



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biología

Facultad de Biología – Universidad de Murcia

Análisis poblacional de células linfoides innatas en sangre de cordón umbilical



Autor: Aurelio Franco García

Curso 2017-2018

D./Dña. **AURELIO FRANCO GARCÍA**, estudiante del Grado en **BIOLOGÍA** de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, DECLARO:

Que el Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa titulado **ANÁLISIS POBLACIONAL DE CÉLULAS LINFOIDES INNATAS EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL** y cuyo/s tutor/es son:

D./Dña. **TRINIDAD HERNÁNDEZ CASELLES**

es original y que todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

Murcia, a **11** de **JUNIO** de 2018.

A handwritten signature in black ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature appears to read 'Aurelio'.

Fdo: Aurelio Franco García

Listado de abreviaturas

ARN. Ácido ribonucleico.

CD. “*Cluster of differentiation*”, grupo de diferenciación.

EDTA. “*Ethylenediaminetetraacetic acid*”; ácido etilendiaminotetraacético.

FSC. “*Forward-scattered light*”.

HUVA. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

ieILC. “*Intra-Epithelial Innate Lymphoid Cells*”; linfocitos innatos intraepiteliales.

IFN γ . Interferón gamma.

IgA. Inmunoglobulina A.

IgE. Inmunoglobulina E.

IgG4. Inmunoglobulina G de tipo 4.

ILCs. “*Innate Lymphoid Cells*”; células linfoides innatas.

ILC1. “*Innate Lymphoid Cells type 1*”; células linfoides innatas de tipo 1.

ILC2. “*Innate Lymphoid Cells type 2*”; células linfoides innatas de tipo 2.

ILC3. “*Innate Lymphoid Cells type 3*”; células linfoides innatas de tipo 3.

IL. Interleucina.

IMIB. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca.

LAIB. Laboratorio de Investigación Biomédica.

LTi. “*Lymphoid Tissue Inducer*”; células inductoras de tejido linfoide.

NCR. “*Natural Cytotoxicity Receptor*”; receptor activador de células NK.

NELA. “*Nutrition in Early Life and Asthma*”.

PBS. “*Phosphate buffer saline*”; tampón fosfato salino.

PRRs. “*Pattern Recognition Receptors*”; receptores de reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos.

S.D. “*Standard Deviation*”; desviación estándar.

SSC. “*Side-scattered light*”.

TNF. “*Tumor Necrosis Factor*”; factor de necrosis tumoral.

Índice

1. Resumen y palabras clave	1
2. Introducción	2
2.1. Origen de las alergias	3
2.2. Bases de la respuesta inmunitaria frente a alérgenos	4
2.3. Células linfoides innatas	6
2.3.1. Células linfoides innatas de tipo 1	6
2.3.2. Células linfoides innatas de tipo 2	7
2.3.3. Células linfoides innatas de tipo 3	7
2.4. Relación madre-hijo en el desarrollo del sistema inmunitario fetal y neonatal	8
3. Justificación del trabajo	10
4. Objetivos	10
5. Materiales y métodos	11
5.1. Obtención de sangre venosa de cordón umbilical	11
5.2. Determinación de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo	11
5.2.1. Marcaje de linfocitos.	11
5.2.2. Adquisición de datos por citometría de flujo.....	12
5.2.3. Análisis de células NK	13
5.2.4. Análisis de células linfoides innatas	15
5.3. Determinación de linfocitos totales en sangre	18
5.4. Análisis estadístico de los datos	18
6. Resultados y discusión	19
6.1. Subpoblaciones de células NK y expresión de CD56	19
6.2. Recuento de ILC1 e ILC3	21
6.3. Recuento de ILC2	21
6.4. Composición global de ILCs en las muestras	23
7. Conclusiones	24
8. Bibliografía	25
9. Anexo: glosario de términos	27

1. Resumen y palabras clave

El descubrimiento de las células linfoides innatas y su papel en la inmunomodulación de las respuestas inmunitarias frente a microorganismos y alérgenos es un campo de estudio en creciente desarrollo. Se conoce que el sistema inmunitario fetal está condicionado por la colonización de microorganismos y la nutrición materna, pero la relación entre estos factores, el efecto en poblaciones de linfocitos innatos en el recién nacido y las posteriores consecuencias que puedan tener durante la infancia del niño no han sido estudiados. El objetivo principal de este trabajo ha sido la caracterización de los distintos perfiles poblacionales de estos linfocitos en sangre de cordón umbilical, provenientes de los recién nacidos en Murcia, cuyas madres habían sido sometidas a exhaustivos análisis y cuestionarios sobre salud y hábitos nutricionales. Para ello, se tomaron 57 muestras de sangre venosa de cordón umbilical y se cuantificaron los distintos fenotipos de linfocitos innatos por citometría de flujo. El análisis reveló variaciones en la expresión del marcador CD56 de células NK, que dividía a la cohorte en dos grupos: unos con alta expresión y otros con baja expresión, que puede estar relacionado con el grado de maduración de las NK. Además, se observó una tendencia de los recién nacidos a la polarización hacia células linfoides innatas de tipo 1. Estos resultados podrían servir como punto de inicio para dilucidar si existe alguna correlación entre una predominancia hacia cierto tipo de células linfoides innatas y el desarrollo de alergias durante la infancia.

The discovery of innate lymphoid cells and their role in immunomodulation of immune responses against microorganisms and allergens is a study field in growing development. It is known that the fetus immune system is conditioned by the colonization of microorganisms and maternal nutrition, but the relationship between these factors, the possible effect in lymphoid innate cells in the newborn and later consequences that may occur during childhood have not been studied yet. The main objective of this work was the characterization of the different population profiles of these lymphocytes in cord blood, extracted from newborns from Murcia whose mothers had been subjected to thorough analysis and had been tested about health and nutritional habits. In order to accomplish the objective, 57 venous cord blood samples were analyzed and different phenotypes of innate lymphocytes were quantified by flow cytometry. The analysis revealed variations in the expression of CD56, a marker of NK cells, which divided the cohort into two main groups depending on the level of expression of this marker: the first one, with high expression and the second one, with low expression of CD56. These phenotypes may be related to different maturation stages of NK cells in cord blood. In addition, we observed a tendency to polarization towards type 1 innate lymphoid cells in the newborns. These results may be useful to elucidate if there is any connection between the predominance of certain types of lymphoid cells in cord blood and the development of allergies during childhood.

Palabras clave: inmunología, células linfoides innatas, alergias, citometría de flujo, cordón umbilical.

Keywords: immunology, innate lymphoid cells, allergies, flow cytometry, umbilical cord.

2. Introducción

En los últimos años ha aumentado la incidencia de casos de alergia, especialmente en niños, donde se estima una prevalencia del 30%, dentro de la cual destacan las alergias respiratorias (rinitis y asma, con un 10%) y las alergias alimentarias (entre 5-7%, Eder et al., 2006). Se cree que este aumento tan rápido en la frecuencia de alergias en la población está relacionado con cambios socioeconómicos, en el modo de vida y en el ambiente.

En general, la hipersensibilidad se define como un trastorno causado por enfermedades inmunitarias en la que la respuesta frente a un antígeno se controla de forma inadecuada y se dirige a los tejidos del anfitrión. Dentro de esta definición se sitúan cuatro tipos distintos de reacciones hipersensibles, en la que destacamos las **reacciones alérgicas o hipersensibles de tipo I**, donde una sustancia generalmente inocua genera una respuesta exacerbada del sistema inmunitario. En este tipo de reacción, el organismo reacciona frente a alérgenos solubles, mediante una respuesta dependiente de IgE (inmunoglobulina E), que se desarrolla muy rápidamente, en pocos minutos. Los otros tipos de reacciones de hipersensibilidad, sin embargo, no se califican como alergias debido a que presentan características distintas (Abbas et al., 2015):

1. **Hipersensibilidad de tipo II.** En este caso, el antígeno soluble se une a la superficie de las células o a la matriz extracelular, donde se forman nuevos antígenos reconocidos por IgG (inmunoglobulina G). La activación del complemento y las reacciones mediadas por el reconocimiento de la IgG unida, como puede ser la fagocitosis o lisis celular, conlleva la destrucción de células que lleven el anticuerpo unido.
2. **Hipersensibilidad de tipo III.** Los antígenos solubles forman inmunocomplejos con IgG. Cuando precipitan causan reacciones inflamatorias y activan respuestas de reconocimiento de IgG, así como el sistema del complemento.
3. **Hipersensibilidad de tipo IV.** Se produce frente a antígenos solubles o asociados a células. Las células T son las mediadoras de este tipo de reacción. Los antígenos extraños son reconocidos por los linfocitos T cooperadores y citotóxicos y dan lugar a una reacción de hipersensibilidad que tarda varios días en producirse.

En nuestro estudio nos centraremos en los fenómenos de hipersensibilidad de tipo I. El proceso de hipersensibilización en este tipo de alergias se produce como resultado de dos fases principales (Regueiro et al., 2008):

1. **Fase de sensibilización.** En esta fase el individuo entra en contacto con el alérgeno a través de inhalación o ingestión. Las células presentadoras de antígenos contactan con los linfocitos Th (*helper*) y los activan. Cuando los linfocitos Th se ponen en contacto con los linfocitos B estimulan el cambio de isotipo a IgE. Estas IgE específicas del alérgeno se unen a través de su región Fc (fracción cristalizante) a su receptor localizado sobre la superficie de los mastocitos, a la espera de una segunda exposición al alérgeno.
2. **Fase de hipersensibilidad.** Cuando se produce la reexposición al alérgeno las IgE específicas unidas a los mastocitos los reconocen y provocan una cascada de señales que favorecen la liberación de mediadores inflamatorios, como leucotrienos, prostaglandinas, histamina, factores quimiotácticos y citoquinas. Estos mediadores son los responsables de la formación del cuadro clínico alérgico y, según la zona de exposición al alérgeno, el tiempo de exposición y la cantidad de alérgeno afectarán a la intensidad de la respuesta y al tiempo de respuesta. Esta reacción puede producirse de manera inmediata (liberación de sustancias preformadas en los gránulos de los mastocitos) o tardía (síntesis de nuevos mediadores y reclutamiento de eosinófilos, monocitos y linfocitos al foco inflamatorio).

2.1. Origen de las alergias

Si bien se conocen los eventos moleculares y celulares mediante los cuales se desarrollan estas enfermedades, el origen por el cual se ha producido un incremento tan destacable durante el último siglo se mantiene, más bien, desconocido.

No son muchas las hipótesis planteadas para explicar el acelerado ritmo con el que ha aumentado la incidencia de los casos de alergia en la población, y todas ellas buscan una explicación asociada a los cambios en el modo de vida que ha experimentado la sociedad occidental durante el último siglo.

La primera en tratar de aclarar la causa de este incremento fue la **hipótesis higienista**, que surgió de la mano de Strachan a finales de los años 80. Su estudio se centró en familias del Reino Unido que variaban en tamaño y curiosamente también en incidencia de esta anomalía. De esta forma se relacionó la pertenencia a familias numerosas con una menor incidencia de episodios alérgicos relacionados con el polen, al contrario de lo que sucede en familias más reducidas. El investigador infirió que esta correlación del tamaño familiar y de la presencia de la enfermedad podría deberse al carácter protector

de las infecciones transmitidas por contacto directo de individuo a individuo durante su etapa infantil, desembocando en una respuesta inmunitaria normal. Al ser más grande la familia, habría mayor posibilidad de infección. Esta hipótesis ha suscitado respuestas tanto detractoras como defensoras, habiendo algunos trabajos publicados, como el de Feldman et al. (2015), que refutan esta hipótesis alegando que las infecciones, supuestamente protectoras, lo que en realidad favorecen es una mayor incidencia en la aparición de asma.

Frente a la hipótesis higienista se planteó la idea de que no fuera la reducción en el número de infecciones la causante del aumento de casos de asma, sino la adopción de un nuevo modo de vida, el *Western lifestyle*. Este modo de vida se caracterizaría por la ejecución de poco ejercicio físico, aumento del tiempo que se pasa en lugares cerrados, consumo de dietas bajas en fibras y exceso de grasas saturadas. Todo ello contribuye al incremento de la incidencia de las alergias (Platts-Mills, 2015) a través de la conocida como **disbiosis microbiana**, es decir, la reducción de la diversidad microbiana en el intestino, piel y mucosas. Puesto que estas zonas son las principales barreras a la entrada de patógenos y en las que el sistema inmunitario se encuentra en contacto continuo con microorganismos comensales naturales, se plantea la posibilidad de que su alteración por fenómenos externos pudiera alterar la respuesta del sistema inmunitario frente a diversas sustancias, ocasionando la sintomatología alérgica. Es necesario aclarar que no se reduce el número de especies de microorganismos presentes, sino que se rompe el delicado balance en el número de representantes de cada especie. En este sentido, se ha demostrado que numerosos alérgenos presentan epítomos conformacionales y lineales muy parecidos a los antígenos que presentan determinadas proteínas infecciosas parasíticas. De esta forma, el contacto con dichas proteínas favorecería la tolerancia a los alérgenos a largo plazo, como ha sido demostrado en ratones, tanto *in vitro* como *in vivo* (Patel et al., 2015). La respuesta humoral a través de IgG4 e IgA (inmunoglobulina A) es la encargada de este fenómeno, de manera que se relaciona la deficiencia de IgA con un mayor riesgo de desarrollar alergias (Akdis et al., 1997). Se desconoce cómo podría afectar esto a los recién nacidos, pero se ha visto que el modo de alimentación del niño, el contenido de fibra en la dieta, el modo de nacimiento y la presencia de mascotas durante la infancia suponen factores importantes para la formación de la microbiota del niño (Lodge et al., 2015; Martin et al., 2016, Tun et al., 2017).

2.2. Bases de la respuesta inmunitaria frente a alérgenos

Los elementos celulares responsables de dirigir y coordinar la respuesta inmunitaria son los linfocitos Th, los cuales se pueden diferenciar, tras ponerse en contacto con el antígeno, en las diferentes poblaciones principales de linfocitos Th: Th1, Th2, Th17 y Treg (reguladores).

La mayoría de los estudios clásicos de fenómenos alérgicos hacen alusión al balance que se da entre dos tipos de linfocitos, Th1 y Th2, a favor de la diferenciación hacia Th2 en estos casos.

En los seres humanos existe un balance entre dos tipos celulares linfocitarios que regulan la respuesta inmunitaria adaptativa: los linfocitos Th1 y los linfocitos Th2. Los linfocitos Th2 son los que participan de forma activa en el desarrollo de las alergias, a través de la síntesis de diferentes mensajeros químicos o interleucinas (IL-4, IL-5 e IL-13). Estos mensajeros provocan la síntesis de IgE como consecuencia de la activación de linfocitos B y la activación de eosinófilos y células cebadas. Por otro lado, la dominancia de linfocitos Th1 actúa como regulador negativo suprimiendo la proliferación y activación de linfocitos Th2, estableciéndose un balance a favor de los linfocitos Th1. Con esta base, se piensa que la pérdida del contacto con elementos infecciosos provocaría la pérdida de células Th1 y, por tanto, el balance quedaría a favor de los linfocitos Th2. Aunque esta hipótesis presenta datos que la apoyan (la predominancia de poblaciones Th2 específicas del alérgeno y sus citoquinas sobre las poblaciones de Th1 en casos de asma; Wills-Karp, 1999), en individuos sanos no se ha visto una predominancia importante de poblaciones Th1. De forma paralela también se propone que, al ser los linfocitos Treg los mediadores en la respuesta ante parásitos en las mucosas y también reguladores de la presencia de linfocitos Th2, su disminución en número en las mucosas supondría un aumento de los linfocitos Th2 (Wilson et al., 2005).

Un papel clave en este tipo de respuesta inmunitaria, denominada también de tipo 2, lo juegan las células dendríticas, presentes en las barreras corporales expresando PRRs (receptores de reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos). Las células dendríticas inducen a los linfocitos Th1 y Th17, activándose la respuesta inmunitaria de tipo 1. También controlan la producción de anticuerpos para antígenos inhalados e ingeridos. Sin embargo, cuando no hay una fuerte señal polarizadora frente a un alérgeno (IL-12, IL-6, IL-23), estas células dendríticas favorecen el desplazamiento de la respuesta hacia la de tipo 2. De esta forma, un sistema inmunitario que no ha sido instruido correctamente debido a la ausencia de microorganismos comensales puede estar detrás de la polarización a respuesta tipo 2 (Lambrecht et al., 2017).

Por otro lado, recientes investigaciones han puesto de manifiesto un nuevo conjunto de poblaciones celulares denominado linfocitos innatos (ILCs) que participan de forma activa en el desarrollo de las alergias. En concreto los ILC2, que guardan similitud con los linfocitos Th2 en el patrón de secreción de interleucinas típicas Th2, pero sin expresar los marcadores propios de linaje de células T (CD3 y CD4). Este nuevo grupo de células ha demostrado tener una fuerte implicación en la síntesis de interleucinas responsables de dirigir la señal hacia la síntesis de IgE y, además, se ha demostrado que favorecen la migración de las células dendríticas hacia las zonas en contacto con los antígenos (Hammad & Lambrecht, 2015).

2.3. Células linfoides innatas

El papel de ciertos tipos celulares como los ILCs en el desarrollo de las respuestas inmunitarias y, por tanto, en las alergias es uno de los campos de investigación más recientes y que más prometen en el desarrollo de la inmunidad innata. Estos linfocitos, en humanos, se encuentran divididos en tres subpoblaciones principales, detectados a partir de sangre periférica de adulto (Walker et al., 2013), cuyos marcadores fenotípicos principales que los identifican se destacan en la tabla 1 y cuyas características generales se detallan a continuación. Sin embargo, los estudios que constatan la presencia de estos fenotipos en sangre de cordón umbilical y, por tanto, en el recién nacido, son muy limitados.

Tabla 1. Marcadores de superficie principales de los grupos de linfocitos innatos en sangre de adultos. Modificado de Trabanelli et al. (2018) y Mjösberg & Spits (2016).

Marcador Tipo celular	CD3	CD4	CD56	CD16	CD161	NKp46	CRTH2	ST2	CD117
NK	-	-	+	+/-	bajo	+	-	-	-
ieILC1	-	-	-	-	bajo	+	-	-	-
ILC1	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ILC2	-	-	-	-	+	-	+	+	+/-
ILC3	-	-	+/-	-	+	+/-	-	-	+
LTi	-	-	-	-	+	-	-	-	+

2.3.1. Células linfoides innatas de tipo 1

De acuerdo con Walker et al. (2013), este conjunto comprende las células NK, linfocitos innatos intraepiteliales (ieILC1) y linfocitos innatos similares a Th1 (ILC1).

Células *natural killer* (NK). Las células NK se encuentran englobadas dentro del grupo de los linfocitos efectores que presentan actividad citolítica sobre células tumorales e infectadas por virus, además de su participación en la amplificación de la cascada de señalización inflamatoria. Son células productoras de citoquinas similares a las producidas por los linfocitos Th1, sobre todo interferón gamma (INF γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Los marcadores típicos de la membrana de las NKs son el CD56, CD16 y el CD94. Se encuentran en órganos linfoides secundarios, sangre y órganos periféricos. Las células NK convencionales maduran en la médula ósea, pero también hay otra variedad que se desarrolla en el timo y que requiere de factores de crecimiento distintos.

Linfocitos innatos intraepiteliales (ieILC1). Este tipo de linfocitos destaca por su gran similitud a las células NK, ya que pueden producir citoquinas de tipo Th1 y también ser citotóxicos. Se

caracterizan por la expresión de CD103 sobre su superficie y solamente se han encontrado en mucosas y tejido inflamado (Simoni et al., 2017).

Linfocitos innatos tipo 1 (ILC1). Estos linfocitos se diferencian de las células NK por la ausencia de citotoxicidad. Además, no presentan los marcadores asociados a células NK. Las ILC1 se han encontrado en sangre, amígdalas y tejido intestinal inflamado. Este grupo de células genera controversia, ya que algunos estudios no han podido determinar con exactitud la población utilizando citometría de flujo masiva (Newell & Cheng, 2016). Además, otras publicaciones han informado de la presencia de marcadores típicos para células T (CD3, CD4, CD8), que pueden representar la heterogeneidad de linfocitos innatos tipo 1 (Roan et al., 2016).

2.3.2. Células linfoides innatas de tipo 2

Este grupo de linfocitos innatos está formado por un solo tipo celular, las ILC2, que se caracterizan por la producción de citoquinas de tipo 2, como la IL-5 y la IL-13. Sin embargo, se ha comprobado que las ILC2 humanas también pueden producir otro tipo de interleucinas en respuesta a IL-25, IL-33 o IL-18. Por ejemplo, la producción de IL-9 por parte de las ILC2 provoca, entre otros fenómenos, la proliferación de linfocitos T y el cambio de isotipo a IgE en linfocitos B, lo que está estrechamente relacionado con las reacciones de hipersensibilidad de tipo I (alérgica), como se ha explicado anteriormente. Este tipo celular se encuentra principalmente en los nódulos linfáticos mesentéricos, bazo, hígado intestino, vías aéreas y placas de Peyer. También han sido encontrados en sangre periférica. Presentan receptores de quimiocinas y marcadores característicos en su membrana, como el CRTH2 (Simoni et al., 2017).

2.3.3. Células linfoides innatas de tipo 3

Este grupo se encuentra dividido en dos subtipos celulares:

Linfocitos innatos tipo 3 (ILC3). Se trata de un subtipo poblacional que expresan el receptor Nkp46 activador de células NK (NCR) pero que no presenta actividad citotóxica como las células NK. Produce IL-22 pero no expresa IFN γ ni TNF. Se encuentran mayormente en la mucosa del tracto intestinal, mediando en el balance entre la microbiota simbiótica y el sistema inmunitario intestinal.

Células inductoras del tejido linfoide (LTi). Este subtipo participa durante la embriogénesis en el desarrollo de los nódulos linfáticos y las placas de Peyer, además de ser reguladoras de la arquitectura del tejido linfático después del nacimiento.

2.4. Relación madre-hijo en el desarrollo del sistema inmunitario fetal y neonatal

Actualmente, los estudios de nutrición materno-fetal plantean la posible relación entre la microbiota materna, regulada por la dieta, y sus implicaciones en la maduración del sistema inmunitario fetal y del neonato. De esta forma, persiguen establecer una relación entre los hábitos alimenticios de la madre durante el embarazo y la predisposición que el niño pueda tener a desarrollar algún tipo de alergia o trastorno inmunitario, a través de la instrucción del sistema inmunitario dirigida por la microbiota en el intestino materno.

Numerosos ejemplos corroboran que el sistema inmunitario del feto se encuentra afectado por la nutrición materna, tanto de forma directa como indirecta. De un modo directo, la limitación en la ingesta de macronutrientes y micronutrientes está ligada a una disminución del desarrollo leucocitario del feto. El paso de inmunoglobulinas a través de la placenta también se encuentra afectado debido a la inmunosupresión materna consecuencia de la mala alimentación, resultado del déficit de vitamina A o retinol. Debido a que este compuesto resulta esencial para la diferenciación del linaje de células B, su ausencia origina falta de anticuerpos que protegen al feto en fases tempranas de su desarrollo frente a patógenos (Chen et al., 2009). A su vez, el ácido retinoico participa en el desarrollo de las células LTi, implicadas en el desarrollo de los órganos linfoides secundarios, por lo que el tamaño y desarrollo de estos órganos también podría verse mermado (Van de Pavert et al., 2014).

La malnutrición no solo tiene consecuencias en el feto, sino que la madre se encuentra más expuesta a la infección por microorganismos patógenos oportunistas, que pueden activar la vía de estrés hipotálamo-glándula pituitaria-eje adrenal, y que tiene como resultado la producción de glucocorticoides, que provocan inmunosupresión materna (Macpherson et al., 2017).

Durante un embarazo normal, el feto se encuentra protegido de los glucocorticoides maternos gracias a la presencia de una enzima placentaria, la 11β -dehidroxilasa, que transforma estos glucocorticoides en metabolitos inactivos. Durante un embarazo en el que la madre está malnutrida, los niveles de 11β -dehidroxilasa se reducen en la placenta y, por tanto, los glucocorticoides maternos inactivarán la vía de síntesis fetal de glucocorticoides. Como consecuencia, el niño muestra niveles reducidos de proliferación linfocitaria y también de actividad NK. Asimismo, el recién nacido muestra niveles más elevados de respuestas al estrés que podrían mantener durante toda su vida (Palmer, 2011). Sin embargo, se ha comprobado que el suministro de lipopolisacárido para mimetizar una infección bacteriana u oligodesoxinucleótidos para mimetizar una infección viral tiene efectos mayores sobre la inmunidad del recién nacido que el aporte de glucocorticoides materno (Kearney et al., 2015).

Curiosamente, el desarrollo del sistema inmunitario del niño durante las fases finales del embarazo parece estar modelado por los microorganismos maternos de una forma más que directa. Se ha demostrado que, durante las fases finales del embarazo y poco después del nacimiento, la microbiota materna sufre un aumento en número, lo que produce como consecuencia el paso de un pequeño número de microorganismos a la circulación sistémica materna y, por ello, llegan a la placenta y a la leche materna. Hay evidencias de que estos microorganismos tienen su papel en la colonización temprana del niño, y probablemente esté relacionado con el desarrollo inmunitario fetal (Aagaard et al., 2014).

Después del parto comienza la exposición del recién nacido a una infinidad de posibles alérgenos que condicionan la futura respuesta a los mismos. Por ello, la sensibilización a alérgenos ocurre mayormente durante la infancia. En el neonato se ha observado una tendencia a la polarización hacia la respuesta inmunitaria de tipo 2 que, en un principio, se pensaba que era una tendencia remanente de la polarización necesaria para que se produjera la tolerancia fetal y el correcto funcionamiento de la placenta. Sin embargo, se ha visto en ratones que esta polarización está relacionada con procesos organogénéticos en pulmones: se observa un aumento en la producción de IL-33 relacionado con la primera inspiración y se mantiene durante el desarrollo de los alveolos, que en humanos puede durar hasta los tres primeros años de vida (Saluzzo et al., 2017). Durante las dos primeras semanas de desarrollo, la microbiota aérea aumenta de forma que los representantes de los phyla Gammaproteobacteria y Firmicutes, inicialmente predominantes, son desbancados por el phyla Bacteroidetes. Este cambio en la microbiota se asocia con la aparición de las células Treg en los epitelios bronquiales, por lo que este cambio en la microbiota es necesario para que se pongan en contacto con el mayor número de antígenos posible antes de que se cierre la ventana de maduración de los linfocitos Th2 en la infancia y se genere tolerancia (Gollwitzer et al., 2014).

Además, la maduración del sistema inmune del recién nacido depende en gran medida del periodo de lactancia que sirve como vía de transmisión de anticuerpos y microorganismos maternos, aparte de los nutrientes. No obstante, el sistema inmunitario del recién nacido se encuentra condicionado por los contactos que se han producido con la microbiota materna y los anticuerpos que se transfieren de la madre al hijo a través de la placenta durante el periodo de gestación (Macpherson et al., 2017). De esta forma, la nutrición de la madre y sus hábitos, que influyen en la composición de la microbiota, también podrían influir indirectamente sobre la maduración del sistema inmune del hijo, lo que a su vez podría estar relacionado con el desarrollo de enfermedades durante la edad adulta, como ya hemos comentado.

3. Justificación del trabajo

Tal como se explicó anteriormente, a las células linfoides innatas se les está atribuyendo un papel inmunomodulador importante en el desarrollo de las respuestas inmunitarias, tanto frente a microorganismos (NK, ILC1 e ILC3) como frente a alérgenos (ILC2). El desarrollo de estas células por tanto también se verá influido por factores maternos y/o por la colonización microbiana temprana del niño durante el desarrollo inmunitario fetal; sin embargo, este aspecto no se ha estudiado todavía. Basado en la hipótesis anterior, el presente trabajo se centra en el estudio de las distintas poblaciones linfocitarias innatas y de células NK de muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos de la Región de Murcia.

La caracterización de las poblaciones de linfocitos innatos y células NK en el momento del nacimiento, el establecimiento de los diferentes perfiles poblacionales en una muestra representativa de individuos, su correlación con los hábitos nutricionales maternos durante el embarazo y el perfil microbiológico del par madre/hijo podrán determinar si existe relación entre ellos y con posibles fenómenos alérgicos durante la etapa infantil, para así ayudar a mejorar la salud materno-infantil. Este estudio se enmarca dentro del Proyecto NELA (*Nutrition in Early Life and Asthma*) sobre la salud respiratoria e inmunitaria de los niños de la Región. El proyecto NELA es un estudio de investigación epidemiológica financiado por el Instituto Carlos III de Madrid y coordinado por el Grupo de Investigación de Enfermedades Respiratorias Infantiles del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB).

4. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo ha sido la caracterización de poblaciones linfocitarias innatas de muestras de sangre venosa de cordón umbilical de los recién nacidos sanos dentro de la cohorte NELA. Para ello, se analizaron muestras de sangre de cordón umbilical de 57 sujetos escogidos aleatoriamente y se analizó, mediante citometría de flujo:

- a) Porcentaje y valores absolutos de células NK de acuerdo con la expresión de los marcadores CD3, CD16 y CD56, obteniendo además la proporción de células NK activadas determinada por la expresión del marcador CD45RO.
- b) Porcentaje y valores absolutos de células linfoides innatas de acuerdo con la expresión de marcadores establecidos por Trabanelli et al. (2018) y Mjösberg & Spits (2016) (tabla 1).

5. Materiales y métodos

5.1. Obtención de sangre venosa de cordón umbilical

Un total de 57 muestras de sangre venosa fueron extraídas por matronas especializadas del Hospital General Universitario Virgen de la Arrixaca (HUVA) en el momento inmediatamente posterior al parto. Las muestras de sangre fueron depositadas en un tubo con EDTA, enviadas al Laboratorio de Urgencias del HUVA para la realización de pruebas hematométricas y almacenadas a temperatura ambiente hasta el tratamiento para determinar las poblaciones linfocitarias por citometría. Se analizaron dentro de las primeras 36 horas desde la extracción. Todas las muestras fueron extraídas bajo consentimiento informado de los padres de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité ético del HUVA.

5.2. Determinación de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo

La citometría de flujo nos permite estudiar poblaciones celulares según sus marcadores de membrana gracias al uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos que reconocen estas moléculas específicas de membrana. Este procedimiento se llevó a cabo en tres pasos esenciales: marcaje de linfocitos, adquisición de datos por el citómetro de flujo y análisis de los datos obtenidos.

5.2.1. Marcaje de linfocitos.

Para el marcaje de los linfocitos innatos se utilizaron los marcadores fenotípicos de cada una de las poblaciones que se encuentran en la bibliografía más reciente disponible (Mjösberg & Spits, 2016; Trabanelli et al., 2017).

En la tabla 2 se muestra el esquema empleado para el marcaje de cada una de las muestras, donde se especifica cada uno de los anticuerpos empleados que reconocen las moléculas específicas de la superficie de los linfocitos y el fluorocromo con el que van conjugados. De cada una de las muestras de sangre se tomaron alícuotas de 50 μ L para cada uno de los marcajes en los que se estudia el tipo celular concreto de NKs o ILCs. Dicho marcaje se especifica en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Anticuerpos empleados para el marcaje de moléculas de superficie de los linfocitos y cantidades empleadas.

Especificidad	Casa comercial	Clon	Fluorocromo	Volumen de anticuerpo añadido (μL)
CD16	BioLegend®	3G8	PE	0,5
CD4	BioLegend®	PE/Cy7	PE/Cy7	1,5
CD8	BioLegend®	SKI	PerCP/Cy5.5	1,5
CD45RO	eBioscience®	UCHL1	APC	2,5
CD56	BioLegend®	HCD56	FITC	2,5
CD161	BioLegend®	HP-3G10	APC	2,5
CD3	BioLegend®	SK7	APC/Cy7	1,5
NKp46	BioLegend®	9E2	PE/Cy7	2,5
CRTH2	BioLegend®	BM16	PerCP/Cy5.5	2,5
ST2	MBL®	2A5	PE	4

Tabla 3. Marcaje empleado para cada uno de los tipos celulares analizados.

Marcaje	FITC	PE	PerCP-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
NKs	CD56	CD16	CD8	CD4	CD45R0	CD3
ILCs	CD56	ST2	CRTH2	NKp46	CD161	CD3

Tras añadir los anticuerpos marcados, las muestras se agitaron e incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para permitir la unión antígeno-anticuerpo. A continuación, tras someter las muestras a agitación en el vórtex, se le añadió el preparado para hemólisis comercial de Becton, Dickinson and Company® (1,7 mL) para lisar los hematíes y fijar los leucocitos. Después, se incubó en oscuridad durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1400 rpm con el objetivo de separar los glóbulos blancos de los restos celulares resultado de la hemólisis que quedaron en suspensión. Se decantó y se añadió solución PBS (1,7 mL) para lavar los restos celulares y de anticuerpos que podrían quedar en suspensión. Tras su centrifugación y decantación, se le añadió 250 μ L de PBS y la muestra ya quedó preparada para la adquisición de datos en el citómetro de flujo.

5.2.2. Adquisición de datos por citometría de flujo.

Las muestras marcadas fueron adquiridas en el citómetro BD FACSCanto® de seis fluorescencias del Servicio de Apoyo a la Investigación (edificio LAIB, El Palmar, Murcia) y los datos recogidos en el software asociado, BD FACSDiva®. Se adquirió un mínimo de 75000 células linfocitarias por marcaje. Para el análisis de las células adquiridas en el citómetro se empleó el software gratuito de análisis Flowing Software® versión 2.5.1 disponible en <http://flowingsoftware.btk.fi/download.php>.

5.2.3. Análisis de células NK

El grupo de células NK se define clásicamente por la expresión de los marcadores CD16 y CD56, además de la ausencia de expresión de CD3. Las células NK pueden variar en la expresión de su marcador CD56, dividiéndose en CD56^{bright} (brillantes, más fluorescentes) o CD56^{dim} (débil, menos fluorescentes). La división de *bright* y *dim* se mantiene para el marcador CD16, llegando incluso a estar ausente en una pequeña proporción de casos. Estas combinaciones generan cinco tipos de poblaciones de NK distintas en sangre periférica de adulto normal: CD56^{bright} CD16⁻; CD56^{bright} CD16^{dim}; CD56^{dim} CD16⁻; CD56^{dim} CD16^{bright} y CD56⁻ CD16^{bright} (Poli et al. 2009).

En nuestro análisis de datos se empleó como marcador positivo principal para NKs el CD16, por lo que el análisis de las poblaciones se redujo a aquellas con fenotipo CD16⁺, a partir del cual se seleccionaron las poblaciones de células NK CD56^{bright} y CD56^{dim} de forma diferenciada. La población de CD56⁻, al ser teóricamente muy reducida, no se consideró para el estudio. A su vez, se caracterizó el porcentaje de NKs CD16⁺ CD56⁺ que se encontraban activadas, a través del marcador de activación linfocitaria CD45RO.

En primer lugar, los eventos celulares fueron representados en una gráfica de densidad de puntos en función de su tamaño (FSC) y su granularidad (SSC), donde se reconocen tres poblaciones principales de leucocitos sanguíneos: granulocitos, monocitos y linfocitos, estos últimos seleccionados en la región R-1 (figura 2A).

Con el objetivo de excluir a los linfocitos T y a los linfocitos B de nuestro análisis, enfrentamos el marcador para CD16 (característico de células NK) contra CD3 (marcador de linaje de linfocitos T). De esta forma, los linfocitos B quedaron en el cuadrante doble negativo y los linfocitos T quedaron en el cuadrante positivo para CD3 (figura 2C).

Debido a la cercanía de las regiones de linfocitos y monocitos, es conveniente realizar la comprobación de que el número de monocitos seleccionados accidentalmente en la región R-1 es mínimo. Para ello, se creó un gráfico de puntos con los marcadores CD4 y CD3. Sabiendo que los monocitos expresan en su membrana el marcador CD4, pero no el CD3, se comprobó que la región quedó libre de estas células al observar pocos eventos celulares positivos exclusivamente para CD4 (figura 2B).

Por otro lado, las células NK CD16⁺ fueron analizadas en relación con la expresión de su marcador de superficie CD56, obteniendo dos subpoblaciones con características distintas: CD56^{bright} y CD56^{dim}. Para diferenciarlas, seleccionamos dentro de la región CD56⁺ CD3⁻ (R-6) la población de

células más brillante, que serían las $CD56^{bright}$. Por lo tanto, el resto de $CD56^{+}$ se clasificaría dentro de las $CD56^{dim}$ (figura 2D).

Con el objetivo de cuantificar las células NK que se encontraban activadas se tomaron las células $CD16^{+} CD56^{+}$ y se enfrentaron con el anticuerpo anti- $CD45RO$ (figura 2F).

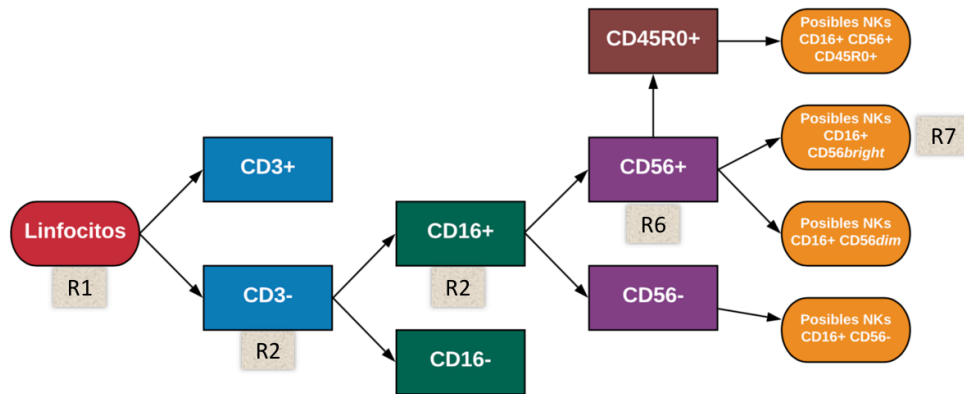


Figura 1. Esquema empleado para el análisis de las diferentes subpoblaciones de células NK. Los cuadros blancos con la denominación “R+número” representan la región seleccionada en el análisis (figura 2).

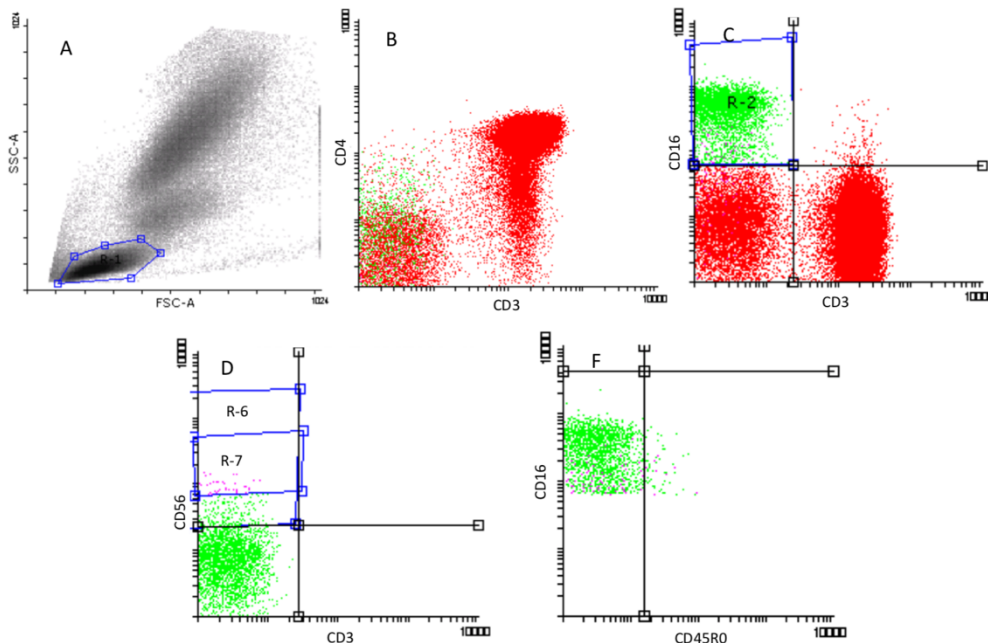


Figura 2. Análisis de células NK. La **figura A** representa una gráfica de densidad de datos que expone la distribución celular de la muestra en función de su tamaño (FSC) y su granularidad (SSC). La región seleccionada R-1 se corresponde con el área ocupada por los linfocitos. La **figura B** representa los eventos incluidos en la región R-1 y se enfrentan al marcador CD4, característico de monocitos, y al marcador para CD3, exclusivo de linfocitos T, para asegurar la correcta selección de linfocitos en la región R-1 inicial, excluyendo a los monocitos ($CD3^{-} CD4^{+}$). La **figura C** muestra la selección de las células NK representando los eventos celulares de R-1 frente a CD16 y CD3, que se corresponden con la región R-2. La **figura D** muestra el enfrentamiento de los eventos recogidos en la región R-2 con el marcador CD56 de células NK. Los eventos positivos quedaron recogidos en la región R-6, dentro del cual se estableció otra región (R-7) para la selección de las células $CD56^{bright}$. La **figura E** representa el enfrentamiento de las células dentro de la región R-6 con el marcador $CD45RO$ de activación linfocitaria.

5.2.4. Análisis de células linfoides innatas

Las tres poblaciones linfocitarias fueron analizadas según los marcadores fenotípicos descritos en la bibliografía disponible (Trabanelli et al., 2017). Inicialmente, responden al siguiente esquema fenotípico:

ILC1: CD3⁻, CD56⁻, CD161⁺, NKp46⁻, CRTH2⁻, ST2⁻.

ILC2: CD3⁻, CD56⁻, CD161⁺, NKp46⁻, CRTH2⁺, ST2⁺.

ILC3: CD3⁻, CD56⁻, CD161⁺, NKp46⁺, CRTH2⁻, ST2⁻.

5.2.4.1. Análisis de ILC2

Para el análisis de células ILC2 se emplearon los marcadores CRTH2 y ST2, que son marcadores diferenciadores de esta población de ILC (Trabanelli et al., 2017). Junto con el resto de las poblaciones de ILC, las ILC2 también presentan CD161 en su superficie.

El análisis comenzó con la selección de la región de linfocitos en R-1 según su tamaño y su granularidad (figura 4A). Para excluir del análisis a los linfocitos T y las células NK, se excluyeron los eventos CD56⁺ y CD3⁺ del análisis a través de la selección doble negativa para esos marcadores de su correspondiente nube de puntos (R-2, figura 4B).

Para obtener las células CRTH2⁺, se seleccionaron los eventos positivos para este marcador en una nube de puntos, que se enfrentó con el marcador para NKp46 (figura 4C). Tomando como punto de partida la región con células CRTH2⁺ (R-4), se determinaron las subpoblaciones CD161⁺ (figura 4D), ST2⁺ (figura 4E) y NKp46⁺ (figura 4F).

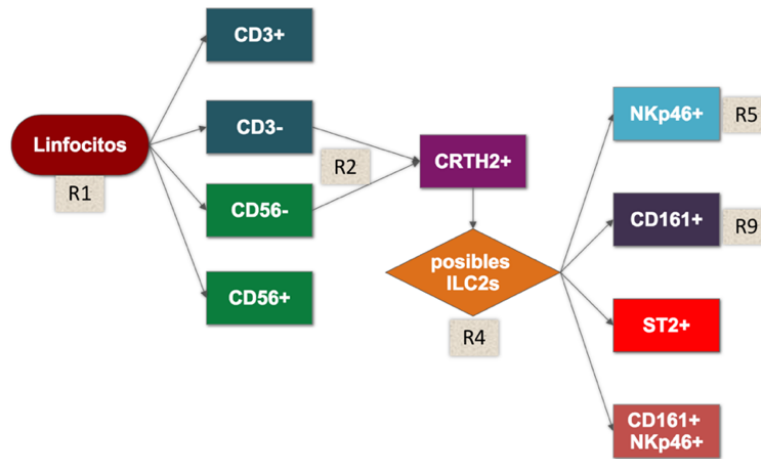


Figura 3. Esquema empleado para el reconocimiento y cuantificación de las células linfoides innatas de tipo 2. Los cuadros blancos con la denominación “R+número” representan la región seleccionada en el análisis (figura 4).

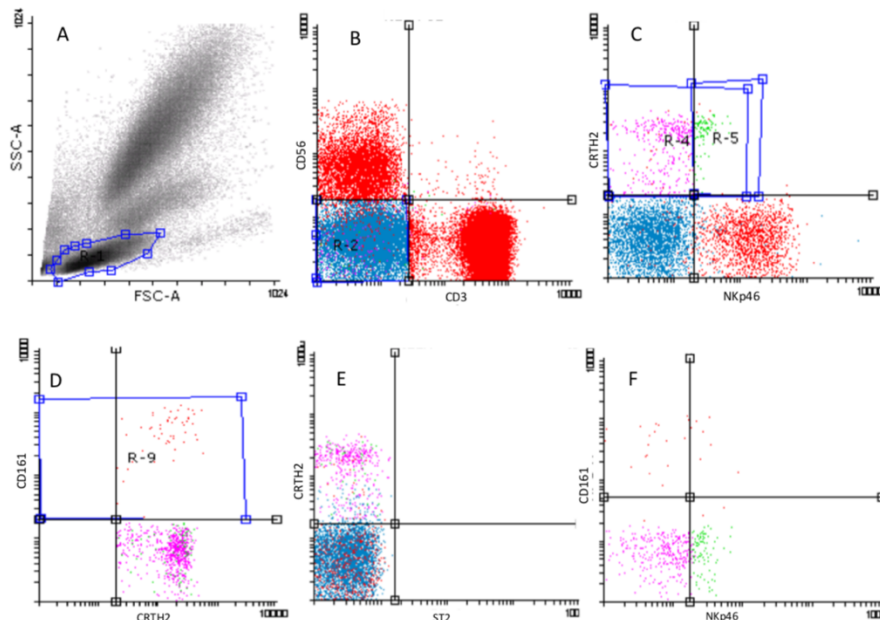


Figura 4. Análisis de linfocitos innatos de tipo 2. La **figura A** representa una gráfica de densidad de datos que expone la distribución celular de la muestra en función de su tamaño (FSC) y su granularidad (SSC). La región seleccionada (R-1) se corresponde con el área ocupada por los linfocitos. La **figura B** refleja los eventos incluidos en la región R-1 y se enfrentan al marcador CD56, característico de células NK, y al marcador CD3, exclusivo de linfocitos T. La selección doble negativa para estos marcadores queda reflejada en la región R-2. La **figura C** muestra los eventos recogidos en la región R-2, que se enfrentaron al marcador para ILC2s, CRTH2, y a NKp46. Las células positivas para CRTH2 quedaron dentro de la región R-4 y las positivas para CRTH2 y NKp46, en la región R-5. La **figura D** muestra el enfrentamiento de las células dentro de la región R-4 con los marcadores CD161 y CRTH2. Los positivos para CD161 quedaron recogidos en la región R-9. La **figura E** muestra otro marcador específico para ILC2s, ST2, frente a CRTH2. La **figura F** muestra los eventos celulares positivos para CRTH2 frente a los marcadores CD161 y NKp46.

5.2.4.2. Análisis de ILC1 e ILC3

Tras la selección de la región de linfocitos según su tamaño y granularidad (R-1, figura 6A), se excluyó a las células T de nuestro análisis enfrentando el marcador para CD56 (negativo para células T) frente al marcador de linaje de células T (CD3). Así, se seleccionaron los dos cuadrantes izquierdos, donde tendremos una combinación de células NK, células B e ILCs (R-2, figura 6B).

Las células B serán excluidas del análisis debido a que no expresan el marcador CD161 ni el CD56 en su membrana, de manera que, enfrentando estos dos marcadores, las células B quedarían en el cuadrante doble negativo (figura 6C). De la misma forma excluimos las células NK gracias a su marcador de membrana, el CD56, ausente en células linfoides innatas (R-7, figura 6C). Los eventos positivos para CD161 y negativos para CD56 englobarán a las ILC1 e ILC3 (R-4, figura 6C).

Para discernir entre ILC1 e ILC3, el marcador NKp46 se enfrentó al CD161 y se seleccionaron las nubes positivas para NKp46, considerándolas ILC3; y las negativas para NKp46, considerándolas ILC1 (figura 6D).

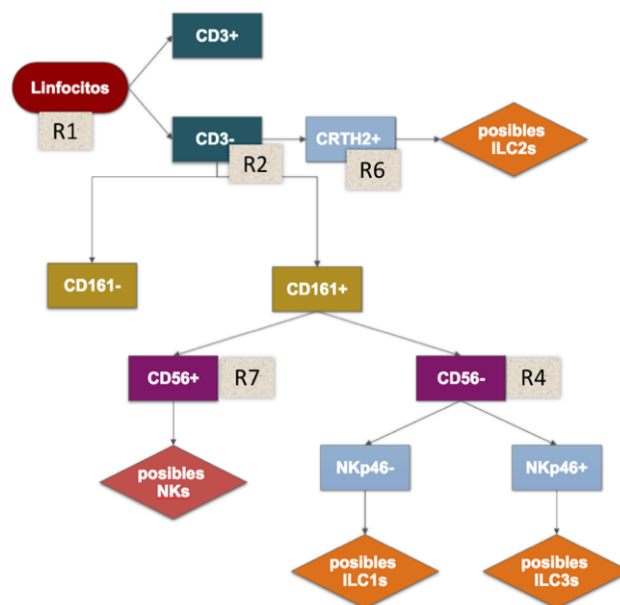


Figura 5. Esquema empleado para el análisis de las células linfoides innatas de tipo 1 y 3. Los cuadros blancos con la denominación “R+número” representan la región seleccionada en el análisis (figura 6).

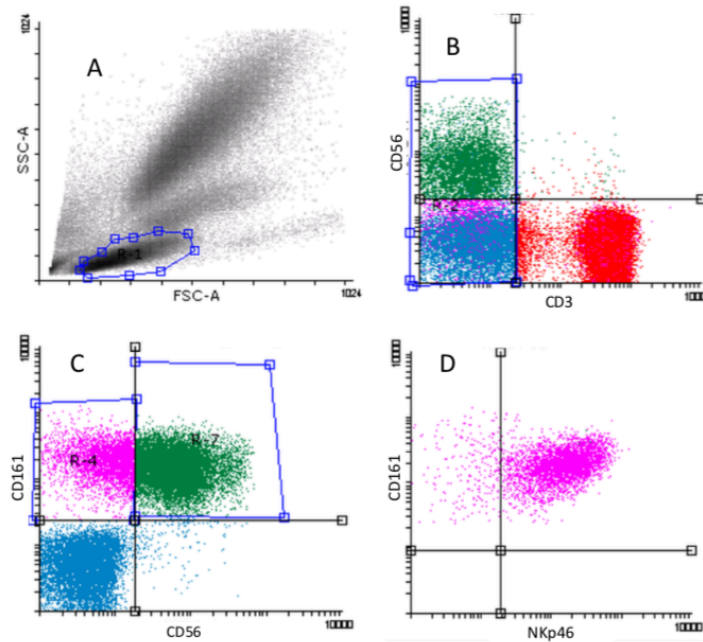


Figura 6. Análisis de linfocitos innatos de tipo 1 y 3. La **figura A** representa una gráfica de densidad de datos que expone la distribución celular de la muestra en función de su tamaño (FSC) y su granularidad (SSC). La **figura B** muestra la expresión de los marcadores CD56 y CD3 en los linfocitos de la muestra, seleccionados en R-1. La selección negativa para CD3 y positiva para CD56 quedó reflejada en la región R-2. La **figura C** muestra los eventos incluidos en la región R-2 que se enfrentaron a los marcadores CD161 y CD56. Para la detección de ILC1 e ILC3 se seleccionó positivamente el cuadrante positivo para CD161, pero negativo para CD56. La **figura D** representa la población positiva para CD161 de la figura C que se enfrentó al marcador Nkp46. Los positivos para este marcador fueron considerados ILC3, mientras que los negativos fueron considerados ILC1.

5.3. Determinación de linfocitos totales en sangre

La determinación del valor absoluto de linfocitos en sangre se llevó a cabo tomando los datos del recuento total de leucocitos de cordón umbilical a partir del análisis hematométrico realizado en el Laboratorio de Análisis Clínicos del HUVA.

5.4. Análisis estadístico de los datos

Todos los datos fueron recogidos en tablas y procesados a través del software Microsoft Excel® 2016. Para el análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se empleó el software de procesamiento de datos GraphPad Prism 7®.

6. Resultados y discusión

6.1. Subpoblaciones de células NK y expresión de CD56

Los marcadores CD16 y CD56 fueron empleados para la determinación de las subpoblaciones CD16⁺ CD56⁻ y CD16⁺ CD56⁺ de células NK. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4 donde se observa que, contrario a lo esperado, el porcentaje y el recuento absoluto de células NK CD3⁻ CD16⁺ era bastante alto (13,04 ± 6,44 % y 2,22 ± 1,46 células/μL) con respecto al porcentaje y recuento de células CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ (1,40 ± 2,16 % y 1,01 ± 0,53 células/μL, respectivamente). Típicamente, el valor de células CD3⁻ CD16⁺ y CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ es similar, ya que se conoce que el 90% de células NK en sangre periférica de adulto se describen como CD3⁻ CD16^{bright} CD56^{dim} (Poli et al., 2009). Nuestros valores, comparados con los obtenidos en la bibliografía para las mismas poblaciones (Yabuhara et al., 1990; Beck & Lam-Po-Tang, 1994), parecen indicar que la expresión de CD56 está bastante reducida en nuestras muestras o bien que no se pudo detectar debido al anticuerpo utilizado para su detección. Para comprobar esta última opción se realizó un marcaje de dos muestras con un nuevo anticuerpo anti-CD56 conjugado con PE y se comparó con el marcaje de anti-CD56-FITC que era bajo en ambos casos. Los resultados de ambos marcajes fueron similares (datos no mostrados), indicando que la expresión de CD56 en estas muestras de cordón umbilical es bastante débil.

Tabla 4. Distribución y cuantificación de células NK a partir de los marcadores CD3, CD16 y CD56. Los valores normales de cordón para los linfocitos CD3⁻ CD16⁺ fueron extraídos de Yabuhara et al., 1990. Los valores normales de cordón para los linfocitos CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ fueron extraídos de Beck & Lam-Po-Tang, 1994.

Fenotipo	Valores obtenidos (%)*	Valores normales (%)*	Valores absolutos obtenidos (x10 ³ células / μL)*	Valores absolutos normales (x10 ³ células / μL)*
CD3 ⁻ CD16 ⁺	13,04±6,47	13,8±4,3	2,22±1,46	0,71±0,32
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	1,40±2,16	9,1±4,3	0,23±0,36	0,48±0,2

*Se representa la media de los valores ± la desviación típica.

Para estudiar con más detalle estas subpoblaciones se analizó la distribución de los valores obtenidos para la población CD3⁻ CD16⁺, observándose los valores medianos de 12,43% del total de linfocitos y 631 células/μL; y un rango intercuartílico (25 – 75% de la distribución) de 8,35 – 17,16% y 399 – 1086 células/μL, respectivamente. Para la población CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ se obtuvieron los valores medianos 0,64% del total de linfocitos y 31 células/μL. El rango intercuartílico obtenido fue de 0,27 – 1,50% para las cantidades relativas y 13 – 78 células/μL (figura 7A y 7B). Dentro de la población CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ se observaron dos grupos de muestras (figura 7C): una con alta expresión de CD56 (aproximadamente el 25% de las muestras, figuras 7C y 7E); y el segundo, con baja expresión de CD56 (el 75% de las muestras, figuras 7C y 7D).

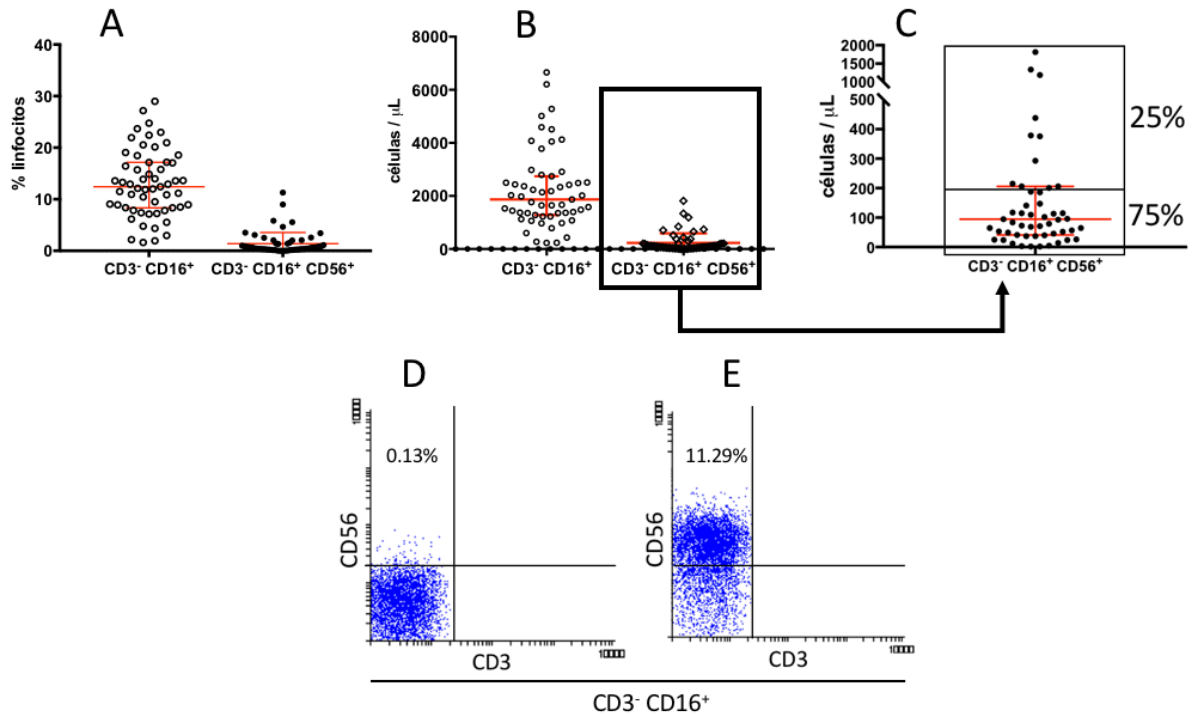


Figura 7. Diferencias en el marcaje de linfocitos $CD3^- CD16^+$. En la **figura A** se observan las diferencias en el porcentaje de células NK según cada subpoblación. La línea transversal central de cada nube de puntos representa el valor de la mediana y las líneas adyacentes el rango intercuartílico entre el primer cuartil (25%) y el último cuartil (75%). En la **figura B** se muestra el número de células absolutas obtenido según cada subpoblación. En la **figura C** se puede observar de forma ampliada la distribución de células absolutas en cuartiles de la subpoblación $CD3^- CD16^+ CD56^+$. En las **figuras D y E** se muestra la diferencia en la expresión de CD56 en gráficas de nube de puntos indicando los porcentajes de células positivas obtenidas en cada caso respecto del total de linfocitos. La figura D representa el marcaje de una muestra representativa con un valor muy bajo de CD56. La figura E representa el marcaje de una muestra representativa con un valor alto de CD56.

Todos estos resultados nos indican que, aproximadamente, el 75% de los recién nacidos de la cohorte NELA presentan una expresión bastante débil o incluso nula de CD56 en sus células NK. En la revisión de Cichocki et al. (2014) se pone de manifiesto el orden secuencial de maduración de las células NK, provenientes del progenitor linfoide común, que expresan primeramente CD56 de forma brillante ($CD56^{bright}$) y tras su estimulación, disminuyen su expresión a $CD56^{dim}$ para, a continuación, expresar el marcador CD16 en su membrana. De acuerdo con estos datos es posible especular que un 25% de los recién nacidos dentro de NELA poseen células NK que se encuentran en un estado de maduración menos avanzado, es decir, células NK $CD16^+$ con expresión de CD56 alta.

Además de estos marcadores, se empleó el anticuerpo anti-CD45RO para detectar las posibles células NK que se pudieran encontrar activadas y se estudió en células $CD3^- CD16^+ CD56^+$. El 33% de las muestras analizadas presentaban células NK activadas ($CD3^- CD16^+ CD56^+ CD45RO^+$), con unos valores medianos de 2,86% del total de células $CD3^- CD16^+ CD56^+$ y 2 células/ μL , en un rango intercuartílico de 0,81 – 10,04% y 1 – 6 células/ μL , respectivamente (datos no mostrados). La expresión

de CD45RO en células NK podría ser explicada por la predetección de citoquinas o por la detección de antígenos por parte de estas células antes del nacimiento (Freeman et al., 2015).

6.2. Recuento de ILC1 e ILC3

Los marcadores CD56, CD161 y NKp46 fueron empleados para la determinación de poblaciones de linfocitos innatos de tipo 1 ($CD161^+ CD56^- NKp46^-$) y de tipo 3 ($CD161^+ CD56^- NKp46^+$). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 donde se observa para ILC1 unos valores medianos de 7,10% del total de linfocitos y 293 células/ μ L, con un rango intercuartílico de 1,56 – 11,64 % y 43 – 544 células/ μ L, respectivamente. De igual forma, para células linfoides innatas de tipo 3 (tabla 5) se obtuvieron unos valores medianos de 3,77% del total de linfocitos y 208 células/ μ L y un rango intercuartílico de 2,18 – 5,82 % y 102 – 579 células/ μ L respectivamente. No se encontraron los valores normales de ILC1 e ILC3 en sangre periférica de cordón ni de adulto en la bibliografía, por lo que no los pudimos comparar nuestros datos con datos de referencia.

Como hemos comprobado anteriormente, la determinación del total de las células NK viene determinada por la expresión del marcador CD56 que resultó ser muy baja o nula en nuestra muestra. Esto implica que los valores de ILC1 e ILC3, definidos por ser $CD56^-$, estarán influidos por la presencia de células NK que no expresen el marcador CD56.

6.3. Recuento de ILC2

Los marcadores CD56, CRTH2 y ST2 fueron empleados para la determinación de poblaciones de linfocitos innatos de tipo 2 ($CD56^- CRTH2^+ ST2^+$). De esta forma pudimos obtener el recuento de células absolutas y porcentaje de fenotipo $CD3^- CD56^- CRTH2^+$ que se corresponde con las células linfoides innatas de tipo 2. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 donde se observan los resultados del marcaje de células innatas de tipo 2 con unos valores medianos de 0,44% del total de linfocitos y 26 células/ μ L, con un rango intercuartílico de 0,22 – 0,86 % y 10 – 44 células/ μ L respectivamente. Por otro lado, solamente el 54,39% de las muestras co-expresaron los marcadores CRTH2 y ST2 en una proporción muy baja respecto al total de células $CD3^- CD56^- CRTH2^+$ ($7,45 \pm 19,86$ % del total de células $CD3^- CD56^- CRTH2^+$). En este caso tampoco se pudo comparar los datos obtenidos con otros valores de referencia, ya que no han sido publicados por otros investigadores.

Tabla 5. Distribución y cuantificación de células linfocitarias ILC en sangre de cordón umbilical.

Fenotipo	Frecuencia (%)		Valores absolutos (células/ μ L)	
	Mediana	Rango (25% – 75% de la distribución)	Mediana	Rango (25% – 75% de la distribución)
ILC1 (CD3 ⁻ CD161 ⁺ CD56 ⁻ NKp46 ⁻)	7,10	1,56 – 11,64	293	43 – 544
ILC2 (CD3 ⁻ CD56 ⁻ CRTH2 ⁺)	0,44	0,22 – 0,82	26	10 – 44
ILC3 (CD3 ⁻ CD161 ⁺ CD56 ⁻ NKp46 ⁺)	3,77	2,18 – 5,82	208	102 – 579

Para una mejor caracterización de las células CD3⁻ CRTH2⁺, se analizaron las poblaciones para el resto de los marcadores empleados que, de acuerdo con la bibliografía, no se expresan sobre la superficie de estos linfocitos (Mjösberg & Spits, 2016), tal como se expone en la tabla 6. Del total de células CD3⁻ CRTH2⁺, obtuvimos los siguientes valores (media \pm s.d., n=57): el 12,55 \pm 15,59 % se definió como CD161⁻ NKp46⁺, el 6,24 \pm 7,94 % como CD161⁺ NKp46⁻, y el 8,38 \pm 13,98 % como CD161⁺ NKp46⁺.

Tabla 6. Frecuencia de subpoblaciones celulares dentro del fenotipo ILC2 CD3⁻ CRTH2⁺.

Fenotipo	Frecuencia (%) (media \pm s.d.)
CD3⁻ CRTH2⁺	Total (100)
CD3 ⁻ CRTH2 ⁺ CD161 ⁻ NKp46 ⁺	12,55 \pm 15,59
CD3 ⁻ CRTH2 ⁺ CD161 ⁺ NKp46 ⁻	6,24 \pm 7,94
CD3 ⁻ CRTH2 ⁺ CD161 ⁺ NKp46 ⁺	8,38 \pm 13,98

De estos resultados también extraemos que la expresión del marcador ST2 en células CRTH2 fue muy baja. Si bien se ha considerado la expresión de este marcador específico de ILC2, en Mjösberg & Spits (2016) se pone de manifiesto que dicha expresión a nivel de membrana es muy baja, pero a nivel citoplasmático se encuentran elevadas cantidades de ARN mensajero codificante de dicha proteína. Por lo tanto, especulamos que este pudo ser el motivo por el que no detectáramos señal positiva intensa para este marcador. Las poblaciones obtenidas a partir de los marcadores CRTH2, CD161 y NKp46 tuvieron una representación muy baja y no se encontraron publicaciones relacionadas con ellas.

Debido al bajo número de células $CD3^+ CRTH2^+$ analizadas por cordón, habría que analizar un mayor número de células y marcadores para confirmar la presencia de estas poblaciones y ayudar a caracterizarlas.

6.4. Composición global de ILCs en las muestras

A pesar de que la mayoría de las muestras presentaban una expresión muy baja de CD56, había un pequeño porcentaje de ellas (n=11) que expresaban una cantidad elevada de este marcador en sus células NK y, por tanto, fue posible determinar el número de células ILC con la seguridad de una menor interferencia de las células NK. El 63,64% de estos cordones mostró una mayor proporción de células ILC1; el 9,09% mostró una mayor proporción de células ILC2; y el 27,27% mostró una mayor proporción de células ILC3 (figura 8). Estos resultados sugieren una tendencia hacia las respuestas de tipo 1 en muestras de cordón umbilical.

Estos resultados concuerdan con el estudio de citoquinas en neonatos de Halonen et al. (2009), donde se detecta vía inmunoensayo una mayor producción de citoquinas tipo Th1 en las muestras de sangre de cordón umbilical. Sin embargo, las posibles implicaciones de una mayor proporción de células ILC2 o ILC3 en la muestra de sangre de cordón todavía son desconocidas. Se trata de un tema controvertido, pues un estudio sobre cantidad de linfocitos ILC2 en adultos (Bartemes et al., 2014) estableció una correlación entre una elevación en número de linfocitos ILC2 en sangre periférica de adultos y la sintomatología asmática de los pacientes. No obstante, otro estudio de carácter longitudinal en sangre de cordón umbilical no encontró correlación alguna entre la elevación en ILC2 y el desarrollo de asma durante la infancia (Borte et al. 2014).

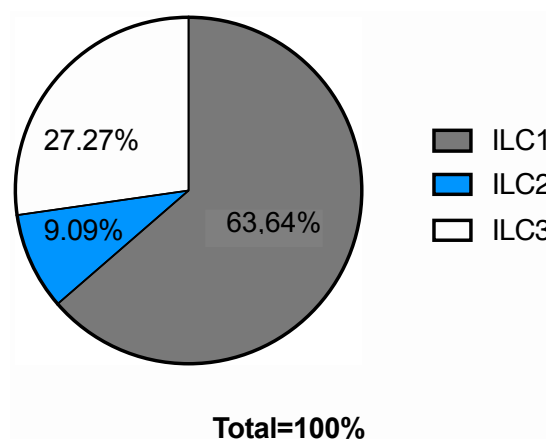


Figura 8. Composición global de linfocitos innatos en las muestras de sangre de cordón con alta expresión de CD56. Se observa la tendencia a la predominancia de los ILC1 sobre el resto de poblaciones de linfocitos innatos en la muestras.

7. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo se pueden dividir en dos partes: la primera, obtenidas de la búsqueda bibliográfica previa a la elaboración y establecimiento del diseño experimental; y la segunda, conclusiones extraídas tras el análisis de las muestras.

Respecto a la revisión bibliográfica, se ha detectado que:

1. Se han planteado varias hipótesis que intentan explicar el incremento de los casos de alergia en las últimas décadas, todas ellas relacionadas con cambios en el modo de vida de la población.

2. El establecimiento de los mecanismos celulares responsables de la sintomatología alérgica es un tema controvertido, pues son varias las explicaciones propuestas basadas en el balance linfocitario de los afectados.

3. El descubrimiento de las ILCs abre un nuevo campo para investigación en enfermedades inmunitarias y su detección precoz.

4. Actualmente, los estudios se están enfocando hacia la determinación de la variación en la composición de ILCs humanas en la salud y la enfermedad.

Del análisis de las muestras hemos podido comprobar que:

1. En nuestra cohorte hemos obtenido dos grupos de muestras en función de la expresión del marcador CD56 en las células NK, caracterizado por células con muy baja o nula expresión de CD56 o bien con expresión de CD56, que podría estar relacionado con el nivel de maduración de estas células.

2. El análisis de las células linfoides innatas de tipo 1 y 3 podría estar sobrevalorado en aquellos individuos con expresión muy baja o nula de CD56.

3. La expresión de ST2 apenas se detecta en los linfocitos innatos de tipo 2 a nivel de membrana.

4. Se han detectado subpoblaciones de linfocitos innatos de tipo 2 no descritas anteriormente que expresan los marcadores CD161 y/o NKp46.

5. Para caracterizar correctamente a las células linfoides innatas, se precisa del empleo de otros marcadores de superficie más específicos.

6. El balance linfocitario en nuestras muestras tendió hacia ILC1.

7. Estudios posteriores podrán dilucidar si existe correlación entre la composición inicial de linfocitos innatos en sangre de cordón y fenómenos alérgicos y/o asmáticos que se produzcan durante la infancia.

8. Bibliografía

Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra65. doi: [10.1126/scitranslmed.3008599](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599)

Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular* (pp. 399-401). Madrid: Elsevier.

Akdis, C., Blesken, T., Akdis, M., Alkan, S., Wüthrich, B., Heusser, C., & Blaser, K. (1997). Induction and differential regulation of bee venom phospholipase A2-specific human IgE and IgG4 antibodies in vitro requires allergen-specific and nonspecific activation of T and B cells. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 99(3), 345-353. doi: [10.1016/s0091-6749\(97\)70052-6](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)70052-6)

Bartemes, K., Kephart, G., Fox, S.J., & Kita, H. (2014). Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 134(3), 671-678.e4. doi: [10.1016/j.jaci.2014.06.024](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.024)

Beck, R., & Lam-Po-Tang, P. (1994). Comparison of cord blood and adult blood lymphocyte normal ranges: A possible explanation for decreased severity of graft versus host disease after cord blood transplantation. *Immunology and Cell Biology*, 72(5), 440-444. doi: [10.1038/icb.1994.65](https://doi.org/10.1038/icb.1994.65)

Borte, S., Meeths, M., Liebscher, I., Krist, K., Nordenskjöld, M., & Hammarström, L. et al. (2014). Combined newborn screening for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and severe T- and B-cell immunodeficiencies. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 134(1), 226-228. doi: [10.1016/j.jaci.2014.04.026](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.04.026)

Chen, X., Welner, R., & Kincade, P. (2009). A possible contribution of retinoids to regulation of fetal B lymphopoiesis. *European Journal of Immunology*, 39(9), 2515-2524. doi: [10.1002/eji.200939374](https://doi.org/10.1002/eji.200939374)

Cichocki, F., Sitnicka, E., & Bryceson, Y. (2014). NK cell development and function – Plasticity and redundancy unleashed. *Seminars in Immunology*, 26(2), 114-126. doi: [10.1016/j.smim.2014.02.003](https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.003)

Eder, W., Ege, M., & von Mutius, E. (2006). The asthma epidemic. *New England Journal of Medicine*, 355(21), 2226-2235. doi: [10.1056/NEJMra054308](https://doi.org/10.1056/NEJMra054308)

Feldman, A. S., He, Y., Moore, M. L., Hershenson, M. B., & Hartert, T. V. (2015). Toward primary prevention of asthma. Reviewing the evidence for early-life respiratory viral infections as modifiable risk factors to prevent childhood asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(1), 34-44. doi: [10.1164/rccm.201405-0901PP](https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0901PP)

Freeman, B.E., Raué, H-P., Hill, A.B., & Slifka, M. K. (2015). Cytokine-mediated activation of NK cells during viral infection. *Journal of Virology*, 89(15), 7922-7931. doi: [10.1128/JVI.00199-15](https://doi.org/10.1128/JVI.00199-15).

Gollwitzer, E., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K., Nicod, L., Lloyd, C., & Marsland, B. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nature Medicine*, 20(6), 642-647. doi: [10.1038/nm.3568](https://doi.org/10.1038/nm.3568)

- Halonen, M., Lohman, I., Stern, D., Spangenberg, A., Anderson, D., Mobley, S., Ciano, K., Peck, M., & Wright, A. (2009). Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *The Journal of Immunology*, *182*(5), 3285-3293. doi: [10.4049/jimmunol.0711996](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0711996)
- Hammad, H., & Lambrecht, B. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity*, *43*(1), 29-40. doi: [10.1016/j.immuni.2015.07.007](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007)
- Kearney, J., Patel, P., Stefanov, E., & King, R. (2015). Natural antibody repertoires: development and functional role in inhibiting allergic airway disease. *Annual Review of Immunology*, *33*(1), 475-504. doi: [10.1146/annurev-immunol-032713-120140](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120140)
- Lambrecht, B., & Hammad, H. (2017). The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nature Immunology*, *18*(10), 1076-1083. doi: [10.1038/ni.3829](https://doi.org/10.1038/ni.3829)
- Lodge, C., Tan, D., Lau, M., Dai, X., Tham, R., Lowe, A., Bowatte, G., Allen, K., & Dharmage, S. (2015). Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica*, *104*, 38-53. doi: [10.1111/apa.13132](https://doi.org/10.1111/apa.13132)
- Macpherson, A., de Agüero, M., & Ganal-Vonarburg, S. (2017). How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nature Reviews Immunology*, *17*(8), 508-517. doi: [10.1038/nri.2017.58](https://doi.org/10.1038/nri.2017.58)
- Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., & Ishikawa, E. et al. (2016). Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PLOS ONE*, *11*(6), e0158498. doi: [10.1371/journal.pone.0158498](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158498)
- Mjösberg, J., & Spits, H. (2016). Human innate lymphoid cells. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, *138*(5), 1265-1276. doi: [10.1016/j.jaci.2016.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.009)
- Newell, E., & Cheng, Y. (2016). Mass cytometry: blessed with the curse of dimensionality. *Nature Immunology*, *17*(8), 890-895. doi: [10.1038/ni.3485](https://doi.org/10.1038/ni.3485)
- Palmer, A. C. (2011). Nutritionally mediated programming of the developing Immune System. *Advances in Nutrition*, *2*(5), 377-395. doi: [10.3945/an.111.000570](https://doi.org/10.3945/an.111.000570)
- Patel, P., & Kearney, J. (2015). Neonatal Exposure to Pneumococcal Phosphorylcholine Modulates the Development of House Dust Mite Allergy during Adult Life. *The Journal Of Immunology*, *194*(12), 5838-5850. doi: [10.4049/jimmunol.1500251](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500251)
- Platts-Mills, T. (2015). The allergy epidemics: 1870-2010. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(1), 3-13. doi: [10.1016/j.jaci.2015.03.048](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.048)
- Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, *126*(4), 458-465. doi: [10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x)
- Regueiro, J., López, C., González, S., & Martínez, E. (2008). *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune* (p. 149). Madrid: Panamericana.
- Roan, F., Stoklasek, T., Whalen, E., Molitor, J., Bluestone, J., Buckner, J., & Ziegler, S. (2016). CD4⁺ group 1 innate lymphoid cells (ILC) form a functionally distinct ILC subset that is increased in systemic sclerosis. *The Journal of Immunology*, *196*(5), 2051-2062. doi: [10.4049/jimmunol.1501491](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501491)

Saluzzo, S., Gorki, A., Rana, B., Martins, R., Scanlon, S., Starkl, P., Lakovits, K., Hladik, A., Korosec, A., Sharif, O., Warszawska, J., Jolin, H., Mesteri, I., McKenzie, A., & Knapp, S. (2017). First-breath-induced type 2 pathways shape the lung immune environment. *Cell Reports*, *18*(8), 1893-1905. doi: [10.1016/j.celrep.2017.01.071](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.071)

Simoni, Y., Fehlings, M., Kløverpris, H., McGovern, N., Koo, S., Loh, C., Lim, S., Kurioka, A., Fergusson, J., Tang, C., Kam, M., Dennis, K., Lim, T., Fui, A., Hoong, C., Chan, J., Curotto de Lafaille, M., Narayanan, S., Baig, S., Shabeer, M., Toh, S., Tan, H., Anicete, R., Tan, E., Takano, A., Klenerman, P., Leslie, A., Tan, D., Tan, I., Ginhoux, F., & Newell, E. (2017). Human innate lymphoid cell subsets possess tissue-type based heterogeneity in phenotype and frequency. *Immunity*, *46*(1), 148-161. doi: [10.1016/j.immuni.2016.11.005](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.11.005)

Trabanelli, S., Cadena, A. G., Mavilio, D., Landis, B. N., Jandus, P., & Jandus, C. (2017). Human Innate Lymphoid Cells (ILCs): towards a uniform immune-phenotyping. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. doi: [10.1002/cyto.b.21614](https://doi.org/10.1002/cyto.b.21614)

Tun, H., Konya, T., Takaro, T., Brook, J., Chari, R., Field, C., Guttman, D., Becker, A., Mandhane, P., Turvey, S., Subbarao, P., Sears, M., Scott, J., & Kozyrskyj, A. (2017). Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infants at 3–4 months following various birth scenarios. *Microbiome*, *5*(1). doi: [10.1186/s40168-017-0254-x](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0254-x)

Van de Pavert, S., Ferreira, M., Domingues, R., Ribeiro, H., Molenaar, R., Moreira-Santos, L., Almeida, F., Ibiza, S., Barbosa, I., Goverse, G., Labão-Almeida, C., Godinho-Silva, C., Konijn, T., Schooneman, D., O'Toole, T., Mizze, M., Habani, Y., Haak, E., Santori, F., Littman, D., Schulte-Merker, S., Dzierzak, E., Simas, J., Mebius, R., & Veiga-Fernandes, H. (2014). Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature*, *508*(7494), 123-127. doi: [10.1038/nature13158](https://doi.org/10.1038/nature13158)

Walker, J., Barlow, J., & McKenzie, A. (2013). Innate lymphoid cells — how did we miss them? *Nature Reviews Immunology*, *13*(2), 75-87. doi: [10.1038/nri3349](https://doi.org/10.1038/nri3349)

Wills-Karp, M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual Review of Immunology*, *17*(1), 255-281. doi: [10.1146/annurev.immunol.17.1.255](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.255)

Wilson, M. S., Taylor, M. D., Balic, A., Finney, C. A. M., Lamb, J. R., & Maizels, R. M. (2005). Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(9), 1199–1212. doi: [10.1084/jem.20042572](https://doi.org/10.1084/jem.20042572)

Yabuhara, A., Kawal, H., & Komiyama, A. (1990). Development of natural killer cytotoxicity during childhood: marked increases in number of natural killer cells with adequate cytotoxic abilities during infancy to early childhood. *Pediatric Research*, *28*(4), 316-321. doi: [10.1203/00006450-199010000-00002](https://doi.org/10.1203/00006450-199010000-00002)

9. Anexo: glosario de términos

A

Alérgeno: antígeno que desencadena hipersensibilidad inmediata. La mayoría de ellos son proteínas ambientales frecuentes, productos animales y sustancias químicas que pueden modificar proteínas propias.

Anticuerpo: productos de secreción de las células de la inmunidad adaptativa (linfocitos) que reconocen antígenos.

Antígeno: sustancias ajenas al organismo que suscitan respuestas inmunitarias específicas o son reconocidas por linfocitos o anticuerpos.

C

Cambio de isotipo: cambio en la cadena pesada de las inmunoglobulinas que desemboca en la producción de anticuerpos diferentes a IgM por parte de los linfocitos B activados.

CD3: complejo de cinco tipos de cadenas polipeptídicas invariantes que se asocia al receptor de células T y que está implicado en la transducción de señales.

CD4: glucoproteína monomérica en la superficie de linfocitos Th con cuatro dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, región transmembrana y cola citoplasmática. Cumple funciones de adhesión y coseñalización.

CD16: receptor de tipo inmunoglobulina que se encuentra en la superficie de las células NK y reconoce los fragmentos cristalizables (Fc) de las inmunoglobulinas. Media en la fagocitosis y en la citotoxicidad.

CD45RO: isoforma de bajo peso molecular de CD45 (proteína muy glicosilada común a todos los leucocitos) que representa activación.

CD94: lectina en la superficie de células NK que, junto a otro receptor, funciona como inhibidor para el linfocito NK citolítico.

CD103: proteína dimérica de unión a cadherinas que participa en el alojamiento del linfocito T en mucosas.

CD117: proteína transmembrana con actividad tirosina quinasa presente en progenitores hematopoyéticos, mastocitos y otros tipos celulares.

CD161: glicoproteína transmembrana de células NK y linfocitos innatos inhibidora de la función citotóxica de las células NK.

Células B: células de la inmunidad adaptativa que median las respuestas humorales mediante la producción de anticuerpos.

Células dendríticas: células de la inmunidad innata encargadas de atrapar los antígenos microbianos que penetran desde el medio externo, transportarlos hacia los órganos linfoides y presentárselos a linfocitos T vírgenes para desencadenar las respuestas inmunitarias.

Células linfoides innatas: poblaciones linfocitarias que producen una gran variedad de citoquinas similares a los linfocitos Th, pero no presentan el marcador específico de linaje de linfocitos T (CD3⁺ CD4⁻).

Célula presentadora de antígenos: células encargadas de captar antígenos y exponerlos ante los linfocitos Th para comenzar las respuestas inmunitarias adaptativas.

Citoquina: gran grupo de proteínas secretadas con estructuras y funciones diversas, que regulan y coordinan muchas actividades de las células de las inmunidades innata y adaptativa.

CRTH2: receptor de prostaglandina que se expresa en la superficie de linfocitos innatos de tipo 2.

E

EDTA: agente quelante de iones metálicos.

Eosinófilo: leucocito de tipo granulocito encargado de matar a parásitos.

Epítipo conformacional: porción de una proteína cuyos aminoácidos reconocidos por anticuerpos no se encuentran dispuestos de forma consecutiva.

Epítipo lineal: porción de una proteína cuyos aminoácidos reconocidos por anticuerpos se encuentran dispuestos de forma consecutiva.

F

Factor quimiotáctico: factores químicos que atraen células.

Fluorocromo: grupo funcional de una molécula que absorbe a una determinada longitud de onda y emite a otra determinada longitud de onda.

Fracción cristizable: últimos dos o tres dominios de la cadena pesada de las inmunoglobulinas que modulan la actividad inmunitaria a través de su unión a receptores.

G

Glucocorticoide: hormona de la familia de los corticosteroides que participa en el metabolismo de los carbohidratos y tiene función inmunosupresora.

H

Histamina: mediador inflamatorio presente en los gránulos de los mastocitos que al ser liberados aumentan la permeabilidad vascular y estimula la contracción de las células musculares lisas.

I

IFN γ : citoquina producida por los linfocitos T CD4+ y NK que favorece la actividad fagocítica de los macrófagos.

IgA: inmunoglobulina predominante en las mucosas y secreciones que actúa como barrera protectora primaria frente a patógenos.

IgE: inmunoglobulina implicada en la alergia y en la respuesta inmunitaria efectiva contra patógenos parásitos.

IgG4: tipo de inmunoglobulina G predominante en la sangre, líquido cefalorraquídeo y peritoneal producida como respuesta del organismo a virus, hongos y bacterias.

Interleucina: conjunto de citoquinas que actúan como mediadores químicos.

IL-4: interleucina producida por los linfocitos Th2 y los mastocitos que promueve el cambio de isotipo a IgE en los linfocitos B y la diferenciación y proliferación de linfocitos Th2, entre otros efectos.

IL-5: interleucina producida por los linfocitos Th2 y linfocitos innatos de tipo 3 que induce proliferación de células B y producción de anticuerpos de tipo IgA.

IL-6: interleucina producida por linfocitos T, macrófagos y células endoteliales que promueve la proliferación de células B y la producción de anticuerpos.

IL-9: interleucina producida por linfocitos T CD4⁺ que tiene como diana celular a los mastocitos, linfocitos B, linfocitos T y células tisulares.

IL-12: interleucina producida por macrófagos y células dendríticas que promueve la diferenciación a Th1 en linfocitos T y la síntesis de IFN γ y el aumento de la actividad citotóxica en las células NK.

IL-13: interleucina producida por linfocitos Th2, NKT y células innatas de tipo 2 que promueve el cambio de isotipo a IgE en células B y activan a macrófagos.

IL-18: interleucina producida por macrófagos, entre otros, en respuesta a lipopolisacárido bacteriano.

IL-23: interleucina producida por macrófagos y células dendríticas que favorece la diferenciación de linfocitos T a Th17.

IL-25: interleucina producida por macrófagos y células dendríticas que promueve la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 por parte de los linfocitos T.

IL-33: interleucina producida por células endoteliales, células musculares lisas, queratinocitos y fibroblastos que promueve la diferenciación de los linfocitos T a Th2 y activan a las células linfoides innatas de tipo 2.

L

Leucotrieno: ácidos grasos derivadas del ácido araquidónico que participan en la inflamación crónica aumentando la permeabilidad vascular.

Linfocitos Th1: linfocitos T CD4⁺ secretores de IL-2 e IFN γ que estimulan funciones relacionadas con citotoxicidad y reacciones inflamatorias locales.

Linfocitos Th2: linfocitos T CD4⁺ secretores de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que estimulan a las células B para que proliferen y produzcan anticuerpos. Tienen un papel importante en las reacciones alérgicas y en las respuestas frente a parásitos.

Linfocitos Th17: linfocitos T CD4⁺ secretores de IL-17 e IL-22. Están relacionados con enfermedades inflamatorias.

Linfocitos Treg: linfocitos T CD4⁺ supresores del sistema inmunitario que mantienen la homeostasis y favorecen la tolerancia a autoantígenos.

Lipopolisacárido: componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas que presenta un gran poder antigénico.

M

Mastocito: célula derivada de la médula ósea presente en la piel y los epitelios mucosos que contiene abundantes gránulos citoplásmicos llenos de histamina y otros mediadores.

Monocito: glóbulo blanco agranulocítico que actúa como fagocito mononuclear circulante.

N

NKp46: receptor activador de citotoxicidad que puede contribuir a la alta eficiencia de las células NK sobre células tumorales.

P

Prostaglandina: sustancia de carácter lipídico que tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria alérgica.

R

Respuesta humoral: respuesta inmunitaria basada en la producción de anticuerpos especializados contra ciertos antígenos.

S

Sistema del complemento: componente fundamental de la respuesta inmunitaria innata que consta de un conjunto de proteínas plasmáticas implicadas en diferentes cascadas bioquímicas que potencian la fagocitosis, la inflamación y dirigen la lisis celular.

ST2: receptor de interleucina-33 relacionado con el funcionamiento de los linfocitos Th.

T

TNF: proteína del grupo de las citoquinas liberadas por las células presentadoras de antígenos cuando detectan señales de peligro.

