayor probabilidad de que los niños timectomizados contraigan más infecciones que los niños sanos, sí que se ha visto que la duración del tratamiento y el tiempo de hospitalización debido a patologías infecciosas típicas como bronquitis es significativamente más largo, así como el tiempo requerido por el sistema inmune de estos pacientes para recuperarse de estas infecciones.<sup>4, 18</sup> De la misma forma, los pacientes timectomizados de nuestro grupo han presentado un número de infecciones a lo largo de su vida similar (no significativo) con respecto al grupo control.

Por tanto, según los hallazgos referidos en la literatura así como los de nuestro estudio, podemos aceptar que los niños timectomizados no son más propensos a contraer infecciones o enfermedades autoinmunes que la población general.

Esta ausencia significativa de infecciones graves tras una timectomía neonatal podría ser explicada por la diversidad de reservas de linfocitos T naive presentes al nacimiento, debido a un desarrollo tímico normal en la etapa fetal, que se produce antes de efectuarse la ablación tímica y comenzar la involución fisiológica del timo. Este hecho podría ser protector frente a infecciones severas en un corto a medio plazo. Por el contrario, en una aplasia congénita del timo, como puede ser el síndrome de DiGeorge completo, la ausencia o restricción oligoclonal de las poblaciones de linfocitos T naive al nacimiento, predispone a estos pacientes a presentar una inmunidad adaptativa significativamente dañada. Este hecho hace que en la infancia puedan presentar infecciones severas, persistentes y oportunistas.<sup>19</sup>

Al valorar los efectos producidos por la timectomía en la inmunidad adaptativa, podemos destacar que los pacientes timectomizados de nuestro estudio no sufren más infecciones que los niños del grupo control sanos, pero la timectomía en neonatos sí da lugar a una disminución significativa de los niveles de linfocitos T y TRECS, así como al cese de la timopoyesis. Esto podría producir un compromiso de la función inmune en la vida adulta, especialmente si los pacientes sufren una depleción de las células T y necesitan una reconstitución de la función inmune.<sup>4, 21, 22</sup>

### **5.2.3. Consecuencias clínicas de la timectomía a largo plazo**

Varios estudios muestran que los pacientes que sufrieron una timectomía en la edad neonatal se encuentran más predispuestos a sufrir enfermedades relacionadas con la edad, tales como enfermedades autoinmunes, cáncer, aterosclerosis o enfermedades neurodegenerativas.<sup>5, 6, 18</sup> Del mismo modo, otros autores han concluido que los individuos sin timo poseen más tendencia a desarrollar rash cutáneo, eccemas o alergias de contacto.<sup>23</sup>

A pesar de la presencia de autoanticuerpos en los pacientes timectomizados, la enfermedad clínica autoinmune no es frecuente, posiblemente por una proliferación de las células Treg propias y un aumento de su proporción tras la timectomía, la cual suprime la autorreactividad los primeros años. Sin embargo, dado que los autoanticuerpos pueden aparecer antes del comienzo de los síntomas, una monitorización de estos pacientes es necesaria para determinar si la clínica autoinmune se desarrolla en una edad más adulta.<sup>19</sup> A pesar de que pueda darse una proliferación propia de las células Treg, cabe destacar que en nuestro estudio, los pacientes timectomizados han presentado valores de linfocitos T reguladores menores que los correspondientes a los valores de referencia y a los del grupo control. Este hecho conlleva menores niveles de linfocitos que actúen suprimiendo la activación del sistema inmunitario y mantenimiento de la homeostasis, por lo que como consecuencia, se podría dar una falta de tolerancia hacia los autoantígenos y favorecer así el debut de enfermedades autoinmunes en un futuro.<sup>18, 19</sup>

El seguimiento a largo plazo de quienes han sufrido una timectomía cardíaca demuestra una inmunosenescencia temprana que predispone a complicaciones tardías, incluyendo el desarrollo de la enfermedad linfoproliferativa postrasplante asociada al virus Eibstein-Barr (PTLD).<sup>19</sup>

Ferrando-Martínez et al.<sup>3</sup> investigó sobre la involución del timo y concluyó que se acepta como un desencadenante inicial de la fragilidad inmunológica asociada a la edad, o inmunosenescencia que se observa en el anciano. Pese a la relevancia clínica de la inmunosenescencia (falta de respuesta a las vacunas, aumento en enfermedades infecciosas e incluso aumento de la afección oncológica), durante mucho tiempo se ha asumido que la funcionalidad del timo adulto era insignificante y que, en consecuencia, el repertorio de linfocitos T se fijaba durante el primer año de vida. Pese a ello, estudios centrados en diferentes escenarios de linfopenia clínica han mostrado que el timo adulto no solo es funcional sino que es capaz de incrementar su función para acelerar la reconstitución inmunológica de los sujetos cuyo sistema inmunitario se ve afectado por la quimioterapia o por el VIH.



Posteriores estudios mostraron que los timocitos preservados en los islotes linfoepiteliales de timos ancianos mantienen la misma capacidad para generar linfocitos T maduros que los timocitos obtenidos de tejido joven. Esto sugiere que es la desestructuración del epitelio tímico la que impide la maduración de la parte linfopoyética preservada, por lo que aquellos islotes linfoepiteliales que mantienen la arquitectura tímica son capaces de generar linfocitos T maduros y funcionales, independientemente de la edad del sujeto.<sup>3, 24</sup>

Según lo referido podemos considerar a los pacientes con D- T.G.V. timectomizados como posibles efectores de inmunosenescencia temprana. Esto quiere decir, que el timo sufre un proceso de atrofia y puede ser una diana capaz de enlentecer o incluso revertir la pérdida de aporte tímico asociada a la edad.

La mejora en la respuesta a vacunas y en el pronóstico de las enfermedades infecciosas, el retraso en la aparición de patologías oncológicas y autoinmunes o incluso la prevención de enfermedades cardiovasculares (controlando la inflamación sistémica mediante la normalización del sistema inmunitario), son algunos de los importantes beneficios que podrían derivarse de aquellas estrategias futuras que permitan mantener y/o incrementar la funcionalidad del timo tanto en los pacientes timectomizados en período neonatal como en los ancianos.<sup>3</sup>

### **5.3. RELACIÓN CON EL SÍNDROME DE DIGEORGE**

La cuantificación de los linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK y monocitos en sangre periférica mediante citometría de flujo constituye un análisis fundamental para caracterizar la linfopenia en los pacientes con SD22Q11<sup>26</sup>, ya que algunos pacientes presentan disminución de linfocitos B particularmente en la infancia, pero éstos se normalizan con el tiempo.<sup>26, 27</sup> Por otra parte, al igual que los linfocitos T CD3<sup>+</sup>, los linfocitos NK disminuyen significativamente con la edad en los pacientes con DGS, aunque en algunos casos, pueden mantenerse estables y la relevancia clínica de este hallazgo es incierta.<sup>27</sup>

El DGS completo con inmunodeficiencia grave, se define por recuentos absolutos de linfocitos T CD3<sup>+</sup> < 500 células/ml con respuestas linfoproliferativas muy disminuidas o ausentes. El DGS parcial con inmunodeficiencia leve a moderada, se define por valores de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en sangre periférica entre 500 y 1.500 células/ml con respuestas linfoproliferativas levemente disminuidas.<sup>12</sup> Ocasionalmente pueden dar lugar a infecciones, pero suele tener un buen pronóstico a largo plazo, lo que indica, en la mayoría de los casos, un manejo expectante ya que la función y número de linfocitos T tiende a normalizarse con el tiempo.<sup>12, 26, 27</sup>

Debe tenerse en cuenta que la inmunodeficiencia de linfocitos T en DGS está relacionada con la edad, siendo más marcada en el período neonatal y en el primer año de vida. Además, los números absolutos de estas células disminuyen de manera fisiológica a partir de los 2 años de edad aproximadamente, pero este fenómeno sucede a un ritmo más lento que el normal en los pacientes con DGS con compromiso inmune. Por estas razones, la evaluación de los linfocitos totales y las subpoblaciones linfocitarias debe realizarse al menos cada 6 meses hasta que los linfocitos alcancen los rangos de normalidad de acuerdo con la edad.<sup>12, 26</sup>

Las anormalidades en el número o función de linfocitos T en DGS puede afectar la producción de ciertos isotipos de inmunoglobulinas (Ig) e incluso los títulos protectores de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación, contribuyendo a aumentar la susceptibilidad de infecciones recurrentes. Se debe realizar dosificación inicial de IgM, IgG, IgA e IgE en el suero y comparar los valores de acuerdo con la edad y sexo del paciente.<sup>12, 28</sup> Por lo tanto, es necesario evaluar en edad preescolar también la producción de IgG en respuesta a antígenos T dependientes, tales como tétanos, difteria, virus de hepatitis B o rubéola. Adicionalmente, para antígenos T-independientes se evalúan anticuerpos IgG contra varios de los serotipos contenidos en las vacunas disponibles para neumococo.<sup>12</sup> Si relacionamos el DGS con la probable inmunodeficiencia de los pacientes timectomizados a causa de una cirugía cardíaca en la infancia temprana, también tendríamos que considerar en éstos últimos, la evaluación de la producción de IgG en el contexto de la vacunación.<sup>12, 13</sup>

En el estudio de Deshpande et al.<sup>14</sup> en el que identificaron a 419 individuos diagnosticados de DGS, encontraron que una alta proporción de niños pequeños presentaban una disminución de los valores de CD3<sup>+</sup> en comparación con los individuos más mayores. Además, también vieron que DGS está asociado con un incremento del riesgo de autoinmunidad y atopia, presentando porcentajes de 3,7-22% y 24-66% de los pacientes respectivamente.<sup>14</sup> Esto podría sugerir que niveles altos proliferativos homeostáticos con niveles más bajos de la categoría de CD3 podría potencialmente contribuir al desarrollo de autoinmunidad y que defectos de linfocitos B (niveles bajos de IgG) podría ser adicionalmente un potencial añadido.

## 6. CONCLUSIONES

1-La timectomía parcial o completa practicada en el tratamiento quirúrgico de neonatos con cardiopatía congénita tipo D- T.G.V, tiene un impacto significativo en la formación de las células del sistema inmune y en el mantenimiento del fenotipo y funcionamiento de las células T naive en la edad adulta de estos pacientes.

2-En nuestro estudio se observa una disminución significativa de las cifras de linfocitos totales y de las subpoblaciones linfocitarias en dichos pacientes.

3-A pesar de la afectación linfocitaria significativa registrada, en este estudio realizado en nuestro medio y con un grupo de edad de 6 a 17 años, no se ha encontrado una mayor incidencia de clínica infecciosa ni enfermedades autoinmunes, hasta esta edad, comparada con el grupo control.

4- Diversos estudios indican que la timectomía parcial o completa da lugar a una inmunosenescencia acelerada del sistema inmune y reduce la diversidad de células T, lo cual podría llevar en consecuencia a un incremento de las enfermedades autoinmunes o neurodegenerativas en la edad adulta.

De acuerdo con dichos estudios y dada la afectación linfocitaria significativa encontrada en el nuestro, se considera imprescindible realizar un seguimiento (analítico-clínico) periódico a largo plazo de los pacientes timectomizados en el periodo neonatal.

5- A pesar de que la Inmunología y la Gerontología han infravalorado la relevancia de la función tímica en el adulto, estudios recientes han mostrado la importancia de mantener el timo funcionando en las últimas épocas de la vida. El timo adulto y anciano es funcional e impacta tanto en el sistema inmunitario periférico (retardando las alteraciones asociadas a la edad en las subpoblaciones de linfocitos T) como en la supervivencia del anciano, por lo que sería conveniente la valoración de una timectomía parcial en lugar de la extirpación total del timo en la cirugía que tiene lugar en el periodo neonatal con motivo de la corrección de la cardiopatía congénita D- T.G.V. (Técnica de Jatene).

6-Así como en los pacientes con DGS con fenotipo parcial y compromiso inmunológico leve, es necesario realizar un seguimiento de la función inmune para prevenir complicaciones y en los pacientes con DGS y fenotipo con compromiso severo de la función inmune, en quienes la no vacunación con vacunas contra microorganismos oportunistas, el uso de productos sanguíneos irradiados y desleucocitados y la reconstitución inmunológica temprana que restablece la función inmune de forma definitiva, radicalmente cambia el desenlace de la enfermedad y mejora el pronóstico a largo plazo, la caracterización inmunológica es fundamental. Se considera necesario llevar a cabo un seguimiento a largo plazo y caracterización inmunológica tras la vacunación contra microorganismos oportunistas, de los pacientes timectomizados con inmunodeficiencia analítica.

7- Se consideran necesarios trabajos adicionales que hagan énfasis en otros aspectos clínicos que puedan estar afectados tanto en los pacientes timectomizados en la infancia temprana como en los pacientes con síndrome de DiGeorge. Con objeto de ofrecer las mejores alternativas, tanto diagnósticas como terapéuticas, en busca de mejorar la calidad de vida y prevenir o tratar las posibles complicaciones infecciosas o autoinmunes en dichos grupos de pacientes.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
- 2- Van Gent R, Schandenberg A, Otto S et al. Long-term restoration of the human T-cell compartment after thymectomy during infancy: a role for thymic regeneration?. *Immunobiology*. July 2011; 118 (3).
- 3- Ferrando-Martínez S, De la Fuente M, Guerrero JM et al. Impacto de la función tímica en el deterioro inmunológico asociado a la edad. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 2013; 48 (5):232-237.
- 4- Mancebo E, Clemente J, Sánchez J et al. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *British Society of Immunology, Clinical and Experimental Immunology*. 2008; (154): 375-383.
- 5- Eysteinsdottir J.H, Freysdottir J, Haraldsson A et al. The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. *Clinical and Experimental Immunology*. February 2004; 136: 349-355.
- 6- Prelog M, Keller M, Geiger R et al. Thymectomy in early childhood: Significant alterations of the CD4+, CD45RA+, CD62L+ T cell compartment in later life. *Clinical Immunology*. 2009; (130): 123-132.
- 7- Chávez FR, Rojas-Lemus M. Thymic regulatory T cells: origins, role and their importance in illness and health. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2017; 60:5.
- 8- Sallusto F, Lenig D, Forster R et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401 (6754): 4260-4266.
- 9- Gudmundsdottir J, Oskarsdottir S, Skogberg G et al. Early thymectomy leads to premature immunologic ageing: An 18-year follow-up. *J Allergy Clinical Immunology*. November 2016; 138 (5). Available online at Elsevier.

- 10- Halnon NJ, Jamieson B, Plunkett M et al. Thymic function and impaired maintenance of peripheral T Cell Populations in Children with Congenital Heart Disease and Surgical Thymectomy. *International Pediatric Research Foundation*. 2005; 57 (1).
- 11- Smith S, Sweetser MT, Wilson CB et al. The immunocompromised host. *Pediatr Rev* 1996;17:435-9.
- 12- Vásquez-Echeverri E, Sierra F, Trujillo-Vargas C et al. Abordaje inmunológico del síndrome por delección 22q11.2. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología* 2016; 20 (1): 45-55.
- 13- Graham Davies E et al. Immunodeficiency in DiGeorge syndrome and options for treating cases with complete athymia. *Front Immunol*. 2013 (322).
- 14- Deshpande DR, Demirdag YY, Marsh R et al. Relationship between severity of T cell lymphopenia and Immune Dysregulation in Patients with DiGeorge Syndrome (22q11.2 Deletions and/or Related TBX1 Mutations): a USIDNET study. *Journal of Clinical Immunology* 2021; 41: 29-37.
- 15- Garcia-Prat M, Alvarez-Sierra D, Aguiló-Cucurull A, Salgado-Perandrés S, Briongos-Sebastian S, Franco-Jarava C, Martin-Nalda A, Colobran R, Montserrat I, Hernández-González M, Pujol-Borrell R, Soler-Palacin P, and Martínez-Gallo M. Extended Immunophenotyping Reference Values in a Healthy Pediatric Population. *Cytometry Part B* 2019; 96B:223-233.
- 16- Van Gent R, Van Tilburg C.M, Nibbelke E.E et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T-and B-cell compartment. *Clinical Immunology*. 2009; 133: 95-107.
- 17- Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E et al. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr*. 2001; 139:715-723.
- 18- Stosio M, Ruszkowski J, Mikosik-Roczynska A et al. The significance of neonatal thymectomy for shaping the immune system in children with congenital heart defects. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska* 2017; 14 (4): 258-262.

- 19- Deya-Martínez MD, Flinn AM, Gennery AR et al. Neonatal Thymectomy in children, accelerating the immunological clock. *J Allergy and Clinical Immunology*. February 2020. Available online at Elsevier.
- 20- Van de Broek T, Delemarre EM, Janssen WJ et al. Neonatal thymectomy reveals differentiation and immunomodulation. *Int Immunopharmacol* 2016; 126: 1126-1136.
- 21- Sauce D, Larsen M, Fastenackels S et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest*. 2009; 119: 370-378.
- 22- Zlamy M, Wurznner R, Holzmann H et al. Antibody dynamics after tick-born encephalitis and measles-mumps-rubella vaccination in children post early thymectomy. *Vaccine*. 2010; 28: 8053-8060.
- 23- Roosen J, Oosterlinck W, Meyns B. Routine thymectomy in congenital cardiac surgery changes adaptive immunity without clinical relevance. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015; 20: 101-106.
- 24- Chiodi H. The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology*. 1940; 26: 107-116.
- 25- Henry L. Involution of the human thymus. *J Pathol Bacteriol*. 1967; 93: 661-671.
- 26- Boldt A, Borte S, Fricke S et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014; 86: 191-206.
- 27- McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP et al. Immunologic defects in 22q11.2 deletion syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122: 362-367.
- 28- Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, Grumach AS et al. Guidelines for the use of human immunoglobulin therapy in patients with primary immunodeficiencies in Latin America. *Allergol Immunopathol*. 2014; 42: 245-260.
- 29- Afifi A, Raja SG, Pennington DJ, Tsang VT. For neonates undergoing cardiac surgery does thymectomy as opposed to thymic preservation have any adverse immunological consequences? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010 Sep;11(3):287-91



**Table 1 Percentages of total T cells and T-cell subsets.**

	No.	Cord blood	0–6 months	6–12 months	1–2 years	2–3 years	3–4 years	4–6 years	6–9 years	9–12 years	12–15 years	15–18 years
Lymphocytes (of leukocytes)	98	nd	63.1 (50.1–70.1)	58.2 (48.4–76.5)	63.4 (43.0–65.2)	47.7 (33.4–62.8)	52.0 (36.3–60.5)	39.9 (30.2–59.2)	46.3 (26.0–49.6)	42.0 (34.5–48.2)	40.8 (24.2–51.3)	34.3 (27.0–44.1)
Total CD4 <sup>+</sup> T cells	109	46.7 (40.2–61.9)	43.2 (37.6–46.4)	43.5 (29.8–63.4)	42.4 (33.0–55.0)	47.7 (28.1–43.2)	37.1 (18.3–42.7)	38.2 (26.8–42.3)	31.5 (26.5–41.4)	36.2 (28.4–44.4)	35.0 (30.4–52.9)	38.2 (29.3–52.9)
% Ki67 <sup>+</sup>	83	1.8 (0.8–2.5)	1.4 (0.8–2.1)	0.6 (0.2–1.5)	0.5 (0.1–1.9)	0.5 (0.1–1.7)	0.9 (0.4–1.3)	1.0 (0.6–1.6)	0.8 (0.4–1.5)	0.6 (0.4–1.1)	1.0 (0.5–1.8)	0.9 (0.6–1.4)
% CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup>	80	4.6 (3.1–6.3)	5.7 (4.1–8.8)	4.5 (3.2–7.5)	3.7 (2.9–5.7)	3.0 (1.9–5.5)	3.6 (2.0–4.1)	2.9 (1.5–3.8)	3.1 (1.5–4.8)	2.4 (1.0–3.4)	2.2 (1.2–4.6)	1.7 (0.8–2.6)
% CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup>	80	0.8 (0.3–1.2)	0.9 (0.7–1.2)	1.0 (0.4–1.5)	1.0 (0.3–1.3)	1.7 (1.0–2.1)	1.3 (0.8–3.0)	1.9 (1.0–2.7)	2.0 (1.0–3.3)	1.6 (1.3–2.6)	2.3 (1.4–3.6)	1.3 (0.9–2.2)
% CD31 <sup>+</sup>	81	76.2 (69.7–79.1)	67.1 (55.7–76.7)	66.5 (54.1–75.3)	60.3 (47.2–71.2)	55.9 (53.2–67.5)	64.7 (53.9–75.3)	61.3 (59.3–74.8)	54.7 (44.3–68.4)	53.0 (40.1–56.7)	53.0 (35.7–59.4)	40.9 (33.4–61.8)
% CD31 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RO <sup>-</sup>	81	73.1 (68.1–75.9)	67.4 (56.3–76.4)	65.8 (54.8–73.5)	60.4 (45.5–70.7)	54.4 (52.3–66.6)	62.9 (52.7–73.9)	59.5 (56.8–72.8)	51.9 (43.9–66.4)	49.7 (40.1–54.8)	49.7 (33.5–58.2)	38.8 (32.7–60.9)
% CD38 <sup>+</sup>	85	98.2 (97.2–98.7)	95.4 (91.1–96.5)	95.3 (93.2–96.6)	91.1 (84.5–94.9)	87.4 (82.4–91.9)	84.0 (80.8–90.0)	82.7 (78.5–89.6)	77.3 (72.8–85.4)	69.1 (66.3–80.2)	70.0 (51.3–80.4)	65.2 (50.9–71.8)
% HLA-DR <sup>+</sup>	85	0.3 (0.2–0.5)	0.7 (0.6–1.0)	0.7 (0.5–1.1)	0.8 (0.4–2.0)	1.4 (0.9–2.0)	1.9 (0.6–2.6)	1.6 (0.6–4.1)	1.7 (0.5–2.9)	2.0 (0.6–3.4)	1.4 (1.1–5.0)	1.4 (0.8–2.2)
% CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	85	0.3 (0.2–0.4)	0.7 (0.5–0.8)	0.6 (0.4–1.0)	0.6 (0.3–1.3)	0.7 (0.6–1.2)	0.7 (0.4–1.5)	0.8 (0.3–2.5)	1.0 (0.3–1.8)	1.0 (0.3–2.0)	0.9 (0.3–1.0)	0.6 (0.3–1.0)
% CD127 <sup>+</sup>	82	89.7 (88.3–94.6)	78.0 (68.7–86.1)	74.3 (65.8–86.6)	78.0 (70.7–84.5)	80.0 (71.4–91.6)	70.6 (63.9–61.9)	80.0 (61.9–84.6)	76.3 (59.2–84.6)	81.7 (71.5–89.5)	81.7 (65.8–89.6)	79.1 (70.3–87.3)
CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells (regulatory)	81	5.2 (3.5–7.0)	6.8 (4.9–9.8)	5.5 (3.6–9.0)	5.1 (3.7–6.7)	5.0 (2.9–7.4)	4.9 (3.3–6.8)	4.9 (3.1–6.1)	5.4 (2.3–7.7)	4.0 (2.6–6.1)	4.7 (2.8–7.2)	3.1 (2.2–4.1)
% CD27 <sup>-</sup> CD45RO <sup>-</sup>	80	85.1 (77.0–94.3)	87.2 (82.6–89.7)	84.2 (80.7–90.0)	80.7 (71.6–92.7)	65.7 (59.5–75.0)	70.5 (51.8–82.3)	59.3 (44.0–75.2)	59.1 (49.5–71.0)	53.6 (37.8–69.6)	52.5 (36.8–66.4)	54.0 (34.8–70.3)
% CD45RO <sup>+</sup> (memory or effector)	80	14.9 (5.7–23.0)	12.6 (10.3–16.9)	15.8 (9.8–19.3)	19.0 (7.1–28.3)	34.2 (24.8–40.1)	29.4 (17.7–46.8)	40.6 (24.2–55.5)	40.8 (30.2–50.3)	44.2 (30.2–62.2)	46.9 (33.4–62.9)	45.9 (29.6–62.8)
CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells (naïve)	109	94.5 (91.9–98.1)	92.6 (89.6–94.6)	89.7 (83.5–94.7)	87.4 (82.3–95.1)	78.8 (71.5–84.2)	74.8 (64.5–83.8)	72.7 (57.8–81.0)	65.1 (55.6–75.8)	62.7 (53.4–74.7)	60.2 (49.3–72.0)	62.0 (49.4–71.9)
% Ki67 <sup>+</sup>	82	1.5 (0.7–2.1)	0.7 (0.3–1.2)	0.2 (0.1–0.5)	0.2 (0.1–0.4)	0.2 (0.0–0.3)	0.2 (0.1–0.3)	0.1 (0.1–0.1)	0.2 (0.1–0.3)	0.1 (0.1–0.1)	0.1 (0.1–0.2)	0.2 (0.1–0.4)
% CD25 <sup>+</sup>	81	5.5 (4.0–7.4)	4.7 (2.6–7.6)	4.1 (1.4–6.3)	2.4 (1.3–3.8)	2.6 (1.0–3.7)	1.8 (0.5–4.2)	1.7 (0.8–3.0)	1.8 (0.7–4.5)	1.2 (0.6–3.0)	1.4 (0.8–2.9)	1.9 (0.5–3.2)
% CD31 <sup>+</sup>	81	78.1 (71.7–81.3)	71.3 (60.5–81.8)	71.5 (58.8–83.0)	66.0 (48.4–76.3)	69.3 (65.0–79.5)	79.1 (65.2–83.4)	79.3 (71.6–85.3)	76.0 (61.0–84.2)	67.1 (57.9–80.5)	69.8 (57.9–78.9)	63.9 (51.4–79.1)
% CD127 <sup>+</sup>	82	91.3 (90.1–95.7)	82.1 (71.7–88.6)	79.6 (73.3–85.5)	79.5 (74.3–90.3)	83.9 (73.8–95.2)	72.5 (66.1–85.8)	81.1 (69.4–89.2)	81.0 (64.6–88.8)	85.2 (75.1–91.3)	85.5 (80.8–93.3)	84.1 (77.6–91.9)
CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells (memory)	109	5.1 (1.9–8.0)	6.9 (5.1–9.3)	9.5 (4.8–13.3)	12.1 (4.1–16.5)	19.3 (14.9–25.5)	23.4 (14.3–33.0)	23.7 (17.9–39.0)	30.2 (22.5–37.0)	30.7 (21.4–40.3)	35.2 (24.5–44.4)	33.8 (24.3–42.7)
% Ki67 <sup>+</sup>	76	nd	14.5 (8.3–21.9)	5.8 (3.9–9.3)	5.5 (1.3–11.7)	3.9 (3.3–5.8)	3.9 (1.4–5.8)	3.8 (2.5–7.9)	2.8 (1.3–4.3)	1.5 (1.2–2.3)	2.1 (1.6–3.4)	2.4 (1.7–3.8)
% CD25 <sup>+</sup>	64	nd	14.9 (9.1–21.5)	14.2 (7.7–22.0)	14.2 (11.0–17.8)	15.5 (14.0–26.0)	16.7 (12.2–22.6)	21.3 (14.7–27.2)	24.5 (17.5–31.1)	20.4 (16.4–36.2)	22.4 (13.6–23.5)	18.8 (13.5–22.0)
% CD31 <sup>+</sup>	81	99.3 (97.4–99.7)	93.5 (79.7–97.6)	93.6 (81.7–96.9)	85.4 (73.9–95.3)	73.1 (53.4–85.5)	79.7 (67.1–89.7)	82.4 (51.1–90.3)	75.5 (54.4–88.3)	71.4 (60.1–82.2)	75.6 (57.5–89.4)	81.1 (50.2–86.6)
% CD38 <sup>+</sup>	85	97.6 (93.5–98.6)	90.9 (84.9–96.6)	90.2 (85.2–96.2)	71.4 (65.8–86.1)	71.4 (67.5–88.1)	69.5 (51.5–82.6)	78.2 (56.2–81.4)	66.2 (49.1–65.3)	59.4 (39.1–61.6)	47.1 (37.0–68.7)	32.4 (20.8–48.2)
% HLA-DR <sup>+</sup>	83	0.2 (0.1–0.3)	0.8 (0.5–4.1)	0.7 (0.6–2.1)	1.7 (0.4–5.8)	1.7 (1.4–9.2)	4.1 (1.4–18.5)	4.1 (0.7–12.8)	2.2 (1.5–4.2)	3.0 (1.4–5.8)	3.6 (0.7–7.4)	3.6 (1.2–8.1)
% CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	83	0.2 (0.1–0.3)	0.8 (0.5–4.1)	0.7 (0.6–2.0)	1.7 (0.4–4.4)	1.7 (1.3–8.8)	3.3 (1.1–16.0)	3.3 (0.5–10.7)	1.9 (1.1–3.2)	1.5 (0.9–3.6)	0.8 (0.4–3.7)	2.2 (0.9–4.2)
% CD127 <sup>+</sup>	82	93.5 (86.7–97.7)	79.0 (68.3–92.5)	84.9 (61.3–88.2)	78.9 (59.6–85.5)	69.4 (50.1–87.0)	59.5 (42.6–76.0)	67.3 (39.8–83.7)	72.5 (41.7–87.3)	72.9 (45.5–83.7)	81.2 (62.3–89.4)	69.4 (64.2–82.1)
CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells (naïve)	109	95.4 (90.4–98.1)	94.9 (78.5–97.1)	94.4 (68.7–96.6)	95.7 (77.5–98.5)	86.7 (57.1–91.4)	74.7 (54.6–90.6)	64.6 (53.2–87.2)	75.8 (57.0–83.7)	74.0 (49.2–82.7)	74.7 (62.3–86.3)	64.3 (48.6–87.5)
% Ki67 <sup>+</sup>	82	3.6 (1.8–4.6)	1.4 (0.7–3.4)	0.7 (0.3–1.5)	0.3 (0.1–1.5)	0.3 (0.3–3.0)	0.3 (0.2–1.6)	0.3 (0.2–2.2)	0.3 (0.1–0.8)	0.2 (0.1–0.8)	0.2 (0.1–0.3)	0.4 (0.2–0.5)
% CD25 <sup>+</sup>	80	14.3 (3.1–16.4)	1.0 (0.3–6.6)	0.6 (0.3–1.5)	1.0 (0.3–1.7)	1.0 (0.1–0.9)	0.3 (0.2–3.0)	0.5 (0.2–1.0)	0.4 (0.0–3.0)	0.2 (0.2–1.3)	0.2 (0.0–0.7)	0.6 (0.2–1.6)
% CD31 <sup>+</sup>	81	99.7 (98.7–99.9)	96.4 (80.4–98.7)	94.4 (92.6–97.4)	89.8 (81.2–95.2)	80.6 (76.5–90.1)	88.3 (79.5–97.4)	89.6 (61.4–95.0)	86.4 (72.0–96.3)	86.7 (68.6–91.3)	84.2 (65.2–94.0)	85.5 (64.8–93.7)
% CD127 <sup>+</sup>	82	96.0 (91.8–98.9)	86.6 (78.6–94.4)	92.0 (82.8–94.2)	89.1 (71.7–92.4)	88.7 (78.6–93.0)	74.6 (58.8–94.1)	85.0 (76.8–93.8)	83.9 (76.2–95.6)	91.6 (74.0–96.4)	90.6 (81.4–96.2)	84.6 (77.2–92.0)
CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells (memory)	109	4.2 (1.7–8.8)	3.7 (2.6–14.6)	5.2 (3.1–11.6)	4.1 (1.0–8.3)	10.5 (5.9–22.3)	14.2 (5.5–23.3)	16.6 (8.5–38.9)	16.6 (9.2–22.6)	18.3 (11.5–30.7)	19.1 (12.2–27.2)	24.2 (9.8–37.6)
% Ki67 <sup>+</sup>	52	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
% CD31 <sup>+</sup>	73	nd	76.7 (62.1–89.3)	70.6 (53.2–89.7)	65.8 (56.9–73.3)	62.0 (50.9–64.7)	69.3 (60.8–78.6)	75.5 (54.2–84.2)	62.3 (43.6–75.5)	57.9 (51.1–77.0)	58.9 (36.4–62.2)	75.7 (51.2–85.7)
% CD127 <sup>+</sup>	54	nd	nd	nd	nd	32.1 (14.8–54.4)	36.6 (23.0–42.6)	39.5 (14.3–58.2)	57.2 (25.8–76.3)	62.8 (16.6–80.2)	76.2 (48.5–83.7)	70.5 (56.3–93.7)
CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells (memory effector)	109	0.1 (0.0–0.1)	0.1 (0.0–3.1)	0.1 (0.1–7.1)	0.1 (0.0–2.8)	0.8 (0.3–6.8)	1.3 (0.4–12.7)	4.3 (0.4–6.0)	2.3 (0.7–14.0)	1.6 (0.7–7.5)	1.2 (0.8–6.2)	3.7 (0.2–6.9)
CD27 <sup>-</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells (effector)	109	0.7 (0.0–1.1)	0.3 (0.1–6.7)	0.3 (0.2–12.7)	0.6 (0.1–11.6)	2.5 (0.6–16.4)	2.8 (0.8–21.7)	4.3 (0.6–28.9)	3.8 (0.9–17.9)	6.1 (1.5–20.8)	6.6 (1.4–13.2)	6.6 (0.8–14.0)
CD45RO <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells	109	4.3 (1.7–8.8)	3.8 (2.7–15.6)	5.3 (3.1–18.7)	4.1 (1.0–11.1)	11.4 (6.4–28.7)	17.4 (7.4–30.0)	20.8 (10.6–40.6)	19.6 (13.4–29.9)	19.1 (13.3–33.7)	21.3 (10.3–29.3)	28.0 (11.7–42.9)
% Ki67 <sup>+</sup>	41	nd	nd	nd	nd	16.5 (4.1–27.4)	4.7 (2.4–16.3)	5.9 (3.4–12.4)	2.7 (1.9–7.7)	2.1 (1.6–4.4)	2.9 (1.1–5.4)	3.2 (1.5–11.7)

**Anexo 2. Valores de referencia de los porcentajes totales de linfocitos T y subpoblaciones linfocitarias.**

CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells (memory effector)	109	0.0 (0.0–0.1)	0.3 (0.1–0.8)	0.4 (0.2–2.7)	0.4 (0.2–0.8)	1.4 (0.5–2.2)	1.4 (0.4–3.4)	2.1 (0.9–5.1)	3.2 (1.5–9.7)	5.7 (2.6–6.7)	3.9 (2.1–5.5)	3.2 (2.1–7.4)
CD27 <sup>-</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells (effector)	109	0.0 (0.0–0.9)	0.3 (0.0–0.5)	0.2 (0.1–1.5)	0.4 (0.1–0.5)	0.2 (0.0–0.9)	0.4 (0.1–1.1)	0.2 (0.1–0.5)	0.4 (0.1–1.3)	0.9 (0.1–2.9)	0.3 (0.1–8.5)	0.3 (0.1–2.2)
CD45RO <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells	109	5.1 (1.9–8.1)	7.0 (5.3–10.1)	10.3 (5.1–15.2)	12.3 (4.6–17.3)	21.0 (15.6–27.5)	24.5 (15.6–35.4)	26.9 (18.9–42.1)	34.3 (24.0–43.4)	33.9 (24.5–46.4)	39.5 (29.7–49.8)	37.5 (27.3–49.8)
% Ki67 <sup>+</sup>	76	nd	16.3 (9.1–21.5)	5.7 (4.7–9.9)	5.8 (1.7–12.3)	4.3 (3.7–6.4)	3.9 (1.6–6.1)	4.0 (2.9–7.2)	2.8 (1.4–4.2)	1.6 (1.4–2.5)	1.3 (1.3–3.8)	2.7 (1.7–3.8)
total CD8 <sup>+</sup> T cells	109	16.3 (14.3–21.3)	14.9 (7.7–22.0)	14.2 (11.0–17.8)	15.5 (14.0–26.0)	16.7 (12.2–22.6)	21.3 (14.7–27.2)	24.5 (17.5–31.1)	20.4 (16.4–36.2)	22.4 (13.6–23.5)	18.8 (13.5–22.0)	18.8 (13.5–22.0)
% Ki67 <sup>+</sup>	82	3.9 (3.1–9.9)	2.0 (1.0–2.0)	1.2 (1.2–1.2)	1.2 (1.2–1.2)	1.5 (1.5–1.5)	1.2 (1.2–1.2)	1.2 (1.2–1.2)	0.9 (0.9–0.9)	0.7 (0.7–0.7)	0.8 (0.8–0.8)	1.0 (1.0–1.0)
% CD31 <sup>+</sup>	81	99.3 (97.4–99.7)	93.5 (79.7–97.6)	93.6 (81.7–96.9)	85.4 (73.9–95.3)	73.1 (53.4–85.5)	79.7 (67.1–89.7)	82.4 (51.1–90.3)	75.5 (54.4–88.3)	71.4 (60.1–82.2)	75.6 (57.5–89.4)	81.1 (50.2–86.6)
% CD38 <sup>+</sup>	85	97.6 (93.5–98.6)	90.9 (84.9–96.6)	90.2 (85.2–96.2)	71.4 (65.8–86.1)	71.4 (67.5–88.1)	69.5 (51.5–82.6)	78.2 (56.2–81.4)	66.2 (49.1–65.3)	59.4 (39.1–61.6)	47.1 (37.0–68.7)	32.4 (20.8–48.2)
% HLA-DR <sup>+</sup>	83	0.2 (0.1–0.3)	0.8 (0.5–4.1)	0.7 (0.6–2.1)	1.7 (0.4–5.8)	1.7 (1.4–9.2)	4.1 (1.4–18.5)	4.1 (0.7–12.8)	2.2 (1.5–4.2)	3.0 (1.4–5.8)	3.6 (0.7–7.4)	3.6 (1.2–8.1)
% CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	83	0.2 (0.1–0.3)	0.8 (0.5–4.1)	0.7 (0.6–2.0)	1.7 (0.4–4.4)	1.7 (1.3–8.8)	3.3 (1.1–16.0)	3.3 (0.5–10.7)	1.9 (1.1–3.2)	1.5 (0.9–3.6)	0.8 (0.4–3.7)	2.2 (0.9–4.2)
% CD127 <sup>+</sup>	82	93.5 (86.7–97.7)	79.0 (68.3–92.5)	84.9 (61.3–88.2)	78.9 (59.6–85.5)	69.4 (50.1–87.0)	59.5 (42.6–76.0)	67.3 (39.8–83.7)	72.5 (41.7–87.3)	72.9 (45.5–83.7)	81.2 (62.3–89.4)	69.