



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

MODULACIÓN INFLAMATORIA DE LINFOCITOS T
POLIFUNCIONALES EN TUBERCULOSIS Y HTLV-1

INFLAMMATORY MODULATION OF POLYFUNCTIONAL
T LYMPHOCYTES IN TUBERCULOSIS AND HTLV-1

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

AUTOR:

MARCOS ROBERTO GONZALEZ

ASESOR:

MARTIN MONTES DELGADO

CO-ASESORA:

ELSA VIOLETA GONZALEZ LAGOS

LIMA - PERÚ

2022

JURADO

Presidente: Dra. Guiliana Mas Ubillús
Vocal: Dra. Fiorella Del Carmen Krapp Lopez
Secretario: Dra. Larissa Otero Vegas

Fecha de Sustentación: 17 de mayo de 2022

Calificación: Aprobado con Honores

ASESORES DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

ASESOR

Dr. Martin Montes Delgado

Departamento Académico de Ciencias Preclínicas y de Apoyo

ORCID: 0000-0002-7427-347X

CO-ASESORA

Dra. Elsa Gonzalez Lagos

Departamento Académico de Clínicas Médicas

ORCID: 0000-0002-8543-8188

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi madre, quien siempre me apoyó en el transcurso de la carrera y sirvió como mi ejemplo de desarrollo personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt por abrirme las puertas a la investigación y apoyar mi proyecto durante todo este periodo. Le agradezco a mis dos asesores y a todos los miembros del Laboratorio de Inmunología por su continuo soporte.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Nuestro proyecto de investigación no cuenta con financiamiento del Estado

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	5
III. Materiales y Métodos	5
IV. Resultados	10
V. Discusión	12
VI. Fortalezas y Limitaciones	16
VII. Conclusiones	16
VIII. Referencias Bibliográficas	17
IX. Tablas y figuras	21
Anexos	

RESUMEN

Antecedentes: El rol de los linfocitos T CD4 polifuncionales (T_{pol}) en tuberculosis latente de tuberculosis (LTBi) o HTLV-1 no está claramente definido. **Objetivo:** Describir la frecuencia de linfocitos T_{pol} en pacientes LTBi o HTLV-1. **Métodos:** Cinco pacientes con LTBi, 7 pacientes asintomáticos con HTLV-1 y 9 controles sanos fueron enrolados en este estudio. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LTBi fueron estimuladas con PPD. PBMCs de pacientes con HTLV-1 fueron estimuladas con PHA. Mediante citometría de flujo, se midió la frecuencia de T_{pol} productores de IFN- γ , TNF- α y/o IL-2. **Resultados:** Comparado con controles sanos, se observó una mayor frecuencia basal de linfocitos T_{pol} TNF- α^+ IL-2 $^+$ en pacientes con HTLV-1 (0.0125% y 0.0006% respectivamente, $p = 0.02$). Tras estimulación con PPD, pacientes con LTBi presentaron mayor frecuencia de T_{pol} TNF- α^+ IL-2 $^+$ (0.1086%) comparado con controles sanos (0.0292%) ($p = 0.02$). No se observó una diferencia significativa en la frecuencia total de linfocitos T_{pol} en pacientes HTLV-1 comparado con controles sanos (0.0217% y 0.0019% respectivamente, $p = 0.06$). Se encontró una diferencia significativa en la frecuencia total de linfocitos T_{pol} entre pacientes LTBi y controles sanos tras estimulación con PPD (0.3240% y 0.0810% respectivamente, $p = 0.03$). **Conclusión:** La mayor frecuencia de linfocitos T_{pol} en pacientes con LTBi indica un rol inflamatorio importante en la respuesta anti-tuberculosis, mediada principalmente por el subtipo TNF- α^+ IL-2 $^+$. En pacientes con HTLV-1, la infección aumenta la frecuencia basal de T_{pol} sin afectar la capacidad de producción de citoquinas intracelulares.

Palabras claves: linfocitos T polifuncionales, infección latente de tuberculosis, HTLV-1, citometría de flujo.

ABSTRACT

Background: The role of polyfunctional T CD4 lymphocytes (T_{pol}) in latent tuberculosis infection (LTBi) or HTLV-1 has not yet been elucidated. **Objective:** Determine the frequency of T_{pol} lymphocytes in patients with LTBi or HTLV-1. **Methods:** Five patients with LTBi, 7 asymptomatic patients with HTLV-1 and 9 healthy controls were enrolled in this study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from LTBi patients were stimulated with PPD. PBMCs from HTLV-1 patients were stimulated with PHA. Frequencies of IFN- γ , TNF- α and/or IL-2-producing T_{pol} were assessed by flow cytometry. **Results:** There was a higher basal frequency of TNF- α^+ IL-2 $^+$ T_{pol} in patients with HTLV-1 than in healthy controls (0.0125% and 0.0006% respectively, $p = 0.02$). There was a higher frequency of PPD-stimulated TNF- α^+ IL-2 $^+$ T_{pol} in LTBi patients than in healthy controls (0.1086% and 0.0292% respectively, $p = 0.02$). There was no significant difference on overall T_{pol} frequency between HTLV-1 patients and healthy controls (0.0217% and 0.0019% respectively, $p = 0.06$). After PPD stimulation, overall T_{pol} frequency was significantly higher in LTBi patients than in healthy controls (0.3240% and 0.0810% respectively, $p = 0.03$). **Conclusion:** Higher T_{pol} frequency among LTBi patients suggests a key inflammatory role of this subset in anti-tuberculosis immune response, mediated mainly by the TNF- α^+ IL-2 $^+$ subset. In patients with HTLV-1, viral infection induces a higher T_{pol} frequency without affecting production capacity of intracellular cytokines.

Keywords: polyfunctional T lymphocytes, latent tuberculosis infection, HTLV-1, flow cytometry

I. INTRODUCCIÓN

El Perú, considerado epidemiológicamente como área endémica de tuberculosis (TB), presenta una de las tasas de incidencia más altas en América Latina. En 2020, se estimó en el Perú una tasa incidencia notificada de 116 por cada 100 mil habitantes (Fuente: *Global Tuberculosis Report 2020*, Organización Mundial de la Salud); sin embargo, en el departamento de Lima se reportó una tasa de incidencia de 117 por cada 100 mil habitantes, un valor 11.6 veces mayor a la tasa nacional.

HTLV-1 es un retrovirus humano distribuido globalmente y con zonas endémicas en América Central y del Sur. En el Perú, estudios epidemiológicos han confirmado su endemicidad [1, 2]. Se estima que la prevalencia de HTLV-1 en el Perú es del 1-3% según la población estudiada; en donantes de sangre se encontró una prevalencia de HTLV-1 del 1.2% [1] mientras que en mujeres embarazadas la prevalencia aumentaba hasta 2.5% [3]. Entre la población infectada por HTLV-1, aproximadamente un 90% no manifiesta síntomas clínicos durante su vida; sin embargo, la infección por HTLV-1 puede avanzar y provocar enfermedades como paraparesia espástica tropical (PET) o linfoma de células T de adulto (ATL). Además, la inmunosupresión causada por HTLV-1 puede aumentar el riesgo de infección de enfermedades oportunistas como TB y *Strongyloidiasis* [4].

Estudios a nivel inmunológico han establecido el rol central de los linfocitos T CD4 y la citoquina IFN- γ en la respuesta inmune específica contra *M. tuberculosis* (*Mtb*) y el control de la enfermedad en general [5, 6]. Los linfocitos T CD4, además de producir IFN- γ , son importantes en la inducción de apoptosis de células infectadas por *M. tuberculosis* a través de otras citoquinas como TNF- α e IL-2 [5]. Por lo tanto, IFN- γ es un componente necesario mas no suficiente en la protección contra *M.*

tuberculosis, dependiendo el organismo de otros mecanismos mediados por otras citoquinas. La producción de IFN- γ depende principalmente de linfocitos T CD4, CD8+ y natural killers (*NK cells*); sin embargo, estudios preliminares sugieren que es la producción temprana de IFN- γ por linfocitos T CD4 y la sucesiva activación de macrófagos lo que determina el resultado de la infección [6].

Asimismo, resulta contradictorio cómo HTLV-1 podría asociarse con mayor severidad clínica en pacientes co-infectados con *M. tuberculosis*, a pesar de condicionar una mayor proliferación de linfocitos T CD4 y una mayor producción basal de IFN- γ . Alternativamente, se ha postulado que una proliferación excesiva de linfocitos T podría provocar un exceso de inflamación debido a una sobreproducción de IFN- γ .

La respuesta contra *M. tuberculosis* no incluye únicamente a linfocitos T productores de un tipo de citoquina. En dicha respuesta específica, estudios recientes han demostrado la presencia de linfocitos T polifuncionales (T_{pol}), capaces de secretar diferentes tipos de citoquinas simultáneamente [7–11]. Estudios previos en modelos animales apuntaban a un rol de T_{pol} en la protección inmunitaria contra *M. tuberculosis* [7, 8]. En 2007, un estudio demostró que tanto pacientes como ratones vacunados con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), la única vacuna contra TB implementada mundialmente, la población mayoritaria de linfocitos estaba formada por linfocitos T polifuncionales [8]. Sin embargo, la función de los linfocitos T_{pol} como mediadores de la respuesta anti-TB aún no se ha aclarado. En estudios en infantes y adolescentes, la frecuencia de T_{pol} no aumentó luego de ser vacunados con BCG [12, 13]. Además, la proliferación de T_{pol} en la respuesta

específica contra BCG no es un indicador claro de inmunidad contra TB, pudiendo indicar inflamación inducida.

Estudios más recientes sugieren una correlación entre la presencia de T_{pol} y la enfermedad activa por *M. tuberculosis* [10, 11]. La hipótesis de una asociación entre la acción de T_{pol} y TB se basa en: (1) pacientes con TB activa presentaron una mayor frecuencia de T_{pol} con respecto a pacientes con infección latente de tuberculosis (LTBi) o sanos [10] y (2) la respuesta polifuncional en pacientes con TB disminuye después del tratamiento estándar contra *M. tuberculosis* [11]. Entonces, el incremento de T_{pol} 3+ (IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ IL-2⁺) y 2+, que incluye cualquier combinación IFN- γ , TNF- α o IL-2, modularía la intensidad de la respuesta inflamatoria y de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, Hutchinson *et al* describieron que el subset de T_{pol} CD154⁺ TNF- α ⁺ IFN- γ ⁺ IL-2⁺ se encontraba con mayor frecuencia en pacientes con LTBi que en pacientes con TB activa [14].

En el caso de la infección por HTLV-1, la actividad de linfocitos polifuncionales aún no ha sido estudiada detenidamente. Leal *et al* reportaron un aumento en la frecuencia de polifuncionales 2+ tanto en pacientes con PET como en portadores asintomáticos de HTLV-1 [15]. La proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 inducida por HTLV-1 concuerda con la mayor respuesta linfocitaria y el aumento de T_{pol} . Los resultados del estudio indicado [15] se alinean a un mecanismo basado en una proliferación de linfocitos defectivos, descrito en HTLV-1 [16–18]. Al afectar principalmente a linfocitos T CD4, HTLV-1 aumenta su tasa de proliferación y altera su función [16]. A diferencia de otros retrovirus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que provoca una disminución en la población de linfocitos T CD4, HTLV-1 aumenta significativamente los niveles de

linfocitos T CD4 y CD8 [17]. Sin embargo, el aumento de la población linfocitaria no condiciona una mejor respuesta inmune contra patógenos, sino que puede inducir enfermedades linfoproliferativas como ATL o de tipo autoinmune como PET [18].

Nuestra hipótesis es que los pacientes con tuberculosis latente (LTBi) presentarán una mayor frecuencia de T_{pol} que pacientes sanos al ser estimulados con PPD. Asimismo, postulamos que la frecuencia basal de T_{pol} será mayor en pacientes con HTLV-1 que en controles sanos debido a la proliferación linfocitaria inducida por HTLV-1.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Describir la frecuencia de linfocitos T polifuncionales en pacientes sanos, con tuberculosis latente (LTBi) o con infección por HTLV-1.

Objetivos específicos

1. Determinar las frecuencias basales e inducidas, mediante el estímulo con PPD, de linfocitos T polifuncionales específicos contra *M. tuberculosis* en pacientes con tuberculosis latente y controles sanos.
2. Determinar la frecuencia basal de linfocitos T polifuncionales y su capacidad de proliferación tras estimulación con fitohemaglutinina (PHA) en pacientes con HTLV-1 y controles sanos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Estudio de carácter experimental realizado en el Instituto de Medicina Tropical (IMT) “Alexander von Humboldt”.

2. Población estudiada

Para este estudio se consideraron muestras criopreservadas originalmente obtenidas en el estudio “Respuesta Inmune a la Co-Infección por HTLV-1 y Tuberculosis” (SIDISI: 63921). Los participantes fueron primariamente reclutados de la cohorte de pacientes con HTLV-1 del IMT “Alexander von Humboldt”. Adicionalmente, para el grupo de controles sanos y el grupo de LTBs sin HTLV-1, el estudio 63921 incluyó a familiares del primer grupo sin infección por HTLV-1. . El criterio de

inclusión principal fue tener una edad de 18 a 65 años. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: historia de tratamiento previo para TB activa, presencia de síntomas compatibles con TB activa. Los síntomas compatibles con TB activa se definieron de la siguiente manera: presencia de tos por 2 o más semanas, y/o presencia de sudoración nocturna, y/o baja de peso mayor a 5% del peso corporal en los últimos 3 meses. Un total de 41 participantes fueron enrolados en el estudio 63921 y los PBMCs de cada participante fueron criopreservados al momento del enrolamiento. Nuestro estudio utilizó estas muestras de PBMCs criopreservadas.

Definición de grupos de estudio

Grupo LTBi

Pacientes con prueba de QuantiFERON-TB Gold positiva sin síntomas de TB activa (definidos en la sección anterior). Para descartar co-infección por HTLV-1, todos los pacientes incluidos tenían una prueba de carga proviral de HTLV-1 negativa.

Grupo HTLV-1

Pacientes con prueba de carga proviral de HTLV-1 positiva. Para descartar co-infección por TB, todos los pacientes incluidos tenían una prueba de QuantiFERON-TB Gold negativa.

Grupo control

Pacientes con prueba de carga proviral de HTLV-1 y QuantiFERON-TB Gold negativas, sin historia de infección previa de TB.

3. Diseño muestral

Grupo	Descripción
Grupo LTBi: 5 sujetos	Pacientes con infección de tuberculosis latente (LTBi) sin HTLV-1
Grupo HTLV-1: 7 sujetos	Pacientes con HTLV-1 sin infección de Tuberculosis latente (LTBi)
Grupo control: 9 sujetos	Controles sanos

4. Variables de estudio

Los diferentes subtipos de poblaciones de linfocitos han sido definidos en base al Mean Fluorescence Intensity (MFI) de marcadores de superficie e intracelulares. De acuerdo con cada población, se definirá un umbral de MFI para establecer si hay expresión de cada marcador.

Linfocito T CD4

Linfocitos T CD4 se definen en citometría de flujo como CD3⁺ CD4⁺ dentro de la ventana de linfocitos.

Linfocitos T polifuncional

Linfocitos T polifuncionales (T_{pol}) son un subtipo de T CD4 y se definen en citometría de flujo como CD3⁺ y la producción de ≥ 2 citoquinas intracelulares (IFN- γ , TNF- α , IL-2).

Linfocitos T_{pol} 3+ indican tinción positiva para IFN- γ , TNF- α y IL-2. Linfocitos T_{pol} 2+ indican producción de 2 citoquinas intracelulares.

Linfocito T CD8

Linfocitos T CD8 y se definen en citometría de flujo como CD3⁺CD8⁺ dentro de la ventana de linfocitos.

5. Procesamiento de las muestras

Ensayos de laboratorio *in-vitro*

El método de descongelación de células criopreservadas en nuestro estudio siguió procedimientos de descongelación ya realizados en el IMT [19]. Los viales fueron descongelados rápidamente mediante inmersión en baño maría a 37 °C y lavados 2 veces en medio RPMI-1640 10% FBS (500g, 15 min). Realizada la resuspensión, se contaron las células y se evaluó su viabilidad utilizando azul de tripano. Las células fueron transferidas a placas de cultivo y se cultivaron en RPMI-1640 10% FBS por 24 horas (37°C, 5%CO₂).

Estimulación de PBMCs con PPD o PHA

Se colocaron los PBMCs en placas PDVF a una concentración de 2,5 x 10⁵ células/pozo. En pacientes con LTBi y controles, la respuesta específica contra *M. tuberculosis* se evaluó utilizando PPD (10 ug/ml). En cada paciente se utilizó una muestra adicional de PBMCs sin adición PPD para evaluar la frecuencia basal de linfocitos T_{pol}. Luego de la colocación de PPD en cada pozo, se dejó la muestra incubando por un tiempo de 48 horas para facilitar la producción de citoquinas específicas contra TB. Las muestras que no incluyeron PPD fueron incubadas en medio completo por 48 horas.

Los PBMCs de pacientes con HTLV-1 fueron incubados por seis horas con fitohemaglutinina (PHA, 1 ug/ml). PHA es un compuesto que estimula la

proliferación de linfocitos a través de la activación de la mitosis y permite evaluar la capacidad de producción de citoquinas.

Cuantificación de linfocitos T polifunciones por citometría de flujo

La tinción de superficie y de citoquinas intracelulares se realizó siguiendo el protocolo adjunto mencionado anteriormente (Anexo 1). Previo a la tinción de superficie, se realizó una tinción de viabilidad con el marcador Live/Dead™. Luego se realizó la tinción de marcadores de superficie anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. A continuación se marcaron intracelularmente las citoquinas IFN- γ , TNF- α y IL-2 siguiendo el protocolo.

Completado el proceso de tinción, la adquisición de las células se realizó en el citómetro de flujo FACSCanto II. La producción de citoquinas intracelulares se cuantificó a través del MFI. Cuando un marcador (de superficie o intracelular) presentaba un MFI mayor al valor umbral establecido, esa célula se consideraba como positiva para la expresión de ese marcador. El análisis de datos se llevó a cabo mediante el software FlowJo v10. Al menos 0.2 millones de eventos se adquirieron en cada muestra.

El proceso de adquisición de datos mediante citometría de flujo y el posterior análisis de datos se realizó a ciegas, sin conocer a qué grupo de estudio correspondían las muestras que se estaban procesando.

6. Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para el análisis de características demográficas (edad y sexo). En el análisis descriptivo, variables cualitativas se evaluaron

mediante frecuencia y variables cuantitativas mediante medianas y rangos intercuartil.

Para el análisis de variables categóricas entre grupos se utilizó la prueba exacta de Fischer. Comparación de variables cuantitativas se realizó mediante pruebas no paramétricas. Se comparó la frecuencia de linfocitos T_{pol} entre pacientes LTBi y controles sanos o pacientes HTLV-1 y controles sanos mediante la prueba U de Mann-Whitney. La comparación de ≥ 3 grupos como el porcentaje de CD4 o CD8 entre los grupos control, LTBi y HTLV-1 se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 9. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos, sin considerarse ajustes para comparaciones múltiples.

7. Aspectos éticos

Nuestro estudio utilizó PBMCs criogenizados separados de pacientes enrolados para el estudio 63921. Este estudio cuenta con aprobación vigente por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la UPCH (R-0260-43-21).

IV. RESULTADOS

Un total de 21 pacientes fueron incluidos en el análisis final de nuestra investigación, divididos en 3 grupos (Tabla 1). Se incluyeron 7 pacientes en el grupo de HTLV-1 (7/21, 33%), 5 pacientes en el grupo LTBi (5/21, 24%) y 9 pacientes en el grupo control (9/21, 43%). La edad mediana en el grupo HTLV-1 fue 54 (RIQ 27), mientras que fue 36 (RIQ 12) y 34 (RIQ 16.5) en los grupos LTBi y grupo control, respectivamente. Se encontró una diferencia de edades significativa entre los 3 grupos ($p = 0.01$), principalmente debido al grupo HTLV-

1. De 21 pacientes, 12 pacientes (57%) fueron de sexo masculino; sin embargo, 86% (6/7) pacientes en el grupo HTLV-1 fueron mujeres, mientras que 0% (0/5) y 33% (3/9) lo fueron en los grupos de LTBi y grupo control, respectivamente.

Al analizar la frecuencia basal (sin estimulación) de linfocitos T CD4, no se encontró diferencia significativa entre los grupos HTLV-1, LTBi y control; tampoco se encontró diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 sobre la población total al estimular las células con PPD o PHA (Tabla 2). Al estudiar la frecuencia de linfocitos T CD8, se encontró una diferencia significativa entre los grupos control, HTLV-1 y LTBi ante la estimulación con PPD. En este caso, se observó una mayor frecuencia de linfocitos CD8 en el grupo control (17.13%) en comparación al grupo HTLV-1 (12.37%) y el grupo LTBi (12.37%) ($p = 0.03$) (Tabla 2).

En la figura 1, se detalla la media valores mínimo y máximo de frecuencia basal de linfocitos productores de citoquinas intracelulares en pacientes HTLV-1 y controles sanos. (Figura 1) No se observó una diferencia significativa en la frecuencia basal de linfocitos productores de una sola citoquina al comparar el grupo HTLV-1 con controles sanos (Tabla 3). La frecuencia de linfocitos $T_{pol} TNF\alpha^+ IL-2^+$ fue 22 veces mayor en pacientes con HTLV-1 que en controles sanos (0.0125% vs. 0.0006%, $p = 0.02$). Se obtuvieron frecuencias basales similares de linfocitos productores de citoquinas intracelulares, incluidos los T_{pol} , en pacientes LTBi y controles sanos.

Al estimular las células con PPD, la frecuencia de linfocitos $T_{pol} TNF-\alpha^+ IL-2^+$ fue 3.7 veces mayor en el grupo LTBi (0.1086% vs. 0.0292%, $p = 0.02$) (Tabla 4). Tras estimulación con PPD, no se observó una diferencia significativa en la frecuencia de linfocitos $TNF-\alpha^+$ (0.8280% vs. 0.2200%, $p = 0.07$), $IFN-\gamma^+ TNF-\alpha^+$ (0.1468%

vs. 0.0295%, $p = 0.05$) y triples positivos $\text{IFN-}\gamma^+ \text{ TNF-}\alpha^+ \text{ IL-2}^+$ (0.0676% vs. 0.0206%, $p = 0.06$) entre pacientes con LTBi y controles sanos.

Al estimular las células con PHA, pacientes con HTLV-1 y controles sanos presentaron una similar frecuencia de linfocitos productores de citoquinas.

Al analizar la frecuencia total de linfocitos T_{pol} (sumatoria de las frecuencias de los 4 subgrupos 2+ y el subgrupo 3+), no se encontró diferencia entre pacientes HTLV-1 y controles sanos de manera basal o con estimulación con PHA ($p = 0.06$ y $p = 0.87$ respectivamente) (Tabla 5). Tras estimulación con PPD, el grupo LTBi presentó una frecuencia total de T_{pol} cuatro veces mayor que la de los controles sanos (0.3240% vs. 0.0801%, $p = 0.03$) (Tabla 6).

V. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, encontramos una mayor frecuencia de linfocitos $T_{\text{pol}} \text{ TNF-}\alpha^+ \text{ IL-2}^+$ y una mayor frecuencia total de T_{pol} en pacientes con LTBi que en controles sanos. La mayor frecuencia de este subtipo de linfocitos en la infección latente podría sugerir su rol como gestor de inflamación más que un rol de protección. Con respecto a HTLV-1, aunque la frecuencia basal de linfocitos $T_{\text{pol}} \text{ TNF-}\alpha^+ \text{ IL-2}^+$ fue mayor que en controles sanos, su capacidad de producción de citoquinas intracelulares no se vio alterada. Nuestros hallazgos sugieren que el aumento en la frecuencia basal de T_{pol} en HTLV-1, probablemente observada como mediador de inflamación, no alteraría la capacidad de producción de citoquinas de este subtipo de linfocitos.

La mayor frecuencia de linfocitos $T_{\text{pol}} \text{ TNF-}\alpha^+ \text{ IL-2}^+$ en pacientes LTBi que en controles sanos tras estimulación con PPD ha sido también reportada por Qiu *et al.*

[10] En su estudio, Qiu *et al* evaluaron las poblaciones de linfocitos T_{pol} en tres grupos de pacientes sin HTLV-1: pacientes sanos, pacientes con tuberculosis latente (LTBi) y pacientes con tuberculosis activa. En concordancia con nuestros resultados, ellos publicaron un aumento significativo en la frecuencia del subset de $T_{pol} TNF-\alpha^+ IL-2^+$ en pacientes LTBi tras estimulación con PPD. Además, la frecuencia promedio del subgrupo de linfocitos $T CD4^+ TNF-\alpha^+ IL-2^+$ en pacientes LTBi descrita por ellos fue cercana a la nuestra (0.1086% por nosotros y $\approx 0.1\%$ por ellos). Similar a nuestro estudio, Qiu *et al* estimularon los PBMCs con un lisado derivado de *M. tuberculosis*, lo cual refuerza la solidez de nuestros resultados. Adicionalmente, Qiu *et al* midieron la frecuencia de linfocitos T_{pol} en pacientes con TB pulmonar activa y la compararon con los grupos anteriores. Pacientes con TB activa presentaron aún mayor frecuencia de linfocitos polifuncionales comparado con el grupo LTBi y controles sanos. El aumento progresivo de las frecuencias de T_{pol} en LTBi con respecto a pacientes sanos, y en TB activa con respecto a LTBi brinda mayor solidez a la hipótesis que postula a los T_{pol} como gestores de inflamación, los cuales podrían tener un rol en la progresión a la enfermedad activa.

[10]

Estudios adicionales también han descrito un aumento en los niveles de linfocitos T_{pol} en pacientes con tuberculosis activa o latente [7, 11, 20]. Sin embargo, Lichtner *et al* describieron una mayor frecuencia de linfocitos T_{pol} en pacientes LTBi comparado con pacientes con TB activa; los pacientes en ambos grupos no tenían infección con HTLV-1. En su estudio, Lichtner *et al* reportaron una mayor frecuencia en los subtipos $CD4^+ IFN-\gamma^+ TNF\alpha^+ IL-2^+$ y $CD4^+ IFN-\gamma^+ IL-2^+$ en pacientes LTBi [21]. Comparado con nuestro estudio y el de Qiu *et al*, Lichtner *et*

al no compararon la sumatoria de todos los subtipos de linfocitos T_{pol} entre grupos de pacientes, únicamente evaluaron individualmente a cada subtipo de T_{pol} . Además, el proceso de estimulación de PBMCs fue diferente al nuestro, utilizando antígenos específicos para tuberculosis (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) en lugar de PPD. Nosotros recomendamos realizar un sub-análisis de los resultados según la carga bacilar de *M. tuberculosis* de cada paciente, la cual podría ser un potencial factor confusor.

En nuestro estudio, la frecuencia de linfocitos productores de una sola citoquina ($IL-2^+$, $TNF\alpha^+$ o $IFN-\gamma^+$) no presentó grandes variaciones entre pacientes LTBi y controles (Tabla 4). Al contrario, la frecuencia de linfocitos T_{pol} mostró mayores variaciones, indicando adicionalmente potencial como herramienta diagnóstica para clasificar paciente como sanos o LTBi. Lichtner *et al* encontraron similares hallazgos [21]. Luego de analizar la frecuencia de linfocitos $T CD4^+ IL-2^+ TNF\alpha^+ IFN-\gamma^+$ en pacientes con TB activa y latente, ellos reportaron que utilizando un punto de corte de 0.182% de linfocitos de este subgrupo, se podía diferenciar a pacientes con LTBi de aquellos con TB activa con una sensibilidad y especificidad del 77.78% y 70%, respectivamente ($p = 0.0002$). Por lo tanto, la frecuencia de linfocitos T_{pol} sirve como potencial herramienta diagnóstica para diferenciar grupos de pacientes.

El rol de los linfocitos T_{pol} en el tratamiento de LTBi ha sido descrito previamente por Sauzullo *et al* [22]. En un análisis de 16 pacientes con LTBi sin HTLV-1 y 25 controles sanos, ellos reportaron que pacientes LTBi presentaron una menor frecuencia de linfocitos $T_{pol} CD4^+ IFN-\gamma^+ TNF-\alpha^+ IL-2^+$ luego de completar tratamiento profiláctico con isoniacida (INH) que pacientes con LTBi que nunca

recibieron tratamiento ($p = 0.005$). Además, también se observó una tendencia de los linfocitos T hacia la producción de una sola citoquina en pacientes LTBi que completaron tratamiento. Este estudio brinda más evidencia a la hipótesis de que los T_{pol} son gestores de inflamación en LTBi y la cura de la infección latente, mediante INH, disminuye los niveles de T_{pol} y por lo tanto de inflamación. A pesar de no ser longitudinal y no evaluar la respuesta a INH en LTBi, nuestro estudio también reporta una mayor proporción de linfocitos T_{pol} en pacientes con LTBi que en controles sanos, donde la mayoría de producción de citoquinas ocurre por linfocitos T productores de una sola citoquina.

Hasta la fecha, nuestro estudio es uno de los primeros en describir la frecuencia basal de linfocitos T_{pol} en pacientes con infección asintomática por HTLV-1. La mayor frecuencia de linfocitos T_{pol} $TNF-\alpha^+$ $IL-2^+$ aquí descrito se debe probablemente al mayor estado inflamatorio presente en pacientes con HTLV-1, aun cuando son asintomáticos ($p = 0.03$). Hasta la fecha, solamente Leal *et al* han analizado la frecuencia de T_{pol} en pacientes asintomáticos HTLV-1 y con enfermedades derivadas de HTLV-1 (PET) [15]. Dentro del subtipo de linfocitos T reguladores ($CD4^+$ $CD25^+$ $CD29^+$), ellos reportaron una mayor frecuencia de linfocitos T_{pol} en pacientes con PET comparado con HTLV-1 asintomáticos y controles sanos ($p = 0.02$). En este caso, el progresivo aumento de la frecuencia de T_{pol} en pacientes sintomáticos (PET) se debe principalmente a la falta de regulación inducida por HTLV-1. De manera interesante, al evaluar la capacidad de producción de citoquinas intracelulares mediante PHA, no encontramos diferencia entre controles sanos y asintomáticos con HTLV-1. Por lo tanto, la mayor frecuencia

basal de linfocitos T polifuncionales en HTLV-1 asintomático no estaría afectando la capacidad de producción de citoquinas intracelulares.

VI. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

La primera fortaleza de nuestro estudio es incorporar el uso de una tinción de viabilidad (Live/Dead, Thermofisher) para discriminar entre linfocitos vivos y muertos, los cuales pueden ser falsos “productores” de citoquinas intracelulares. La segunda fortaleza es el uso de PHA en muestras de pacientes con HTLV-1, lo cual nos permite evaluar la capacidad de producción de citoquinas intracelulares.

La primera limitación de este estudio es centrarse en el subtipo de linfocitos T_{pol}, los cuales no representan la respuesta inmune completa contra *M. tuberculosis* o HTLV-1. En segundo lugar, el tamaño de muestra utilizado para esta tesis limita la potencia estadística de los análisis realizados y no permitiría llegar a diferencias significativas. Otra limitación importante son las diferencias en las características demográficas de la muestra. Los tres grupos utilizados en nuestro estudio (controles, HTLV-1 y LTBi) presentan diferencias significativas en la edad y la distribución de sexo de pacientes. Finalmente, este estudio se ha hecho en PBMCs, no en muestras tisulares. El análisis de PBMCs es, por lo tanto, una manera indirecta de evaluar los fenómenos inmunes que ocurren en la respuesta contra *M. tuberculosis* o HTLV-1

VII. CONCLUSIONES

- La mayor frecuencia de linfocitos T_{pol} en pacientes con LTBi sugiere un probable rol inflamatorio importante en la respuesta anti-TB.

- El aumento en la frecuencia basal de T_{pol} en pacientes HTLV-1 no afecta la capacidad de producción de citoquinas intracelulares.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quispe NCS, Feria EB, De Santos-Fortuna EL, Caterino-De-Araujo A (2009) Confirming the presence of HTLV-1 infection and the absence of HTLV-2 in blood donors from arequipa, PERU. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51:25–29. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000100005>
2. Alarcón JO, Friedman HB, Montano SM, et al (2006) High endemicity of human T-cell lymphotropic virus type 1 among pregnant women in peru. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42:604–9. <https://doi.org/10.1097/01.qai.0000221680.52563.d5>
3. Sanchez-Palacios C, Gotuzzo E, Vandamme AM, Maldonado Y (2003) Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. *Int J Infect Dis* 7:132–137. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90009-9](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90009-9)
4. Montes M, Sanchez C, Verdonck K, et al (2009) Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 3:4–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000456>
5. Ahmad S (2011) Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol* 2011:.

<https://doi.org/10.1155/2011/814943>

6. Caruso AM, Serbina N, Klein E, et al (1999) Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol* 162:5407–16
7. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, et al (2010) Multifunctional CD4+ T cells correlate with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol* 40:2211–2220. <https://doi.org/10.1002/eji.201040455>
8. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, et al (2007) Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 13:843–850. <https://doi.org/nm1592>
[pii]r10.1038/nm1592
9. Forbes EK, Sander C, Ronan EO, et al (2008) Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge in mice. *J Immunol* 181:4955–64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4955>
10. Qiu Z, Zhang M, Zhu Y, et al (2012) Multifunctional CD4 T cell responses in patients with active tuberculosis. *Sci Rep* 2:216.
<https://doi.org/10.1038/srep00216>
11. Young JM, Adetifa IMO, Ota MOC, Sutherland JS (2010) Expanded polyfunctional T cell response to mycobacterial antigens in TB disease and contraction post-treatment. *PLoS One* 5:.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011237>

12. Kagina BMN, Abel B, Scriba TJ, et al (2010) Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. *Am J Respir Crit Care Med* 182:1073–1079.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0334OC>
13. Smith SG, Lalor MK, Gorak-Stolinska P, et al (2010) Mycobacterium tuberculosis PPD-induced immune biomarkers measurable in vitro following BCG vaccination of UK adolescents by multiplex bead array and intracellular cytokine staining. *BMC Immunol* 11:.
<https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-35>
14. Hutchinson P, Barkham TMS, Tang W, et al (2015) Measurement of phenotype and absolute number of circulating heparin-binding hemagglutinin, ESAT-6 and CFP-10, and purified protein derivative antigen-specific CD4 T cells can discriminate active from latent tuberculosis infection. *Clin Vaccine Immunol* 22:200–212.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00607-14>
15. Leal FE, Ndhlovu LC, Hasenkrug AM, et al (2013) Expansion in CD39+ CD4+ Immunoregulatory T Cells and Rarity of Th17 Cells in HTLV-1 Infected Patients Is Associated with Neurological Complications. *PLoS Negl Trop Dis* 7:.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002028>
16. Satou Y, Matsuoka M (2010) HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *J Clin Exp Hematop* 50:1–8. <https://doi.org/10.3960/jslrt.50.1>

17. Asquith B, Zhang Y, Mosley AJ, et al (2007) In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. 104:
18. Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, et al (2010) Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev* 23:577–589.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00063-09>
19. Sattui S, De La Flor C, Sanchez C, et al (2012) Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers. *Cytom Part B - Clin Cytom* 82 B:54–58. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20621>
20. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, et al (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J Immunol* 187:2222–32.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101122>
21. Lichtner M, Mascia C, Sauzullo I, et al (2015) Multifunctional analysis of CD4+ T-cell response as immune-based model for tuberculosis detection. *J Immunol Res* 2015:. <https://doi.org/10.1155/2015/217287>
22. Sauzullo I, Mengoni F, Mascia C, et al (2016) Treatment of latent tuberculosis infection induces changes in multifunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cells. *Med Microbiol Immunol* 205:37–45.
<https://doi.org/10.1007/s00430-015-0424-z>

IX. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio. Información entre paréntesis corresponde a la desviación estándar (edad) o el porcentaje del total (sexo).

		HTLV-1 (n = 7)	LTBi (n = 5)	Control (n = 9)	p
Edad		52.6 (12.5)	36.4 (6.9)	36.6 (9.5)	0.01
Sexo	Masculino	1 (14%)	5 (100%)	6 (67%)	-
	Femenino	6 (86%)	0 (0%)	3 (33%)	-

Tabla 2. Porcentaje de células T CD4 y T CD8 sobre el total de PBMCs. **Nil:** no estimulación. La información entre paréntesis corresponde a la desviación estándar de los valores de esa categoría.

		% CD4	p	% CD8	p
Nil	HTLV-1	55.06 (10.18)	0.77	13.21 (5.76)	0.23
	LTBi	50.30 (13.43)		12.03 (3.56)	
	Control	51.28 (10.44)		16.62 (4.22)	
PPD	HTLV-1	52.90 (12.47)	0.91	12.37 (5.53)	0.03
	LTBi	49.08 (14.02)		11.60 (3.27)	
	Control	51.27 (10.09)		17.13 (4.00)	
PHA	HTLV-1	30.76 (16.22)	0.99	14.34 (6.52)	0.73
	LTBi	28.01 (13.41)		12.28 (5.65)	
	Control	30.24 (15.46)		12.06 (4.48)	

Tabla 3. Frecuencia de linfocitos productores de IFN- γ^+ , TNF- α^+ y/o IL-2 $^+$ dentro de la población T CD4 en pacientes con HTLV-1 y controles sanos. **Nil:** no estimulación. La información entre paréntesis corresponde a la desviación estándar de los valores de esa categoría.

	Nil			PHA		
	HTLV-1	Control	p	HTLV-1	Control	p
IFN-γ^+	0.1004 (0.06083)	0.1079 (0.1035)	0.87	1.177 (1.353)	0.5351 (0.3899)	0.31
TNF-α^+	0.2779 (0.3187)	0.1176 (0.0954)	0.24	4.257 (1.365)	4.821 (1.828)	0.43
IL-2$^+$	0.2481 (0.3903)	0.1522 (0.1123)	0.71	2.007 (1.261)	1.923 (1.263)	0.71
IFN-γ^+ TNF-α^+	0.0018 (0.0034)	0.0002 (0.0005)	0.31	1.033 (0.9746)	1.303 (1.214)	0.63
TNF-α^+ IL-2$^+$	0.0125 (0.0177)	0.0006 (0.0013)	0.02	1.477 (0.7199)	1.574 (1.055)	0.96
IFN-γ^+ IL-2$^+$	0.0019 (0.0049)	0.0012 (0.0032)	0.14	0.1505 (0.1658)	0.1290 (0.1159)	0.87
IFN-γ^+ TNF-α^+ IL-2$^+$	0.0019 (0.0049)	0.0012 (0.0032)	0.26	0.2769 (0.1976)	0.5171 (0.4673)	0.27

Tabla 4. Frecuencia de linfocitos productores de IFN- γ^+ , TNF- α^+ y/o IL-2 $^+$ dentro de la población T CD4 en pacientes con LTBi y controles sanos. **Nil:** no estimulación. La información entre paréntesis corresponde a la desviación estándar de los valores de esa categoría.

	Nil			PPD		
	LTBi	Control	p	LTBi	Control	p
IFN-γ^+	0.0770 (0.0712)	0.1079 (0.1035)	0.74	0.1064 (0.0708)	0.1243 (0.1000)	0.95
TNF-α^+	0.0896 (0.0699)	0.1058 (0.0973)	0.39	0.8280 (0.8709)	0.2200 (0.1790)	0.07
IL-2$^+$	0.1140 (0.0490)	0.1522 (0.1123)	0.59	0.1320 (0.1086)	0.1702 (0.1433)	0.95
IFN-γ^+ TNF-α^+	0.0006 (0.0014)	0.00016 (0.0005)	0.58	0.1468 (0.1886)	0.0295 (0.0339)	0.05
TNF-α^+ IL-2$^+$	0 (0)	0.0012 (0.0032)	0.21	0.1086 (0.0748)	0.0292 (0.0371)	0.02
IFN-γ^+ IL-2$^+$	0.0015 (0.0020)	0.0006 (0.0013)	0.27	0.0010 (0.0010)	0.0017 (0.0050)	0.11
IFN-γ^+ TNF-α^+ IL-2$^+$	0.0003 (0.0007)	0 (0)	0.18	0.0676 (0.0592)	0.0206 (0.0249)	0.06

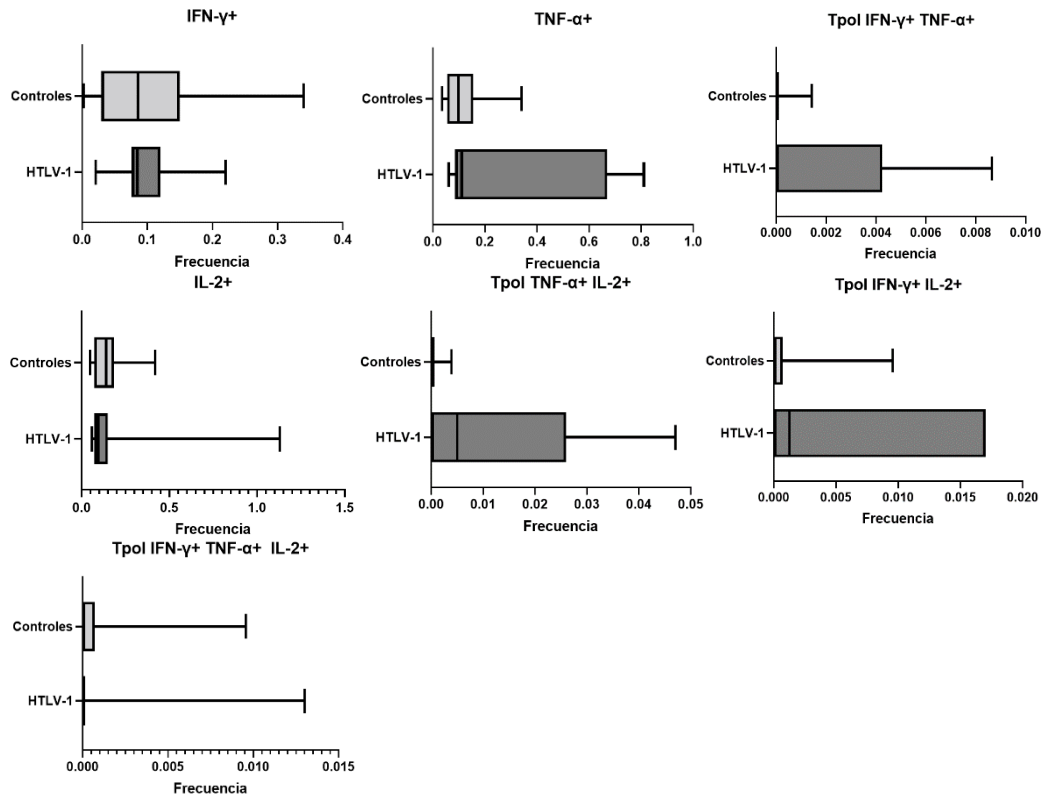
Tabla 5. Frecuencia total de linfocitos T_{pol} en pacientes HTLV-1 y controles sanos. **Nil:** no estimulación. La información entre paréntesis corresponde a la desviación estándar de los valores de esa categoría.

		% Total de T_{pol}	p
Nil	HTLV-1	0.0217 (0.0319)	0.06
	Control	0.0019 (0.0032)	
PHA	HTLV-1	2.937 (1.678)	0.87
	Control	3.524 (2.503)	

Tabla 6. Frecuencia total de linfocitos T_{pol} en pacientes con LTBi y controles sanos. **Nil:** no estimulación. La información entre paréntesis corresponde a la desviación estándar de los valores de esa categoría.

		% Total de T_{pol}	p
Nil	LTBi	0.0024 (0.0041)	0.78
	Control	0.0019 (0.0032)	
PPD	LTBi	0.3240 (0.3065)	0.03
	Control	0.0810 (0.0919)	

Figura 1. Media, mediana y valores máximos y mínimos de frecuencia basal de linfocitos productores de citoquinas intracelulares en pacientes con HTLV-1 o controles sanos.



ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de tinción intracelular

El protocolo adjunto se basa en instrucciones de DL y ha sido modificado partiendo de Reiger/Zielinski.

Reagents

- **PMA** (Phorbol 12-myristate 13-acetate) from Sigma-Aldrich (P8139):
Stock at 10^{-2} M in DMSO, aliquots of 5 μ l stored at -20°C ,
Final concentration = 2×10^{-7} M
 - *PMA: First 1:10 dilution from stock, then 1:500 in complete media (So 1:5000 is a 10X concentration).*
- **Ionomycin** from Sigma-Aldrich (I0634):
Stock at 1 mg/ml in DMSO
Final concentration = 1 μ g/ml
 - *Ionomycin: 1:100 in complete media (10X concentration).*
 - *PMA and Ionomycin at final concentrations can be prepared together in complete media in a 10X concentration, so add 20 μ L/well with a final volume of 200 μ L after cell addition.*
- **Brefeldin A** from Sigma-Aldrich (B7651):
Stock at 10 mg/ml in DMSO, aliquots of 20 and 40 μ L stored at -20°C
Final concentration 10 μ g/ml
 - *BFA: 1:100 in complete media to a 10X concentration, so add 20 μ L/well with a final volume of approx. 200 μ L after cell addition*
- **Cytofix/Cytoperm** 1x solution from BD Pharmingen (554722)
- **Complete media** (RPMI 1640, no HEPES, 1% glutamine, 1% pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% pen/strep, 0.00005% MB-mercaptoethanol, 5% human serum)
- **Perm/Wash** 10x solution from BD Pharmingen (554723)
 - *Always prepare freshly before use (dilution with H₂O)*
- **Max buffer** (PBS, 2mM EDTA, 2.5% HS)

- **PBS**

Method:

Activation

1. Transfer 100 μ L of cell of interest into a 96 well plate U-bottom and fill up to 200 μ L with **complete media**.
 - *Also can start with 200 μ L from the cell of interest depending in cell concentration.*
2. Wash cells 2x with **complete media** at 1500rpm for 4 min at room temperature. Discard the supernatant by flipping the plate.
3. Resuspend the cells in 180 μ L **complete media**. Prepare the 10X solution of PMA/Ionomycin as describe before and add 20 μ L in the wall of the well.
4. Incubate for 2.5h at 37°C.
5. After 2.5h add 20 μ L of 10x BFA into the wall of each well and incubate for another 2.5h. The total stimulation period is therefore 5h.
6. Spin down at 1500rpm, 4min, 4°C. Discard the supernatant.
7. Add 180 μ L of **PBS** and wash 1500 rpm, 4 min, 4°C. Discard the supernatant.

Viability staining

It is difficult to distinguish live from dead cells after fixation by FSC/SSC.

This is why it is better to stain the cells with a LIVE/DEAD dye.

1. Prepare the dye: From the 1000X stock (stock solution prepared by adding 50 μ L of DMSO to the individual vial), dilute 1:40 in water.
 - *Calculate the final volume of diluted dye by multiplying the number of required wells by 5 (volume in μ L that will be used on each well).*
2. Resuspend the cell in 95 μ L of **PBS** and add 5 μ L of the diluted dye into each well.
 - *Final dilution of 1:800 – 1:1000 for the dye on each well*
3. Mix and incubate for 30min on ice protected from light

Intracellular staining

1. Add 100 μ L of cold **PBS+0.5%HS** to each well and wash (1500rpm, 4min, 4°C). Wash the cells one more time with cold **PBS+0.5%HS**.

2. Resuspend in 50 μ L Cytotfix/Cytoperm. Mix well.
3. Incubate for 20 min on ice.
4. Prepare the cocktail of antibodies in **max buffer** that will be use after **Perm/Wash** washing.
 - *Prepare the antibody cocktail in cold Perm/Wash buffer. Keep stocks and antibody cocktail on ice.*
 - *Calculate the final volume of antibody cocktail by multiplying the number of required wells by 20 (volume in μ L that will be use on each well).*
5. Wash 2x (2000rpm, 4min, 4 $^{\circ}$ C) with cold **Perm/Wash** (1:10 dilution with H₂O).
 - *As fixed cells are lighter, increase the speed of the centrifuge.*
6. Add 20 μ L/well of the antibody cocktail. Resuspend by tapping the bottom of the well.
7. Incubate 30min on ice protected from light.
8. Add 180 μ L of **Perm/Wash** after staining and spin down at 1500rpm, 4min, 4 $^{\circ}$ C.
9. Wash 2x with 200 μ L **max buffer** at 2000rpm, 4min, 4 $^{\circ}$ C.
10. Resuspend in 60 μ L of **max buffer**
11. Transfer the samples into small FACS tubes. Read them at the Flow Cytometer.