

Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá

Reference values of the natural killer cells (NK and NKT) on blood donors in Bogota

FRANCIA ROJAS-PANDALES, NATALIA BOLAÑOS, MARCELA MERCADO,
JOHN MARIO GONZÁLEZ, ADRIANA CUÉLLAR • BOGOTÁ, D.C.
CATHERINE CIFUENTES-ROJAS • TEXAS (EUA)

Resumen

Introducción: las células asesinas naturales (NK y NKT) son una población de linfocitos que circulan en bajos porcentajes en sangre periférica. Ambos tipos de células realizan un papel importante en la respuesta inmune en condiciones normales o en procesos patológicos como ciertos tumores, abortos espontáneos y en el rechazo a trasplantes, lo cual les confiere un gran interés clínico.

Objetivo: el presente trabajo pretende establecer valores para las células NK y NKT por medio de citometría de flujo en una población adulta de donantes de un banco de sangre de Bogotá.

Metodología: se recolectaron 104 muestras de donantes y se realizó un estudio con los marcadores CD3, CD16 y CD56.

Resultados: de las muestras 47.2% fueron mujeres y 52.8% hombres. Para las mujeres el porcentaje de células fue: NK 14.6% (\pm 12.1) y NKT 3.0% (\pm 2.5); para hombres NK 25.3% (\pm 21.3) y NKT 3.5% (\pm 2.9). Los valores absolutos de células para mujeres fueron NK 298.8 / μ L (\pm 253.9) y NKT 70.1 / μ L (\pm 47.7); para hombres NK 526.1 / μ L (\pm 448) y NKT 95.5 / μ L (\pm 77). Existe una diferencia estadística entre los valores absolutos par las células NK entre hombres y mujeres ($p=0.0004$). (*Acta Med Colomb 2007; 32: 124-128*)

Palabras clave: citometría de flujo, poblaciones de linfocitos.

Abstract

Introduction: the natural killer cells (NK y NKT) are a population of lymphocytes that circulate in the peripheral blood but in low percentages. Both types of cells play an important role in immune response under normal conditions or in pathological processes as it is the case of certain tumors, spontaneous abortions and transplant rejections, what makes them very interesting from the clinical interest point of view.

Objective: the aim of this work is to establish values for NK and NKT cells by means of flow cytometry in a group of adult population of blood donors in a blood bank in Bogotá.

Methodology: 104 donor samples were collected and a study was carried out with CD3, CD56 and CD16 markers.

Results: 47.2% of the samples were women and 52.8% men. In the case of women the cells percentage was: NK 14.6% (\pm 12.1) and NKT 3.0% (\pm 2.5); for men NK 25.3% (\pm 21.3) and NKT 3.5% (\pm 2.9). The absolute cells values for women were NK 298.8 / μ L (\pm 253.9) and NKT 70.1 / μ L (\pm 47.7); for men NK 526.1 / μ L (\pm 448) and NKT 95.5 / μ L (\pm 77). There is a statistical difference between the absolute values by the NK cells between men and women. ($p=0.0004$). (*Acta Med Colomb 2007; 32: 124-128*)

Key words: flow cytometry, lymphocytes population

Francia Rojas-Pandales: Bacterióloga, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.; Catherine Cifuentes-Rojas: Department of Biochemistry and Biophysics, Texas A&M University, Texas, USA; Natalia Bolaños: Unidad de Citometría de Flujo; Marcela Mercado: Grupo de Enfermedades Infecciosas; John Mario González: Grupo de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá D.C.; Adriana Cuéllar: Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. Correspondencia: Adriana Cuéllar M.Sc., Carrera 7 N° 43-82, Bogotá D.C., Teléfono: 3208320, extensión 4072, Fax: 3208320, extensión 4021. E-mail: acuellar@javeriana.edu.co Recibido: 08/V/07 Aceptado: 04/VII/07

Introducción

Las células asesinas naturales o comúnmente denominadas células NK (del inglés natural killer cells) pertenecen al linaje linfoide, pero a diferencia de los linfocitos T no expresan CD3 en la membrana celular y no sufren el proceso de selección a nivel del timo. Esta población es importante en la respuesta celular de la inmunidad innata (1, 2). Estas células tienen la capacidad de producir lisis en células tumorales y células infectadas con virus o parásitos intracelulares a través de mecanismos citotóxicos mediados por moléculas preformadas como la perforina y fragmentinas (3, 4). Igualmente, tienen la capacidad de secretar citocinas como interferones tipos I y II (5). Las células NK carecen del receptor de linfocitos T (RCT) o de receptor de linfocitos B (RCB), además no tienen marcadores de linaje linfoide T o B (6). Los linfocitos NK expresan la molécula CD16 o receptor para la fracción cristalizable (FC) de las inmunoglobulinas (FC γ RIIIa) y el CD56 o marcador de adhesión celular neuronal (NCAM), los cuales son utilizados para su detección por citometría de flujo (6, 7). Existe un grupo de células NK que se caracterizan por la presencia de marcadores típicos de linfocito T como CD3 y RCT, pero con un polimorfismo restringido de la región variable del RCT. Esta población celular es conocida como células NKT y presentan algunas características y funciones diferentes a las células NK o los linfocitos T (8).

Las células NK cumplen su función de vigilancia inmune por medio de una serie de receptores específicos conocidos como NKR (natural killer receptors). En humanos, los más estudiados son el CD94 y la familia de la molécula NKG2 (6). Estos receptores reconocen moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en la superficie de las células. La ausencia o baja expresión del CMH de clase I, inicia una serie de eventos de activación de células NK que terminan con la lisis de la célula blanco (1, 8). Los valores de células NK se pueden encontrar alterados en diversas condiciones fisiológicas como el ejercicio (9, 10), embarazo (11) y patológicas como abortos espontáneos (12), infección por VIH (13), tumores (14), entre otras condiciones.

A pesar de su utilidad en la clínica, los estudios para definir la distribución de células NK y NKT en la población colombiana son inexistentes, por lo cual no es posible comparar con otras poblaciones a nivel mundial (15-20). Por todo lo anterior, en este trabajo se determinan los valores de estas células usando los marcadores CD3, CD16 y CD56 mediante citometría de flujo en una población adulta de Bogotá donantes de un banco de sangre.

Material y métodos

Tipo de estudio, población y tamaño de la muestra

Este es un estudio descriptivo donde se determinaron los valores de células NK y NKT. Se evaluaron adultos sanos que cumplieron con los requisitos para ser donantes de

sangre y establecidos por el Banco de Sangre del Hospital San Ignacio de Bogotá, el cual se rige bajo las normas de la FDA (*Food and Drug Administration*), y de la AABB (*American Association of Blood Banks*). Previa identificación de los individuos que cumplieron los criterios de inclusión (adultos, donante apto y recuento de leucocitos entre 4.000 y 10.000), se les informó del estudio y aquellos individuos que manifestaron su deseo de participar firmaron un informe de consentimiento escrito aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana. Como tamaño de la muestra se seleccionaron 104 individuos de un total de 150 muestras.

Muestra de sangre periférica

De la bolsa de sangre mezclada y homogenizada en una balanza electrónica (Compomixer), se obtuvo una muestra de 3 mL de sangre anticoagulada para marcar y analizar por citometría de flujo.

Anticuerpos y marcadores para citometría de flujo

Se utilizó el sistema TriTEST® que contiene los anticuerpos monoclonales específicos para CD3/CD16+CD56/CD45 (Becton Dickinson, San José, CA); el anticuerpo anti-CD3 marcado con fluoresceína (FITC), el anti-CD16+CD56 ficoeritrina (PE) y anti CD45 marcado con proteína perinidina clorofila (PerCP). Como controles se utilizaron los isotipos IgG1 con FITC e IgG2b con PE (Becton Dickinson). A cada tubo se adicionaron 50 μ l de sangre total anticoagulada más 5 μ l de anti-CD3 FITC/ anti-CD16+CD56 PE/CD45PerCP, se incubaron a 4°C por 30 min en oscuridad. Posteriormente, se lisaron los glóbulos rojos con 500 μ l de solución de lisis 1X (Facs Lysing Solution, 10X, Becton Dickinson) y se incubaron por 15 min en oscuridad. Posterior al lavado con solución de fosfatos (PBS), se centrifugó 5 min a 2.500 rpm. Se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por 15 min. Finalmente, las células fueron resuspendidas y fijadas con 500 μ l de PBS 1X para formaldehído 0,05% para ser adquiridas en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

Adquisición y análisis de las muestras

La muestra de sangre se analizó en tubos TruCOUNT (Becton Dickinson), los cuales contienen un número conocido de perlas. Para la adquisición y el análisis se utilizó el programa MultiSet (Becton Dickinson) y se siguieron las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (21). El número total de eventos adquiridos fue de 5.000 en la región de menor tamaño y menor complejidad interna que corresponden a las características morfológicas de los linfocitos. El análisis se hizo utilizando diagramas de puntos, con base en la expresión de los marcadores CD45 para separar leucocitos y luego la expresión conjunta de CD3 y CD16 + CD56. Las células que se clasificaron como células NK: CD3^{neg} y CD16+CD56^{pos}, NKT CD3^{pos} y CD16+CD56^{pos}.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Stata 6.0. La media y la desviación estándar fueron calculados para cada marcador. Se analizó la distribución normal de cada variable con la prueba de Shapiro-Wilk.

Los valores de referencia para datos con distribución normal fueron establecidos con la media ± 2 desviaciones estándar (DS) y para distribuciones no normales el rango se determinó con la mediana y los percentiles 2.5 y 97.5%. La diferencia entre los rangos de hombres y mujeres fue analizada con la prueba de Wilcoxon a una significancia de 5%.

Resultados

Análisis descriptivo de la población

Se recolectaron 104 muestras de sangre de donantes voluntarios, entre los 18 y 58 años, que asistieron al Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio en Bogotá. Del total de las muestras 49 (47.2%) correspondían a hombres, 55 (52.8%) a mujeres. El análisis por edad mostró que los hombres presentaron un promedio de 25 años (± 6.4) y las mujeres un promedio de 24 años (± 5.5).

Valores de células NK

La población de células NK fue estudiada en la región de las células mononucleares con alta expresión del marcador CD45 (Figura 1A). Posterior a la selección de la población se determinó la presencia de los marcadores CD3 y en forma conjunta CD16+CD56. El porcentaje de células NK se seleccionó por el panel CD3^{neg} y CD16+CD56^{pos} (Figura 1B). Para la obtención de los números absolutos se utilizó la fórmula dada por el fabricante basada en la relación con el conteo de perlas contenido en cada tubo. Con relación al

porcentaje, la media en hombres 25.3% (± 21.3) fue mayor que en mujeres 14.6% (± 12.1), pero esta diferencia no tuvo significancia estadística. Sin embargo, al calcular los valores absolutos el número de células por microlitro fue mayor en hombres 526.1 / μ L (± 448) que en mujeres 298.8 / μ L (± 253.9) con una diferencia en el análisis estadístico ($p= 0.0004$).

Valores de células NKT

Para el análisis de las células NKT se utilizó una estrategia similar a la mencionada previamente para las células NK, pero esta población corresponde a la región de los mononucleares que presenta los marcadores CD3^{pos} y CD16+CD56^{pos} (Figura 1B). La población de células NKT es menor que la población NK, su porcentaje es muy similar al comparar hombres y mujeres 3.5 (± 2.9) y 3.0 (± 2.5), respectivamente. Al comparar los valores absolutos se obtuvo para hombres 95.5 / μ L (± 77) y para mujeres 70.1 / μ L (± 47.7) y no se encuentran diferencias estadísticas. Los datos completos sobre los valores de células NK y NKT obtenido, incluyendo los percentiles (2.5 y 97.5) se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Discusión

Las células NK y NKT son importantes como parte de la respuesta inmune celular. Estas células representan otro tipo de linfocitos diferente a los linfocitos B o T (1). Su participación en inmunopatogénesis de algunas enfermedades los convierte en parte importante en el análisis inmune celular de laboratorio clínico (12-13), entre otras aplicaciones.

Las células NK de la interfase maternofoetal tienen una función primordial en la patogénesis de la preeclampsia, enfermedad específica del embarazo que es una importante

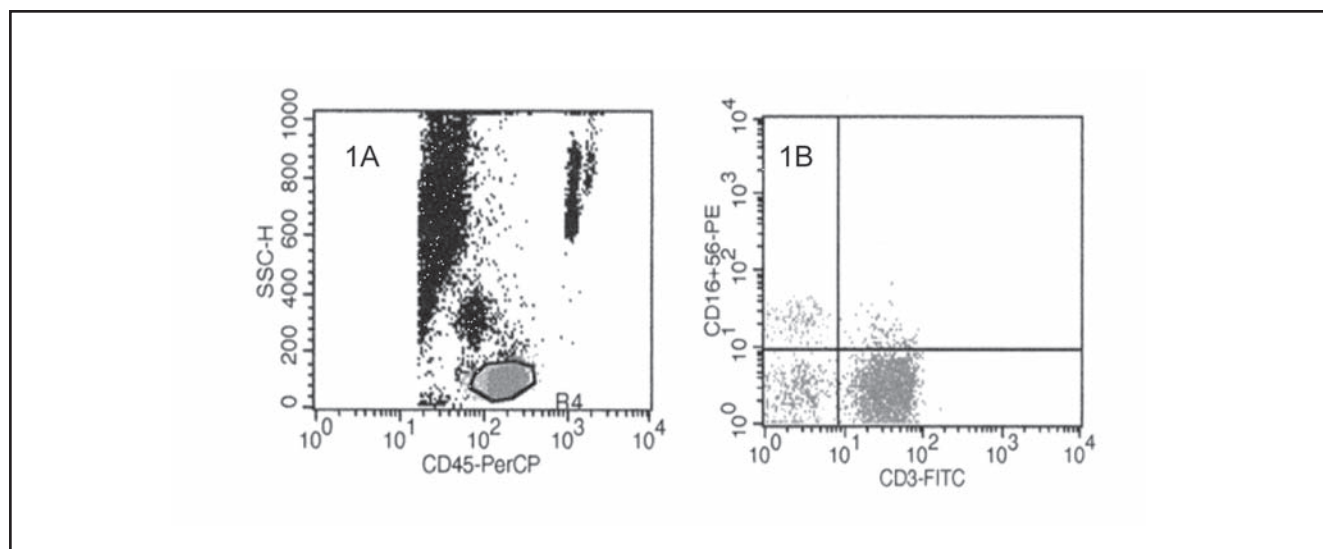


Figura 1. Análisis de las muestras por citometría de flujo. A) Gráfico de puntos de complejidad interna o SSC (eje Y) versus expresión de CD45 (eje X), R4 representa la región de análisis que corresponde a los mononucleares donde se ubican los linfocitos. B) Gráfica de puntos dividida en cuatro cuadrantes basados en el control de isotipo FITC y PE. La expresión conjunta de CD16+CD56 PE se observa en el eje de las Y, mientras que la expresión de CD3 FITC se observa en el eje de las X. El cuadrante superior izquierdo CD3^{neg}/ CD16+56^{pos} corresponde a las células NK y el cuadrante superior derecho CD3^{pos}/ CD16+56^{pos} corresponde a las células NKT.

Tabla 1. Valores de células NK y NKT en adultos de Bogotá.

		NK			NKT		
		Media	DS	Percentiles (2.5-97.5)	Media	DS	Percentiles (2.5-97.5)
Mujeres	%	14.6	12.1	4.2 - 68.7	3.0	2.5	0.0 - 11.3
	/ μ l	298.8	253.9	81.8 - 1,390.6	70.1	47.7	2. - 209.8
Hombres	%	25.3	21.3	1.3 - 90.1	3.5	2.9	0.1 - 11
	/ μ l	526.1	448	24 - 1853	95.5	77	2.1 - 323.1

causa de morbilidad y mortalidad maternofetal (22). En enfermedades infecciosas, se ha mostrado, por ejemplo, que la expansión de esta población en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), precede el desarrollo de inmunidad adaptativa por parte de células T CD8+ durante la infección aguda (23), por lo cual el estudio de esta población parece ser un indicador de seguimiento de la progresión de la enfermedad.

Las NKT son células multifuncionales las cuales pueden mejorar la inmunidad contra microorganismos, eliminación de los tumores, supresión de enfermedades autoinmunes y promover tolerancia. Parte de sus funciones dependen del reconocimiento de lípidos presentados por parte de la molécula CD1, además de su interacción con células dendríticas. La actividad de las NKT puede estar aumentada en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes, alergias y aterosclerosis (24).

Adicionalmente, el conocimiento de las células NK y NKT en diferentes condiciones patológicas ha permitido proponer la utilización de estas células solas o en combinación con otras modalidades de tratamiento de algunos tipos de cáncer (25-27).

Dada la importancia de la participación de estas células en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos y en la respuesta inmune involucrada en diferentes patologías, en este estudio se determinaron los valores de células NK y NKT de adultos donantes de sangre en un banco de sangre de Bogotá. Se estudiaron sólo estas poblaciones ya que previamente se obtuvieron valores para los linfocitos T (28). Estudios de los valores de linfocitos T y células NK muestran variaciones según raza y ubicación geográfica (20). Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a valores reportados alrededor del mundo.

Un estudio multicéntrico en Italia mostró que la media de los valores de la población adulta analizada para células NK fue de 13.15% (rangos 4 - 28) y valores absolutos de 278 μ L (rangos de 73 - 654). Sin embargo, al hacer el análisis por género se encontró que las medias de los valores de los linfocitos NK en hombres fue de 13.9% (293 μ L), mientras que en mujeres fue de 12.1% (259 μ L); estas diferencias fueron significativas desde el punto de vista estadístico.

En el estudio mencionado, variables como sobrepeso y ejercicio no tuvieron inferencia en los valores (16). En

población caucásica norteamericana los valores de células NK presentan un rango de 6 a 29% (18). Valores similares para células NK son encontrados en población adulta de Bélgica (15). En América Latina existe un estudio en población mexicana que muestra una media del porcentaje de células NK de 17.4% (\pm 5.6) con rangos del 8 al 33% (19). Las variaciones de las células NK en este estudio comparando géneros demuestra una diferencia igualmente importante entre los valores entre hombres y mujeres. De forma interesante, en un estudio comparativo de niveles de linfocitos en población italiana y filipina, se determinó que los filipinos tenían mayores niveles de células NK que los italianos tanto en porcentajes (30.99% \pm 10.61 versus 11.69% \pm 4.71, respectivamente) como en valores absolutos en microlitos (756.4 μ L \pm 280.7 versus 230.6 μ L \pm 108.4, respectivamente (17).

Los resultados obtenidos para células NKT no muestran diferencias entre hombres y mujeres y no existen estudios similares para ser comparados con nuestra población.

La evidencia clínica y experimental sugiere que la respuesta inmune está influenciada por el género. Es así como se ha observado que los monocitos y linfocitos de las mujeres tienen una mayor actividad de presentación de antígenos y respuesta mitogénica, respectivamente. Además, se encuentra una mayor producción de anticuerpos tanto en la respuesta primaria como secundaria en las mujeres que en los hombres (29). Este hecho y las diferencias encontradas en parámetros inmunológicos en las diferentes poblaciones, hace necesario validar rangos y referencias locales para nuestra población.

Referencias

- Moretta L, Ciccone E, Poggi A, Mingari MC, Moretta A. Ontogeny, specific functions and receptors of human natural killer cells. *Immunol Lett* 1994; **40**: 83-8.
- Shibuya A. Development and functions of natural killer cells. *Int J Hematol* 2003; **78**: 1-6.
- Hiserodt JC, Britvan LJ, Targan SR. Characterization of the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer (NK) lymphocyte: resolution into binding, programming, and killer cell-independent steps. *J Immunol* 1982; **129**: 1782-7.
- Young JD, Hengartner H, Podack ER, Cohn ZA. Purification and characterization of a cytolitic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 1986; **44**: 849-59.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 189-220.
- Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant

- A, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 13224-9.
7. Schlesinger M, Lew F, Bekesi JG. Surface antigen determinants in subpopulations of peripheral blood NK- and T-cells separated by Percoll density fractionation. *J Clin Lab Immunol* 1984; **13**: 195-202.
 8. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; **21**: 573-83.
 9. Edwards AJ, Bacon TH, Elms CA, Verardi R, Felder M, Knight SC. Changes in the populations of lymphoid cells in human peripheral blood following physical exercise. *Clin Exp Immunol* 1984; **58**: 420-7.
 10. Kendall A, Hoffman-Goetz L, Houston M, MacNeil B, Arumugam Y. Exercise and blood lymphocyte subset responses: intensity, duration, and subject fitness effects. *J Appl Physiol* 1990; **69**: 251-60.
 11. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, et al. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997; **37**: 368-77.
 12. Gilman-Sachs A, DuChateau BK, Aslakson CJ, Wohlgenuth GP, Kwak JY, Beer AE, et al. Natural killer (NK) cell subsets and NK cell cytotoxicity in women with histories of recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1999; **41**: 99-105.
 13. Margolick JB, Scott ER, Odaka N, Saah AJ. Flow cytometric analysis of gamma delta T cells and natural killer cells in HIV-1 infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; **58**: 126-38.
 14. Tursz T, Dokhelar MC, Lipinski M, Amiel JL. Low natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma. *Cancer* 1982; **50**: 2333-5.
 15. Gratama JW, Kraan J, Van den Beemd R, Hooibrink B, Van Bockstaele DR, Hooijkaas H. Analysis of variation in results of flow cytometric lymphocyte immunophenotyping in a multicenter study. *Cytometry* 1997; **30**: 166-77.
 16. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, et al. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* 1999; **84**: 499-504.
 17. Pasqualetti D, Ghirardini A, Cafolla A, Biffoni M, Coluzzi S, Vaglio S, et al. Lymphocyte T subsets and natural killer cells in Italian and Philippino blood donors. *Vox Sang* 2003; **84**: 68-72.
 18. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, Totterman T, Lydyard P, Yuksel F, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; **60**: 190-208.
 19. Ortiz R, Cortés L, González C, Cortés E, Betancourt M. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos. Estudio por citometría de flujo. *Bioquímica* 1999; **24**: 18-22.
 20. Choong ML, Ton SH, Cheong SK. Influence of race, age and sex on the lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy Malaysian adults. *Ann Clin Biochem* 1995; **32**: 532-9.
 21. Calvelli T, Denny TN, Paxton H, Gelman R, Kagan J. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. *Cytometry* 1993; **14**: 702-15.
 22. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and human pregnancy an inflammatory view. *Trends Immunol* 2006; **27**: 399-404.
 23. Alter G, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, et al. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2007; **195**: 1452-60.
 24. Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 505-18.
 25. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 329-39.
 26. Sentman CL, Barber MA, Barber A, Zhang T. NK cell receptors as tools in cancer immunotherapy. *Adv Cancer Res* 2006; **95**: 249-92.
 27. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 354-64.
 28. Barrero S, Cuéllar A, Rueda NS, Cardozo C, González JM. Determinación de valores de linfocitos T CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ por citometría de flujo en donantes de sangre, adultos de Bogotá. *Acta Med Colomb* 2001; **26**: 280-85.
 29. Zandman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y. Gender and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2007; **6**: 366-72.