

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**Universidad  
Zaragoza**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

**Proyecto Máster**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS  
NATURAL KILLER. IMPLICACIÓN EN SENESCENCIA DEL  
SISTEMA INMUNE Y ARTRITIS REUMATOIDE.**

Presentado por:

Ana B. Martínez Martínez

Directores:

Dr. Luis Martínez Lostao

Dr. Felícito García-Álvarez García



## UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

### Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

---

D. Luis Martínez Lostao, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y D. Felícito García-Álvarez García, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Asociado en Ciencias de la Salud del Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Zaragoza,

#### CERTIFICAN:

Que el Proyecto Máster **“Caracterización fenotípica y funcional de células Natural Killer. Implicación en senescencia del sistema inmune y artritis reumatoide”**, ha sido realizado por la Licenciada en Bioquímica Ana Belén Martínez Martínez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección, y que reúne a su juicio, las condiciones requeridas para optar al título de Máster en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Septiembre de 2012

Fdo: D. Luis Martínez Lostao

Fdo: D. Felícito García-Álvarez García



# INDICE

---

<b>1. Antecedentes y objetivos .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>4</b>
2.1. <i>Biología de las Natural Killer (NK)</i> .....	4
2.1.1. Descripción general de las células NK .....	4
2.1.2. Receptores de activación/inhibición de las células NK .....	6
2.1.3. Mecanismos de activación de las células NK .....	9
2.1.4. Mecanismos efectores de las células NK .....	10
2.2. <i>Senescencia del Sistema Inmune (Inmunosenescencia)</i> .....	12
2.2.1. Papel de las NK en la inmunosenescencia .....	14
2.3. <i>Artritis Reumatoide (AR)</i> .....	17
2.3.1. Papel de las NK en AR .....	17
<b>3. Metodología .....</b>	<b>19</b>
3.1. <i>Pacientes incluidos en el estudio</i> .....	19
3.2. <i>Obtención y purificación de células mononucleares de sangre periférica humana</i> .....	20
3.3. <i>Separación magnética de células NK</i> .....	21
3.4. <i>Obtención y purificación de células mononucleares de líquido sinovial</i> .....	22
3.5. <i>Cultivos celulares</i> .....	23
3.5.1. Congelación y descongelación de las líneas celulares .....	23
3.5.2. Determinación de la viabilidad celular .....	24

3.6. Estudio inmunofenotípico de las células NK .....	25
3.7. Estudio de citotoxicidad de las células NK .....	26
3.7.1. Citometría de flujo .....	29
3.8. Análisis de los resultados .....	30
<b>4. Resultados .....</b>	<b>31</b>
4.1. Estudio comparativo de las células NK según la edad .....	31
4.1.1 Estudio fenotípico de las células NK en sangre periférica según la edad .....	31
4.1.2 Estudio citotóxico de las células NK en sangre periférica según la edad .....	36
4.2. Estudio comparativo de las células NK de sangre periférica y líquido sinovial .....	38
4.2.1 Estudio comparativo del fenotipo de las células NK de sangre periférica y líquido sinovial .....	38
4.2.2 Estudio comparativo de la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica y líquido sinovial .....	42
4.3. Estudio comparativo de la citotoxicidad de las células NK en artritis reumatoide .....	43
<b>5. Discusión .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>50</b>

# 1. Antecedentes y objetivos

La inmunosenescencia se ha definido como un estado de desregulación de la función del sistema inmune con el aumento de la edad y que contribuye a un incremento de la susceptibilidad a infecciones, cáncer y trastornos autoinmunes (1).

Las células NK forman parte del sistema inmune innato y juegan un papel importante en la defensa frente a las infecciones principalmente víricas y frente a tumores (2, 3).

Diversos trabajos se han centrado en el estudio de las alteraciones producidas por la edad en las células NK, en lo referente a distintos parámetros relacionados con esta población celular: número absoluto de células presentes en sangre periférica, capacidad citotóxica y expresión de diversas moléculas de superficie relacionadas con su función (4-7).

En lo referente al número total de células NK, diversos estudios han encontrado un número elevado de estas células con la edad (8, 9).

Respecto a la capacidad citotóxica de las células NK, aunque se ha descrito que las células NK parecen mantener dicha capacidad con la edad, una redistribución de las subpoblaciones presentes dentro de las células NK (citotóxica y secretora) a favor de la subpoblación citotóxica, podría enmascarar una menor capacidad de las células NK de lisar a las células diana en *individuos mayores* (10-12). Sin embargo, otros trabajos han descrito una disminución de la actividad de las células NK conforme aumenta la edad (13-15).

También se ha analizado la expresión de diversas moléculas de superficie de las células NK. En lo que se refiere a los receptores de tipo KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*), los resultados son discrepantes describiéndose tanto un aumento de estos receptores (16) como una disminución de su función con la edad (12).

Trabajos previos de nuestro grupo han encontrado una correlación directa entre el porcentaje de células NK en sangre periférica y la edad en pacientes con fractura de cadera (17). Sin embargo, la valoración de distintos parámetros de la respuesta inmunológica a nivel sistémico no siempre representa la respuesta

inmunológica local generada en un determinado lugar del organismo, en este caso en la articulación afectada. Entendiendo el papel que juegan las células NK en la zona afectada se podrían diseñar estrategias para prevenir o tratar el daño producido (18).

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por una hiperplasia sinovial y una inflamación crónica articular que lleva a la destrucción del cartílago y del hueso (19). La implicación del sistema inmune en su patogénesis, no sólo los factores solubles sino también las interacciones célula-célula contribuyen a la progresión de la enfermedad promoviendo la destrucción articular (20). En lo referente al papel de las células NK en la AR, los datos en la actualidad son contradictorios atribuyéndoles tanto un papel regulador como patogénico en esta enfermedad (21).

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar diversos parámetros característicos de las células NK (expresión de diversas moléculas de superficie y capacidad citotóxica) y su variación con la edad, así como estudiar dichos parámetros en paralelo en muestras de sangre periférica y de líquido sinovial para analizar las posibles diferencias en la actividad y el fenotipo de las células NK a nivel sistémico y a nivel local. Para ello, se han realizado estudios inmunofenotípicos de las células NK así como ensayos de citotoxicidad con dichas células NK frente a la línea celular K562 (diana natural de las células NK) en muestras de pacientes candidatos a cirugía ortopédica del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

## **OBJETIVOS**

- 1) Analizar la expresión de diversas moléculas de superficie características de las células NK procedentes de muestras de sangre periférica de pacientes candidatos a cirugía ortopédica y estudiar su relación con la edad.
- 2) Analizar la capacidad citotóxica de las células NK procedentes de muestras de sangre periférica de pacientes candidatos a cirugía ortopédica y estudiar su relación con la edad.



- 3) Estudiar las posibles diferencias en la expresión de diversas moléculas de superficie características de las células NK de sangre periférica y de líquido sinovial de pacientes candidatos a cirugía ortopédica.
- 4) Estudiar las posibles diferencias en la capacidad citotóxica de las células NK de sangre periférica y de líquido sinovial de pacientes candidatos a cirugía ortopédica.

## 2.Introducción

### 2.1. Biología de las Natural Killer

En este apartado se va a introducir la biología de las células *Natural Killer* (NK). En primer lugar se realizará una descripción de dichas células y de sus características principales. A continuación trataremos los receptores de activación/inhibición de estas células, y finalizaremos detallando los mecanismos tanto de activación como efectores, de las células NK.

#### 2.1.1. Descripción general de las células NK

Las células *Natural Killer* (NK) constituyen la tercera estirpe de células tipo linfoide. Se encuentran presentes en sangre, médula ósea y bazo, y en muy poca proporción en los ganglios linfáticos. Las células NK junto con los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares forman parte de la primera barrera defensiva del sistema inmune (respuesta innata) siendo muy importante en la respuesta frente a las infecciones (sobre todo virales) y frente a tumores (2, 3). Intervienen tanto en la respuesta innata como células efectoras, como en la respuesta adaptativa produciendo citocinas y quimiocinas que regulan el sistema inmune y el proceso inflamatorio.

Morfológicamente las células NK son grandes y contienen gránulos azurofílicos ricos en enzimas con capacidad citolítica. Su desarrollo tiene lugar en la médula ósea aunque hay evidencias de que podría darse también en los ganglios linfáticos (22). Las células NK constituyen normalmente un 10-15% de los linfocitos circulantes en sangre periférica y un 5% de los linfocitos presentes en los tejidos linfoides.

Las células NK maduras están caracterizadas por la expresión de CD56, CD16 (receptor de baja afinidad de la fracción Fc de la IgG: FcγRIIA), CD57 (un determinante antigénico oligosacárido) y CD2 (una molécula de adhesión capaz de aglutinar hematíes de cordero) (23). A diferencia de los linfocitos T y B, las células NK carecen de TCR (*T cell receptor*) y de inmunoglobulinas de membrana (**Tabla 1**). Entre

los marcadores citados, algunos de ellos como CD16 (Fc gamma RIII), CD56 y CD94 definen las distintas subpoblaciones de NK (24).

Entre estas subpoblaciones de NK CD56+ cabe destacar las siguientes:

- CD56 bright (CD56<sup>bright</sup>): con una marcada expresión de CD56 pero una baja expresión de CD16, esta subpoblación tiene una mayor capacidad para producir citocinas pero una menor capacidad citotóxica y es más abundante en tejidos.
- CD56 dim (CD56<sup>dim</sup>): con una expresión de CD56 más baja que la anterior pero una marcada expresión de CD16, esta subpoblación tiene menor capacidad para producir citocinas pero una mayor capacidad citotóxica y es más abundante en sangre periférica.

**Tabla 1.** Fenotipo predominante en células NK.

CARÁCTER	MOLÉCULA
Presentes en NK:	CD16, CD56, CD57 y CD94
Compartidos con Linfocitos B y T:	CD2, CD3(z), CD7, CD11a, CD11b, CD26, CD27, CD43 y CD45
Ausentes:	CD3, CD4, CD14, CD19, CD20 y CD31
Asociados a activación:	CD69 y CD25

En cuanto a la actividad de las células NK, éstas tienen dos funciones principales:

1. Función citotóxica.
2. Función secretora.

- 1) Las células NK realizan su función citotóxica mediante la identificación de las células diana a través del reconocimiento de receptores específicos. Las células NK poseen receptores de activación y receptores de inhibición, de forma que la muerte de la célula diana se producirá según el balance entre moléculas de activación y de inhibición que exprese (Teoría del *Missing Self*) (25). También intervienen en este mecanismo ciertas citocinas y moléculas de adherencia que facilitan el contacto celular. A través de dicha acción citolítica las células NK pueden destruir tanto células alogénicas como infectadas por virus o tumores (26).

- 2) Las células NK tienen también una importante función secretora en el sistema inmune. Sintetizan y liberan cierto tipo de citocinas que influyen tanto en la acción de las propias NK así como en otras funciones como es la hematopoyesis.

Las principales citocinas producidas son: TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), IFN- $\gamma$  (*interferon gamma*), IL (*interleukin*)-3, GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) que se liberan como consecuencia de la activación de las células NK al interactuar con la célula diana, bien de forma directa o a través de otras citocinas como la IL-2 o la IL-12 (27).

Las células NK también pueden producir quimiocinas como MIP (*macrophage inflammatory protein*)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP (*monocyte chemotactic protein*)-1, 2, 3 y RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) de gran importancia en los fenómenos inflamatorios (28).

### 2.1.2. Receptores de activación/inhibición de las células NK

Tanto en el caso de que las células NK realicen su acción citotóxica como secretora es necesaria la interacción de sus receptores con la célula diana. La acción final de las células NK dependerá del equilibrio entre las señales inhibitorias y activadoras procedentes de los receptores de su superficie (**Tablas 2 y 3**).

**Tabla 2.** Tipos de receptores de inhibición presentes en células NK. Ahern DJ, Brennan FM. *Immunology Letters*, 2011; 136: 115-121.

Inhibitory NK cell receptors and their ligands

	Receptor	Ligand
KIR family	2DL1 (CD158a)	Group 2 HLA-C
	2DL2/3 (CD158b)	Group 1 HLA-C
	2DL5	Unknown
	3DL1	HLA-B and Bw4
	3DL2	HLA-A3/A11
C-type lectin-like receptors	NKG2A (CD94/CD159a)	HLA-E
	NKR-P1A (CD161)	LLT1
LIR/ILT family	LILRB1/LIR-1/IL-T2 (CD85j)	HLA-A, -B, -C
Others	CEACAM1	CEACAM1
	KLRG-1/MAFA	E-, N-, P-cadherin
	LAIR1	Collagen
	Siglec-7 (CD328)	Sialic acid
	Siglec-9 (CD329)	Sialic Acid
	IRp60 (CD300a)	Unknown

HLA, human leukocyte antigen; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; LIR/ILT, leukocyte immunoglobulin-like receptor/immune-globulin-like transcript.

**Tabla 3.** Tipos de receptores de activación presentes en células NK. Ahern DJ, Brennan FM. *Immunology Letters*, 2011; 136: 115-121.

Activating NK cell receptors and their ligands

	Receptor	Ligand
KIR family	2DS1	Group 2 HLA-C
	2DS2	Group 1 HLA-C
	2DS3	Unknown
	2DS4	HLA-Cw4
	2DS5	Unknown
	2DL4 (CD158d)	HLA-G (soluble)
	3DS1	Unknown
C-type lectin-like receptors	NKG2C (CD94/CD159c)	HLA-E
	NKG2D (CD314)	MICA, MICB, ULBPs
	NKG2E	HLA-E
Natural cytotoxicity receptors	NKp30 (CD337)	BAT-3
	NKp44	Viral Haemagglutinin
	NKp46 (CD335)	Viral Haemagglutinin
Integrins	LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1-5
	MAC-1 (CD11b/CD18)	ICAM-1, iC3b, fibrinogen
	CD11c/CD18	ICAM-1, iC3b
	VLA-4 (CD49d/CD29)	VCAM-1, fibronectin
	VLA-5 (CD49e/CD29)	Fibronectin
	2B4 (CD244)	CD48
	CD16 (FcγRIIIA)	IgG
Others	DNAM-1 (CD226)	PVR (CD155), CD112
	CRACC (CD319)	CRACC (CD319)
	NTB-A	NTB-A
	BY55 (CD160)	HLA-C
	CD2	LFA-3 (CD58)
	CD7	SECTM1, Galectin
	CD44	Hyaluronan
	CD59	C8, C9

HLA, human leukocyte antigen; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor.

Entre los receptores de activación destacan fundamentalmente CD16 (FcR), aunque también CD80, CD43 y los llamados receptores de citotoxicidad natural (NKp30, NKp44 y NKp46).

Entre los receptores de inhibición destacan los receptores NK específicos de moléculas de HLA (*human leukocyte antigen*) de clase I. Estos receptores constituyen un grupo heterogéneo de glicoproteínas que pertenecen a distintas familias y que se expresan no sólo en células NK sino también en ciertos tipos de linfocitos.

Las principales familias de receptores son:

- Receptores NK tipo KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*). Pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Pueden ser de tipo inhibidor o de tipo activador si se asocian de manera covalente a la molécula adaptadora DAP-12. Su distribución no es homogénea y cada clon de células NK puede expresar uno o varios tipos de estos receptores.
- Receptores NK tipo ILT (*immunoglobulin like transcripts*). Son receptores de moléculas de HLA de clase I pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas y también denominados LIR (*leukocyte Ig like-receptor*). Tienen una distribución extensa no solo en células NK sino también en monocitos y ciertas células polimorfonucleares. Algunos reconocen moléculas HLA-G y la proteína UL-18 (*human cytomegalovirus class I MHC (MHCI) homolog*).
- Receptores NK tipo lectina. Son heterodímeros formados por la asociación de dos moléculas diferentes con dominio lectina tipo C. La molécula CD94 puede unirse a distintos miembros de la superfamilia de NKG2 (*natural killer cell lectin-like receptor 2A*) (A, B, C, D, E y H). Estos receptores pueden tener función no sólo inhibitoria sino también activadora según la estructura de la parte citoplasmática de sus moléculas (motivos ITIM *-immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-*, para función inhibidora y motivos ITAM *-immunoreceptor tyrosine-based activation motif-*, para función activadora). Estos receptores reconocen moléculas de HLA-E asociadas con péptidos derivados de la secuencia líder de otras moléculas de HLA de clase I y juegan un papel muy importante en los procesos de regulación de la acción de las células NK *in vivo* debido a la extensa distribución de moléculas HLA-E que reconocen y a que están presentes en un amplio número de células NK (60-80%) y ciertos linfocitos T (29, 30).
- Receptores NK de moléculas HLA en otras células. Existen receptores NK específicos de moléculas HLA en estirpes celulares no NK, aunque en menor proporción y densidad. Este es el caso de las NK deciduales (presentes en la decidua) o de las células NKT (presentes en el hígado y con un fenotipo mixto de células NK y linfocitos T), ambas de función no totalmente esclarecida (26). También se ha encontrado este tipo de receptores en linfocitos T, principalmente en los citotóxicos

pero también en los linfocitos T *helper*, lo que sugiere su intervención en los procesos de regulación funcional (secreción de citocinas) además de los procesos citotóxicos (31).

### **2.1.3. Mecanismos de activación de las células NK**

La mayoría de células del organismo expresan moléculas de HLA de clase I, así que la acción inhibidora de los receptores de inhibición al reconocer a su ligando HLA de clase I tiene gran importancia fisiológica ya que previene la destrucción de las células normales del huésped. Cuando una célula deja de expresar moléculas de HLA como en el caso de algunas infecciones virales o transformación tumoral, es cuando puede ser destruida por la acción de las células NK al no poder ser frenada su actividad por los receptores de tipo inhibidor (Teoría del *Missing Self*) (25). La activación de las células NK dependerá del equilibrio entre receptores de activación y de inhibición. También puede ocurrir que no se dé una disminución de expresión de moléculas de HLA de clase I sino un aumento de ligandos de estrés celular que interactúan con los receptores de activación desplazándose el equilibrio hacia la activación de las células NK.

Los mecanismos para llevar a cabo dicha función son lisis natural o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*) (32).

La citotoxicidad natural consiste en la lisis de células de manera espontánea sin la necesidad de un periodo de sensibilización previa. Estas células no requieren de un proceso de aprendizaje previo para la destrucción de células como ocurre en el caso de los linfocitos T citotóxicos, aunque su activación por medio de citocinas o células blanco aumenta su eficiencia (33).

La ADCC implica el reconocimiento de anticuerpos a través de sus extremos Fc por parte de los receptores CD16 presentes en las NK activándose la función lítica de las células NK (29).

Las células NK expresan además ciertas citocinas y receptores de quimiocinas que modulan su capacidad citotóxica y al mismo tiempo secretan citocinas y quimiocinas inmunoreguladoras, las cuales juegan un papel muy importante en la respuesta inmune adaptativa. Se ha demostrado que las citocinas IL-2, IL-12, IL-15, IL-

18 y los IFNs de tipo I promueven la activación y proliferación de células NK incrementando su capacidad citotóxica e induciéndolas a la producción de, entre otras citocinas, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (34). También se ha observado una activación de las células NK a través de quimiocinas como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, 2, 3 y RANTES y como algunos receptores de quimiocinas (CCR2 y CCR5) expresados por células NK favorecen la migración de dichas células a sus células diana, así como su unión a ellas y el reclutamiento de otras células NK (28).

#### **2.1.4. Mecanismos efectores de las células NK.**

Los mecanismos que llevan a la eliminación de las células por parte de las células NK son dos principalmente:

1. Vía de los receptores mortales.
2. Vía de la exocitosis granular.

1) La vía de los receptores mortales o vía extrínseca es un mecanismo de inducción de apoptosis que se activa por la unión de un ligando extracelular a un receptor específico en la superficie de la membrana celular.

Los ligandos mortales pertenecen a la superfamilia del TNF. Algunos de estos ligandos activan vías de señalización implicadas en respuestas proinflamatorias y de diferenciación celular como TNF- $\alpha$ , pero hay otros como FasL (*Fas ligand*) y Apo2L/TRAIL (*Apo2 ligand/TNF-related apoptosis inducing ligand*), que son capaces de inducir la muerte celular mediante apoptosis (35-37). Cada ligando mortal tiene su receptor o receptores mortales específicos. En el caso de FasL, el receptor es Fas/CD95/Apo1, y en el caso de Apo2L/TRAIL los receptores proapoptóticos son TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5. Estructuralmente presentan características similares: son proteínas de membrana de tipo I y poseen entre una y cinco repeticiones de secuencias ricas en cisteína (CRD, *cysteine rich domain*) en su parte extracelular y un dominio mortal (DD, *death domain*) en su región intracelular (38, 39).

El mecanismo de traducción de la señal apoptótica comienza cuando un homotrímero de ligando mortal se une a su correspondiente receptor a través de su



CRD de manera que las regiones intracelulares del receptor adoptan una conformación determinada que hace que recluten a la proteína adaptadora FADD (*Fas associated death domain*) a sus DD (40). Esta proteína contiene dominios mortales (DD) y dominios efectores de muerte (DED, *death effector domain*) que se unen a las procaspasas iniciadoras 8 y 10. A este conjunto formado por el receptor oligomerizado, la proteína adaptadora FADD y las procaspasas iniciadoras 8 y/o 10 se le denomina DISC (*death inducing signalling complex*). Una vez que las procaspasas iniciadoras se unen al DISC se procesan originándose las formas activas de dichas caspasas y se desencadena el mecanismo de apoptosis o muerte celular programada vía caspasas ejecutoras (-3, -6 y -7) o vía mitocondrial mediante el procesamiento de la proteína proapoptótica Bid originándose una forma truncada de dicha proteína (tBid) que es capaz a su vez de inducir la oligomerización de las proteínas proapoptóticas Bak/Bax promoviendo la formación de poros en la membrana permitiendo la liberación desde la mitocondria de factores apoptogénicos como el citocromo c (41).

2) La vía de la exocitosis granular es un mecanismo mediante el cual las células NK producen la muerte de la célula diana a través de la liberación de gránulos citotóxicos que contienen en su interior: perforinas y granzimas (42, 43).

La interacción de las perforinas o citolisinas (proteínas que poseen una cierta homología estructural con el C9 del complemento) con la membrana de la célula diana se establece a través de fosfolípidos que contienen fosfatidilcolina resultando en formación de un canal en la membrana (poro). Este poro tiene una doble función: facilita la muerte de las células diana por osmólisis y provee una puerta de entrada a las otras moléculas efectoras, principalmente las granzimas.

Las granzimas son unas serin proteínas capaces de inducir la apoptosis a través de la activación de las caspasas (vía caspasa 3) (44). Existen distintos subtipos de granzimas teniendo especial importancia en la inducción apoptótica la granzima B (45, 46). Se ha demostrado que la granzima B puede acceder a las células dianas en ausencia de las perforinas, pero en este caso quedan capturadas dentro de vesículas endocíticas sin poder ejercer su efecto apoptótico (47). Este hecho nos demuestra que la actividad apoptótica de la granzima B solo es posible si se encuentra libre en el

citoplasma y si las perforinas pueden actuar para proveerles la puerta de entrada la célula diana.

Además de perforinas y granzimas, los gránulos contienen otras moléculas como TNF- $\beta$  y condroitín sulfato A, un proteoglicano cargado negativamente que resiste a la acción de la proteasas y tiene la aparente función de proteger a la célula NK de la autólisis por sus propios agentes letales (48).

También se ha descrito otro componente de los gránulos citotóxicos de las células NK a través del cual también pueden ejercer su actividad citolítica, la granulicina (49). La granulicina es un péptido de 15kDa con funciones anti-microbianas y anti-tumorales presente solo en humanos y que se ha comprobado que induce apoptosis en células infectadas y tumorales (50).

## **2.2. Senescencia del Sistema Inmune (Inmunosenescencia).**

Se ha definido la inmunosenescencia como un estado de desregulación de la función del sistema inmune observado en muchos organismos (incluido el ser humano) con el aumento de la edad que contribuye a un incremento de la susceptibilidad a infecciones, cáncer y trastornos autoinmunes (6).

El sistema inmune innato está compuesto por un entramado celular que comprende neutrófilos, células NK, células NKT, monocitos, macrófagos y células dendríticas que intervienen en la defensa temprana frente a los patógenos. Con el incremento de la edad, se favorece un ambiente proinflamatorio constitutivo con un grado bajo pero persistente de activación de estas células que puede aumentar el daño tisular ocasionado por las infecciones (1).

La inmunosenescencia en el sistema inmune innato tiene una complejidad considerable, ya que aunque muchas respuestas del sistema inmune innato disminuyen con la edad, hay también evidencias de que se produce una hiperreactividad de las células que componen dicho sistema inmune (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Cambios relacionados con la edad en el sistema inmune innato. Panda A et. al. Trends Immunol, 2009; 30(7): 325–333.

Effect	
NK cells	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Numbers</li> <li>↓ Cytotoxicity</li> <li>Intact antibody-dependent cytotoxicity</li> <li>↓ IL-2-dependent IFN-<math>\gamma</math> and IL-2- and IL-12-induced chemokine production (MIP-1<math>\alpha</math>, RANTES, and IL-8)</li> </ul>
Monocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑, ↓ Or unchanged LPS-induced cytokine production</li> <li>↓ TLR1/2-induced IL-6 and TNF-<math>\alpha</math> production</li> <li>↓ TLR1 and TLR4 surface expression</li> <li>↓ TLR-induced CD80 upregulation</li> <li>↓ DC-SIGN signaling in macrophages (to West Nile virus)</li> <li>↓ Phagocytosis</li> <li>↓ Percentage CD68-positive macrophages in bone marrow</li> </ul>
Dendritic cells	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Or unchanged number or percentage of mDCs</li> <li>↓ Or unchanged number or percentage of pDCs</li> <li>↓ Langerhans cell density in skin</li> <li>Unchanged transendothelial migration, preserved ability of antigen-pulsed DCs to stimulate T-cell proliferation</li> <li>↓ Pinocytosis or endocytosis and impaired chemokine-induced migration</li> <li>↓ LPS-induced IL-12 production in mDCs</li> <li>↓ IFN-<math>\alpha</math> production in PBMCs</li> <li>↑ TLR4- and TLR8-induced IL-6 and TNF-<math>\alpha</math> production in MDDCs</li> <li>↑ Self-DNA-induced production of IFN-<math>\alpha</math> and IL-6 in MDDCs</li> <li>↓ Akt-phosphorylation, ↑ p38 phosphorylation (MDDCs)</li> </ul>

NK, natural killer; IL, interleukin; IFN, interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted; LPS, lipopolysaccharide; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; DC-SIGN, dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonlectin; mDC, myeloid dendritic cell; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; MDDC, monocyte derived dendritic cell.

Por otra parte, cuando se considera el sistema inmune y el impacto de la edad en su función es importante recordar que éste no funciona solo, es decir, hay que tener en cuenta los factores hormonales tales como las hormonas sexuales y las suprarrenales. La edad está asociada a un marcado cambio en el ambiente hormonal que contribuye a la variabilidad individual del declive del sistema inmune. Hay estudios que indican que el suplemento de hormonas dehidroepiandrosterona y dehidroepiandrosterona sulfato potencian *in vitro* la función de las células NK, los monocitos y los neutrófilos incrementando la protección frente a infecciones bacterianas en ratones (1).

Se han observado alteraciones tanto en la actividad como en los mecanismos de regulación y en el número de células circulantes. Esta pérdida del sistema inmune innato asociada a la edad tiene importantes consecuencias. Una reducción de la actividad de neutrófilos y células NK implica un aumento de la mortalidad y morbilidad en adultos (51). La desregulación observada de la función de los TLR (*Toll like*

*receptors*) llevada a cabo por monocitos y macrófagos afecta tanto a la respuesta a vacunas como a infecciones víricas (52).

### **2.2.1. Papel de las células NK en la inmunosenescencia.**

Las células NK juegan un papel importante en la defensa del sistema inmune innato, principalmente en las infecciones frente a virus y tumores.

En lo referente al número absoluto de células NK en sangre periférica, estudios previos han descrito un mayor número de células NK en *personas mayores* (53-55). Nuestro grupo ha encontrado una correlación directa entre el porcentaje de células NK y la edad en pacientes con fractura de cadera (17). Llama la atención el hecho de que el ejercicio físico evite este aumento de células NK asociado a la edad en mujeres (56).

Hay estudios que indican que la actividad citotóxica de las células NK se mantiene con la edad (57). Sin embargo, se ha descrito que el número absoluto de células NK aumenta con la edad reflejándose en un aumento de las células CD56<sup>dim</sup> (población con función principalmente citotóxica) (10, 58). También se ha descrito que conforme se avanza en edad, se produce una redistribución de las subpoblaciones de células NK produciéndose la expansión de la subpoblación CD56<sup>dim</sup> y un descenso de la población CD56<sup>bright</sup> (59).

Este hecho puede enmascarar defectos funcionales de las células NK, es decir, la capacidad citotóxica de las células NK disminuye con la edad pero el aumento de población de las células NK compensa este defecto funcional.

Por otra parte, hay trabajos que han descrito una disminución de la actividad de las células NK conforme aumenta la edad del individuo (14), en algunos casos asociada a una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-2 y a IL-6 (13, 15).

Parece que el defecto asociado a la función citotóxica de las células NK está relacionado con un defecto en la generación de inositol trifosfato que no afecta a la ADCC pero sí a la citotoxicidad natural (60). Dicha disminución de la capacidad citotóxica de las células NK supone un alto factor de riesgo de aparición de infecciones en pacientes de edad avanzada.

También se han relacionado estas alteraciones en la función de las células NK asociadas a la edad con cambios en la homeostasis del Zinc (factores nutricionales). Hay evidencias de que un suplemento de Zinc puede mejorar la función citotóxica de las células NK (61).

Por otra parte, entre otras posibles causas planteadas para justificar la deficiencia funcional de las células NK en relación con la edad, se ha implicado el acortamiento de los telómeros (62) o la reducción en la producción o expresión de perforina (6).

Recientemente se ha sugerido que el número de células NK se mantiene por un proceso de diferenciación continua asociado a la expresión de CD57 (63). Las células NK CD57+ muestran una mayor capacidad citotóxica, una alta sensibilidad a la estimulación vía CD16, una menor respuesta a la estimulación por parte de citocinas y una menor capacidad de proliferación. Se ha observado que la expresión de CD57 está aumentada en las células CD56<sup>dim</sup>, lo que podría explicar las características funcionales de las células NK en la vejez: una reducción de la salida a periferia de células CD56<sup>bright</sup> mas inmaduras y una acumulación de células altamente diferenciadas CD56<sup>dim</sup> CD57+ que lleva a la expresión alterada de algunos receptores de células NK, al descenso de la proliferación en respuesta a citocinas y a la preservación de la capacidad citotóxica mediada por CD16 (64). Esta remodelación de las subpoblación de células NK contribuye a la desregulación de la respuesta tanto innata como adaptativa ya que las citocinas producidas por las células CD56<sup>bright</sup> no solo son críticas para la activación de las células dendríticas (DCs, *dendritic cells*), sino que también interaccionan con los monocitos promoviendo un estado inflamatorio.

Otros cambios fenotípicos de las células NK observados en el *estado adulto* han sido una disminución de la expresión de los receptores de citotoxicidad natural NKp30 y NKp46 (65). Tanto NKp30 como NKp46 son receptores implicados en el mecanismo de reconocimiento y muerte de las células diana por parte de las células NK, de forma que alteraciones en su expresión pueden ser las responsables del decaimiento de la capacidad citotóxica observado con el aumento de edad. Además, NKp30 juega un importante papel regulatorio, ya que interviene en el reconocimiento por parte de las células NK de ligandos extraños presentados por las DCs (66). Este receptor puede producir directamente la muerte de las DCs inmaduras por acción de las células NK o

puede producir la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  para la posterior maduración de las DCs (67). De esta forma, al darse una disminución de la expresión de Nkp30 en las células NK de *individuos mayores* debería verse afectada también la capacidad de inicio de una respuesta inmune adaptativa frente a virus y tumores, ya que las interacciones celulares entre células NK y DCs pueden verse modificadas.

En lo referente a otros receptores activadores, como es el caso del receptor NKG2D no se han observado cambios de expresión fenotípica entre el estado adulto y joven (68).

Respecto a los receptores de tipo inhibidor, los resultados obtenidos de los estudios realizados son discrepantes. Mientras que algunos autores indican que la función de los receptores KIR no está afectada significativamente (12), otros estudios muestran que se produce un incremento de los receptores inhibidores tipo KIR con la edad acompañado de una disminución de la expresión del receptor también inhibidor CD94/NKG2A (16).

También se ha observado la disminución de los niveles de ciertas citocinas y quimiocinas reguladoras de la actividad inmunológica de las células NK. Se ha observado una disminución conforme avanza la edad de IL-2-inductora de la producción de IFN- $\gamma$  y de IL-2 e IL-12 inductoras de la producción de quimiocinas tales como RANTES, MIP1 $\alpha$  e IL-8 (69). Aunque la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK se mantiene con la edad, se ha observado un descenso de la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo de IL-2 o IL-12 (70). Considerando que estas quimiocinas están producidas fundamentalmente por las células NK CD56<sup>bright</sup>, el decaimiento de esta población con la edad explica el hecho de dicha disminución. Estas citocinas y quimiocinas inmunoreguladoras modularán la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T *helper*, lo que sugiere que la amplia gama de activadores de células NK y de respuestas de dichas células proporcionará una eficiente respuesta inmune innata contra virus y tumores que desembocará en una respuesta inmune adaptativa (8). Las alteraciones del sistema inmune innato mediadas por células NK pueden promover por tanto las discapacidades del sistema inmune adaptativo que se muestran en enfermedades relacionadas con la edad como infecciones y tumores.

Todo ello sugiere que entre los factores que contribuyen en el riesgo asociado a la edad de padecer más infecciones, podría estar implicada una disfunción en la actividad de las células NK.

## **2.3 Artritis reumatoide (AR)**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la producción de una inflamación crónica, principalmente en las articulaciones. Se caracteriza por una infiltración inflamatoria en el sinovio linfocitos y por una hiperplasia de la línea sinovial, potenciándose la angiogénesis y conduciendo todo ello a la destrucción del cartílago y del hueso (19).

La AR es el trastorno autoinmune más común, con una prevalencia del 1% en los países desarrollados. Supone una reducción significativa de la movilidad y morbilidad de los pacientes afectados. Puede aparecer a cualquier edad, pero es más frecuente a partir de los 40-50 años siendo tres veces más frecuente en las mujeres que en los hombres.

Aunque la RA es de etiología desconocida, es una enfermedad de base autoinmune en la que ciertas citocinas como el TNF- $\alpha$  juegan un papel muy importante en la inflamación producida y la progresión de la enfermedad. Mientras el sinovio de pacientes sanos permanece acelular, el de pacientes con AR contiene un gran infiltrado de células inflamatorias, no sólo macrófagos y células T sino también de células plasmáticas, células dendríticas y neutrófilos. De hecho, no sólo los factores solubles están implicados en la patogénesis de la AR sino que las interacciones célula-célula entre macrófagos, fibroblastos, células B y otras células residentes mantienen a las células en un estado activado permanente dentro de la articulación y también contribuyen a la progresión de la enfermedad tanto con una producción excesiva de citocinas proinflamatorias como promoviendo la destrucción articular (20).

### **2.3.1. Papel de las células NK en AR**

Se ha descrito que las células NK parecen jugar un importante papel en la regulación de diversas enfermedades autoinmunes (71, 72).

En el caso de la AR, los datos sobre el papel de las células NK son contradictorios atribuyéndoles tanto un papel regulador como patogénico en esta enfermedad (21). En cuanto a su posible papel regulador, se ha descrito la presencia de un incremento de células NK CD56<sup>bright</sup> en líquido sinovial de pacientes con AR que podría modular la progresión de la enfermedad (73). En esta línea, se ha descrito una disminución de la capacidad citotóxica de las células NK de sangre periférica que podría suponer el deterioro de un importante punto de regulación de la respuesta inmune exacerbada que se produce en la AR (74). Distintos trabajos empleando el modelo experimental murino de AR (CIA, *collagen-induced arthritis*) han otorgando también un papel protector a las células NK (75, 76). Sin embargo y en contraste con lo anterior, otros autores empleando este mismo modelo de CIA han descrito que las células NK parecen tener un papel claramente patogénico en la AR (77).

En definitiva, a la vista de los datos actuales sigue sin estar claramente definido si las células NK juegan un papel suprimiendo o promoviendo el desarrollo de la afectación articular en la AR.



## 3. Metodología

### 3.1. Pacientes incluidos en el estudio.

Los pacientes han sido seleccionados al azar entre los candidatos a cirugía ortopédica del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, descartando aquellos con antecedentes de neoplasias, tratamientos inmunomoduladores, o enfermedades autoinmunes. Las artroplastias de rodilla corresponden a pacientes con artrosis degenerativas.

El presente estudio incluye 19 pacientes con una media de edad de  $66,5 \pm 14,0$  años de los que 9 son hombres (47,4%) y 10 son mujeres (52,6%). En la tabla 5 se resumen las principales características epidemiológicas y el diagnóstico de los pacientes incluidos en el estudio.

Todos los pacientes han dado su aprobación para el presente estudio por escrito mediante un consentimiento informado acompañado de las informaciones pertinentes. Los procedimientos experimentales llevados a cabo en este estudio han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón.

Las muestras de líquido sinovial se obtuvieron, bien a partir de cirugía articular, bien a partir de las artrocentesis evacuadoras realizadas en los pacientes como tratamiento por su patología articular.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron a partir de las extracciones sanguíneas realizadas mediante venopunción como consecuencia del estudio clínico de los pacientes.

Se establecieron tres grupos para el posterior análisis de los resultados:

- Pacientes entre 30-60 años (Pacientes 12, 18, 19, 20 y 23; n=5).
- Pacientes entre 61-80 años (Pacientes 3-9, 13-15 y 21; n=11).
- Pacientes mayores de 80 años (Pacientes 16, 17 y 22; n=3).

**Tabla 4.** Pacientes incluidos en el estudio

Nº CASO	SEXO	EDAD	INTERVENCION	Nº DE PBLs totales	Nº DE SFMCs totales
3	HOMBRE	74	*ATR-I artrosis	6.370.000	1.275.000
4	MUJER	71	**ATR-D artrosis	6.600.000	420.000
5	HOMBRE	75	ATR-D artrosis	NO	390.000
6	MUJER	66	ATR-D artrosis	NO	45.000.000
7	HOMBRE	68	ATR-D artrosis	3.900.000	250.000
8	MUJER	64	***PTC-I artrosis	6.400.000	NO
9	MUJER	74	ATR-I artrosis	12.000.000	6.160.000
12	HOMBRE	42	Ligamentoplastia	6.100.000	NO
13	HOMBRE	61	Coxartrosis izquierda	8.160.000	NO
14	MUJER	65	ATR-I artrosis	7.000.000	1.190.000
15	MUJER	66	ATR-D artrosis traumática	2.600.000	1.050.000
16	MUJER	84	Fractura subcapital femur	2.300.000	NO
17	MUJER	86	Fractura subcapital femur	4.400.000	NO
18	MUJER	46	Fractura de tobillo	2.600.000	NO
19	MUJER	54	Pseudoartrosis dedo mano	2.700.000	NO
20	HOMBRE	51	Fractura distal radio	7.500.000	NO
21	HOMBRE	80	ATR-I artrosis	3.900.000	32.100.000
22	HOMBRE	81	ATR artrosis	21.315.000	1.940.000
23	HOMBRE	32	Ligamentoplastia	35.910.000	NO

\* ATR-I:artroplastia total de rodilla izquierda\*\* ATR-D:artroplastia total de rodilla derecha

\*\*\*PTC-I:prótesis total de cadera izquierda

Además se ha incluido un paciente afecto de AR diagnosticado según los criterios del ACR (*American College of Rheumatology*).

### 3.2. Obtención y purificación de células mononucleares de sangre periférica humana.

Las células NK se purificaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) obtenidas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll de sangre total en anticoagulante EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) obtenida por venopunción.

La técnica de Ficoll-Hypaque es una técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar linfocitos de otras células sanguíneas. Durante la centrifugación se van formando varias capas de forma que el sedimento está formado principalmente por granulocitos y eritrocitos ya que han migrado a través del gradiente de densidad

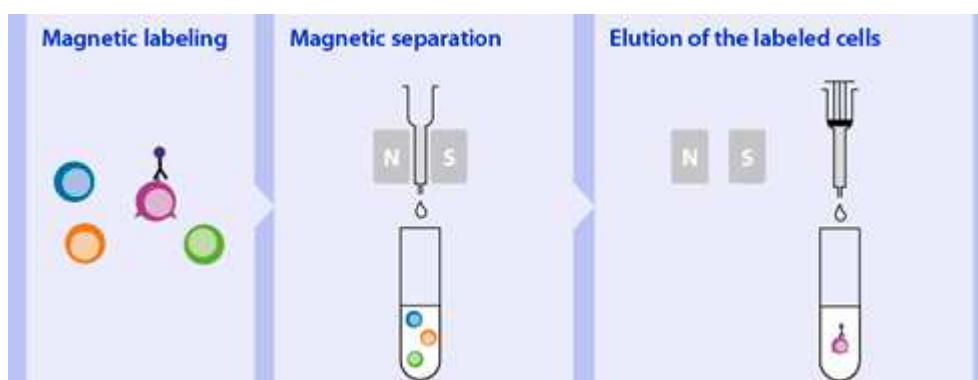
que es mayor al del *ficoll*. Por encima de ésta, se encuentra la capa formada por el propio reactivo de *ficoll* que es menos denso. Encima del *ficoll* se encuentra una capa fina opalescente formada por las PBMCs y finalmente sobre esa capa se encuentran las plaquetas y el plasma.

La sangre total recibida se diluyó en proporción 1:1 en tampón PBS (tampón fosfato salino: NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), se depositó suavemente sobre 3mL del reactivo *Ficoll-Hypaque* (GH Healthcare) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 minutos a 2.000 rpm. Posteriormente, se recolectó la capa de PBMCs, se lavó con tampón PBS y se tomó una alícuota para determinar la concentración y viabilidad celular mediante tinción con azul tripán.

Tras separar una alícuota de  $10 \times 10^5$  células para realizar el inmunofenotipado de las células NK presentes en la muestra de sangre periférica, el resto de PBMCs se destinaron a la purificación de células NK mediante separación magnética.

### 3.3. Separación magnética de células NK.

Para purificar las células NK a partir de los PBMCs obtenidos de sangre periférica, se empleó el método de separación magnética de células activadas (MACS<sup>®</sup>, *Magnetic-Activated Cell Sorting*) de la casa comercial *Miltenyi Biotec* (**Figura 1**). Dicho método de purificación consiste en el empleo de anticuerpos anti-CD56 unidos a micro-esferas magnéticas y la posterior separación en columna bajo campo magnético.



**Figura 1.** Esquema separación MACS ([www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)).

Para ello los PBMCs obtenidos tras el Ficoll se centrifugaron 5 minutos a 1.500 rpm a temperatura ambiente tras lo cual se decantó el sobrenadante, se añadió 80 µL de tampón MACS (PBS pH=7.2, 0.5% BSA, 2mM EDTA) y 20 µL del anticuerpo anti-CD56 unido a micro-esferas magnéticas y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Durante esta incubación el anticuerpo anti-CD56 se unirá a las células NK (CD56+) presentes en la población celular de la muestra. Tras la incubación, se lava la muestra con 10 mL de tampón MACS y se centrifuga durante 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C. Luego se elimina el sobrenadante, el pellet celular se resuspende en 3 mL de tampón MACS y se trasvasa a una columna MACS tipo LS colocada en el separador magnético que ha sido previamente acondicionada con 3 mL de tampón MACS. Se realizan 3 lavados con 3 mL de tampón MACS, de modo que las células que no llevan acoplada las micro-esferas, fluyen a través de la columna sin quedar retenidas. Tras los lavados, se quita la columna del soporte magnético, se le añade 6 mL de tampón MACS y se recolectan las células unidas a las micro-esferas conjugadas con anticuerpo anti-CD56 con la ayuda de la presión ejercida con un émbolo.

Para comprobar que la purificación por el método MACS había funcionado correctamente se tomó una alícuota de las células obtenidas, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-CD56 conjugado con el fluoróforo FITC (*fluorescein isothiocyanate*) y se analizó mediante citometría de flujo. En todos los casos las muestras de células obtenidas tras la purificación tenían más de un 90% de células CD56+. Las células CD56+ así obtenidas se denominan células NK *ex vivo* y son las que se usaron en los ensayos de citotoxicidad.

La concentración y viabilidad celular de las células NK *ex vivo* obtenidas se determinó mediante tinción con azul tripán.

### **3.4. Obtención y purificación de células mononucleares de líquido sinovial.**

Para obtener las células mononucleares de líquido sinovial (SFMCS, *synovial fluid mononuclear cells*), éste se diluyó en una proporción 1:1 con PBS. Posteriormente se filtró en condiciones de esterilidad con un filtro adaptado a tubos *Falcon* (*Cell*

*strainer BD Falcon*) y se realizó centrifugación en gradiente de *ficoll*, tal y como se ha descrito previamente para la obtención de PBMCs de sangre periférica. Se depositó el filtrado suavemente sobre 3mL del reactivo *Ficoll-Hypaque* y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 minutos a 2.000 rpm. Posteriormente, se recolectó la capa de SFMCs, se lavó con tampón PBS y se tomó una alícuota para determinar la concentración y viabilidad celular mediante tinción con azul tripán.

Tras separar una alícuota de  $10 \times 10^5$  SFMCs para realizar el estudio inmunofenotípico de las células NK presentes en el líquido sinovial, el resto de la muestra se empleó para la realización del ensayo de citotoxicidad.

### **3.5. Cultivos celulares.**

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad se utilizó la línea celular tumoral K562 proveniente de una Leucemia Mielogénica Crónica (ATCC: CCL-243™). La línea celular tumoral K562 carece de HLA de clase I y es por ello una célula diana clásicamente empleada en este tipo de ensayos de citotoxicidad con células NK.

Como medio de cultivo se utilizó RPMI 1640 (*Gibco*) suplementado al 5% con suero fetal bovino (*Foetal Bovine Serum*, FBS), con L-glutamina 2mM y con los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL). Este medio suplementado se denominó medio completo.

Las células K562 se cultivaron a una densidad de  $1,5-2 \times 10^5$  células/mL en un incubador termostatzado (*Heraeus Cell*) a 37°C en aire saturado de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub>. Todas las manipulaciones celulares se realizaron en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar vertical (*Telstar*).

#### **3.5.1. Congelación y descongelación de las líneas celulares.**

La línea celular K562 se almacenó congelada en nitrógeno líquido. Para ello se tomó una alícuota de  $7 \times 10^6$  células, se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm, se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se lavó con medio completo. Tras descartar el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en 1 mL de medio completo con un

8% de dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma*) y se trasvasó a un tubo de criopreservación estéril (*Nunc*). El tubo de criopreservación se guardó a -80°C durante 5 días y luego se almacenó en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Para la descongelación de las células, se dejó atemperar el tubo de criopreservación bajo campana de flujo laminar, se le añadió 1 mL de medio completo y se trasvasó a un tubo *Falcon* que contenía 10 mL de medio completo. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm, se decantó el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en 5 mL de medio completo y se trasvasó a un frasco de cultivo que se incubó a 37°C en aire saturado de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub>. En los días sucesivos se controló la densidad de crecimiento celular hasta establecer la densidad normal de mantenimiento (1,5-2x10<sup>5</sup> células/mL).

### **3.5.2. Determinación de la viabilidad celular.**

La determinación de la viabilidad celular de las células K562 (al igual que para el resto de muestras celulares empleadas en este trabajo) se realizó mediante el método de exclusión por tinción con azul tripán. Este colorante es capaz de penetrar en las células muertas que han perdido la integridad de su membrana plasmática tiñéndolas de color azul, mientras que las células vivas cuya membrana plasmática permanece íntegra, no se tiñen.

Para el conteo se mezclaron 50 µL de la suspensión celular con 50 µL de la solución de azul tripán (azul tripán al 0.4% en NaCl 0.15M) y se introdujeron en una cámara de *Neubauer* para realizar el conteo bajo un microscopio óptico (*Optiphot*, *Nikon*).

La densidad celular se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$DC \text{ (cel/ml)} = \frac{\text{Nº de células viables} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4}{\text{Nº de cuadrantes contados}}$$

$$\left[ \begin{array}{l} DC: \text{densidad celular.} \\ 10^4: \text{ajuste al tamaño de la cámara.} \\ \text{Factor de dilución: 2, al mezclar 50}\mu\text{l} + 50\mu\text{l.} \end{array} \right]$$

La viabilidad celular se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{N^{\circ} \text{ de células vivas}}{N^{\circ} \text{ de células totales}}$$

$$\left[ N^{\circ} \text{ de células totales} = N^{\circ} \text{ de células vivas} + N^{\circ} \text{ de células muertas} \right]$$

Todos los experimentos con células K562 se realizaron partiendo como mínimo de una viabilidad celular del 95%.

### 3.6. Estudio inmunofenotípico de las células NK.

El análisis inmunofenotípico de las células NK se ha realizado mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluoróforos (*FITC: fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin; APC: allophycocyanin*), todos ellos de la casa comercial *Invitrogen*. Se ha analizado la expresión de:

- marcadores de linaje de las células NK: CD56 y CD16.
- marcadores de activación: CD69 y HLA-DR.
- receptores de inhibición:
  - Tipo lectina: NKG2A.
  - Tipo ILT: ILT-2.
- receptores de activación:
  - Tipo lectina de la familia KIR: NKG2D.
  - Receptores de citotoxicidad natural: NKp30, NKp44 y NKp46.

Se separaron  $10 \times 10^5$  células mononucleares, tanto de sangre periférica como de líquido sinovial, según se ha indicado en los apartados anteriores y se realizaron los siguientes marcajes:

1. CD56-PE / CD16-FITC
2. CD56-PE / CD69- FITC
3. CD56- FITC / DR-PE
4. CD56- APC / NKG2A (CD195a)-PE
5. CD56- APC / ILT2-PE
6. CD56- APC / NKG2D-PE

7. CD56- APC / NKp30-PE
8. CD56- APC / NKp44-PE
9. CD56- APC / NKp46-PE

Para ello se centrifugaron las  $10 \times 10^5$  células mononucleares, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* celular en 900  $\mu$ L de tampón PBS 5% FBS y se repartieron 100  $\mu$ L en cada uno de los 9 tubos necesarios para cada uno de los marcajes. A cada tubo se añadió 2  $\mu$ L de los anticuerpos monoclonales correspondientes y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se trasvasó el contenido a un tubo de citómetro al que se le había añadido previamente 100  $\mu$ L de tampón PBS 5% FBS y se analizó mediante citometría de flujo empleando un citómetro *FACScan (Becton & Dickinson)*. El análisis de los resultados se realizó empleando el software *Weasel v3.0.1 (Walter Eliza Hall Institute)*.

En todos los casos se realizó un doble marcaje en el que siempre se incluía el anticuerpo anti-CD56 para poder analizar dentro de la población CD56+ la presencia de los distintos marcadores previamente descritos.

Los resultados del marcaje con CD16, de los marcadores de activación y de los receptores de activación y de inhibición se indican como el porcentaje de células positivas para cada marcador dentro de la población de células CD56+.

### **3.7. Estudio de citotoxicidad de las células NK.**

Para analizar la capacidad citotóxica de las células NK obtenidas de las muestras de sangre periférica y de líquido sinovial se realizaron co-cultivos de las células NK (células efectoras) con la línea celular tumoral K562 (células diana).

Para poder analizar posteriormente la muerte celular específica de las células diana, previamente a realizar el ensayo de citotoxicidad, las células efectoras se marcaron con la sonda fluorescente *Cell Tracker Green (CTG, Invitrogen)*. El CTG (*5-chloromethylfluorescein diacetate*) es un reactivo fluorescente (verde) que atraviesa libremente la membrana de las células y una vez dentro de éstas reacciona con los grupos tioles presentes en ellas a través de su grupo clorometilo por medio de una reacción mediada por la enzima glutation S-transferasa, de manera que queda retenido en el interior de la célula sin impedir su viabilidad.



A continuación se explica el método empleado para realizar el marcaje con CTG. Las células NK purificadas tras la separación por MACS a partir de sangre periférica, o las SFMCs obtenidas tras filtración del líquido sinovial y posterior centrifugación en gradiente de Ficoll, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS conteniendo CTG 0,1 mM por cada  $2 \times 10^6$  células. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C tras lo cual se centrifugaron durante 15 segundos a 10.000 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 1 mL de medio completo con FBS de complementado (el FBS se trata 30 minutos a 56°C para inactivar el sistema complemento) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Luego, se centrifugaron las células durante 15 segundos a 10.000 rpm y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio completo de complementado para que su concentración fuera  $5 \times 10^6$  cel/mL. Una vez marcadas con CTG las células efectoras están listas para el ensayo de citotoxicidad. Para realizar dicho ensayo, se empleó una placa de 96 pocillos de fondo redondo. En uno de los pocillos se co-cultivaron las células efectoras y las células diana en la siguiente proporción:

*10 células efectoras (NK):1 células diana (K562)*

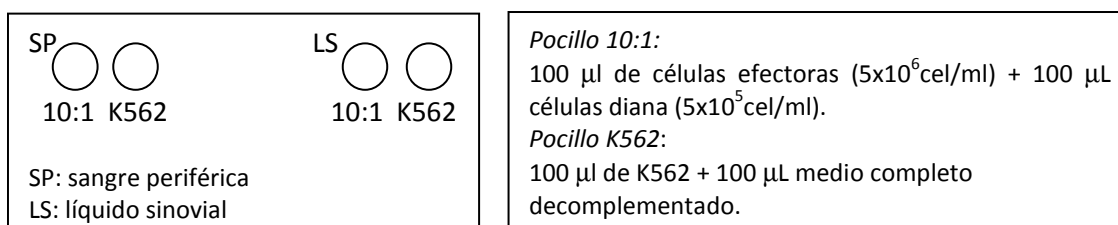
En el caso de las células efectoras obtenidas a partir de sangre periférica tras realizar la separación mediante MACS, como ya se ha indicado en todos los casos el porcentaje de células CD56+ obtenidas era superior al 90%, de modo que el número final de células efectoras que se disponían en el pocillo se determinaba directamente mediante conteo por tinción con azul tripán.

Respecto a las células efectoras obtenidas a partir de líquido sinovial, no se realizó purificación de la población de células NK mediante MACS ya que el número de SFMCs obtenido era normalmente pequeño, de modo que el rendimiento de la purificación por MACS no era óptimo. Para obtener el número de células efectoras presentes en la muestra de SFMCs, éstas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD56 conjugado con el fluoróforo FITC y se analizó mediante citometría de flujo. Sabiendo el número de SFMCs totales previamente obtenido mediante conteo con tinción con azul tripán y con el porcentaje de células CD56+ obtenido mediante

citometría de flujo se calculó en número de células efectoras presentes en la muestra de la siguiente manera:

$$N^{\circ} \text{ de células efectoras totales} = N^{\circ} \text{ de SFMCs totales} \times \% \text{ de células CD56}^{+}$$

El volumen final en cada pocillo fue de 200  $\mu$ L empleando en todos los casos medio completo deplementado para evitar la muerte por la activación del sistema del complemento. La incubación se realizó en un incubador termostatzado a 37°C durante 4 horas, tras lo cual se procedió al análisis de los parámetros de muerte celular de las células diana mediante citometría de flujo tal y como se comenta en el siguiente apartado. En todos los ensayos se dispuso un pocillo con células K562 solas para determinar la muerte basal de estas células durante cada ensayo (**Figura 2**).



**Figura 2.** Esquema de la placa de citotoxicidad.

Al haber marcado las células efectoras (células NK) con CTG previamente al ensayo de citotoxicidad, se puede diferenciar las dos poblaciones presentes en el co-cultivo (células efectoras y células diana) en el análisis por citometría de flujo. De este modo, se puede analizar específicamente la apoptosis en las células diana seleccionando la población celular CTG negativa (células K562).

Para calcular la apoptosis inducida específicamente en las células diana (células K562) por las células efectoras (células NK) en cada ensayo de citotoxicidad, a la muerte celular observada en la población CTG negativa del pocillo en el que se había realizado el co-cultivo, se le restó la muerte celular basal observada en el pocillo control (con células K562 solas):

$$\% \text{ apoptosis específica en células diana} = \% \text{ apoptosis en células CTG negativas} - \% \text{ apoptosis basal K562}$$

### **3.7.1. Citometría de flujo.**

En el estudio de la muerte celular mediante citometría de flujo se analizaron dos parámetros característicos de la apoptosis:

- Translocación de la fosfatidilserina (marcaje con Anexina V)).
- Permeabilidad de la membrana celular (marcaje con 7AAD).

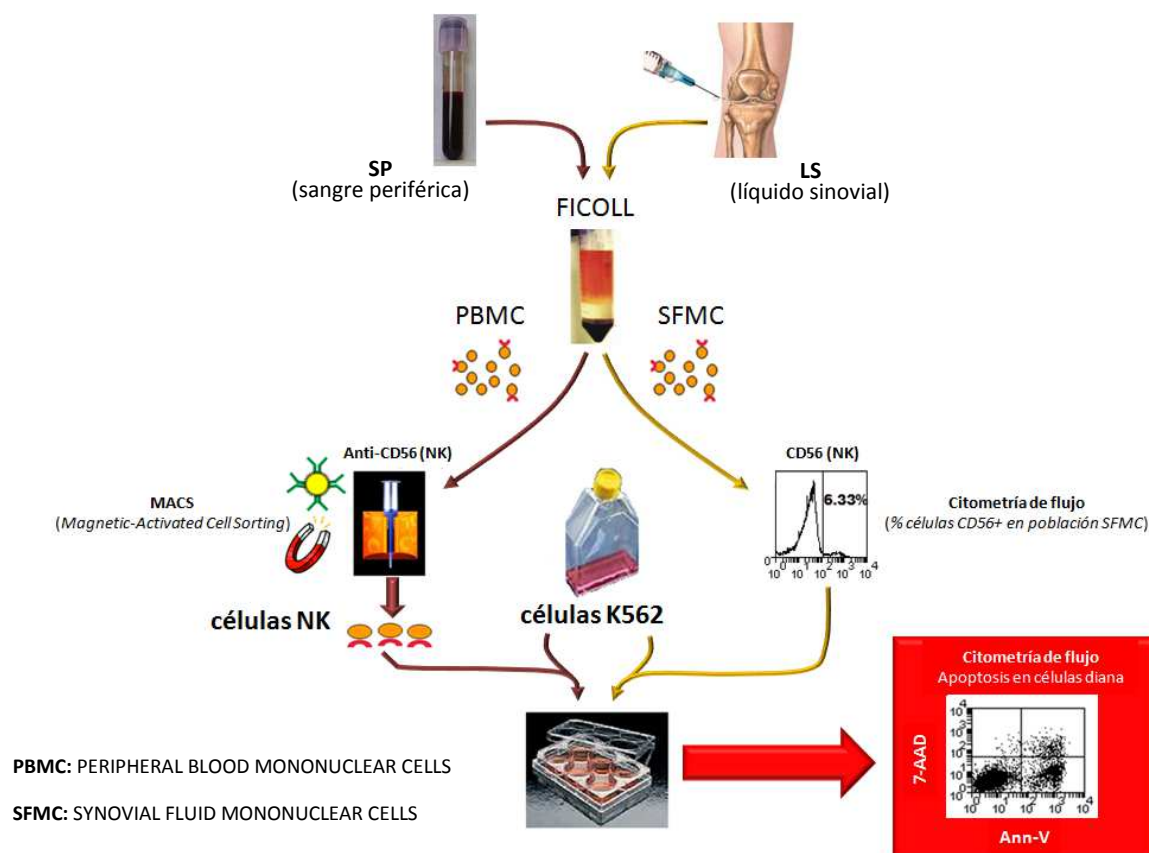
La fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. En etapas tempranas de la apoptosis se produce su translocación a la cara externa, de forma que queda accesible a proteínas que se unen específicamente a ella, como es la anexina V (Ann-V), la cual es dependiente de la presencia de calcio para su unión.

La determinación de la permeabilidad de la membrana celular se realiza a través del marcaje con 7-AAD (*7-amino-actinomycin D*). Se trata de un colorante que se une al DNA intercalándose en la doble cadena mostrando autofluorescencia. En etapas tardías de apoptosis la membrana plasmática esta permeabilizada de forma que el DNA de células apoptóticas se encuentra accesible al 7-AAD. Habrá que tener en cuenta que este 7-AAD también se unirá al DNA de células necróticas, no solo apoptóticas, ya que la membrana también está permeabilizada en dicha situación.

Para medir estos eventos indicadores de apoptosis se utilizó una Ann-V marcada con el fluoróforo APC detectable en el canal de fluorescencia FL-4 del citómetro de flujo y 7-ADD detectable en el canal FL-3 del citómetro de flujo.

Para realizar el marcaje de fluorescencia se centrifugaron 5 minutos a 1.500 rpm las células a analizar, se eliminó el sobrenadante y se añadió 100µL de tampón ABB (*annexin binding buffer*), 3 µL de Ann-V-APC y 1.5 µL de 7-AAD. Las células se incubaron 15 minutos en incubador termostatzado a 37°C tras lo cual se trasvasaron a un tubo de citometría que contenía 100 µL de tampón ABB 1X y se analizó empleando un citómetro *FACScan* y el análisis de los resultados se realizó mediante el software *Weasel v3.0.1*.

En la **Figura 3** se muestra un esquema representando el procedimiento metodológico completo de los ensayos de citotoxicidad realizados en el presente trabajo.



**Figura 3.** Esquema general del procedimiento completo empleado en los ensayos de citotoxicidad.

### 3.8. Análisis de los resultados

Para todos los estudios de comparación entre variables cuantitativas ha sido aplicado el test de la *t* de Student.

En todos los casos, se ha considerado como significativamente estadístico un valor de  $p < 0,05$ .

Los datos estadísticos han sido analizados usando el *software SPSS for Windows Release 15.0 (SPSS Inc.)*.

## 4.Resultados

### 4.1. Estudio comparativo de las células NK según la edad.

Se va a comparar tanto el fenotipo como la capacidad citotóxica de las células NK según los rangos de edad establecidos.

Todos los resultados han sido analizados en base a tres grupos poblacionales con los siguientes rangos de edad:

- Entre 30-60 años.
- Entre 61-80 años.
- Mayores de 80 años.

#### 4.1.1. Estudio fenotípico de las células NK en sangre periférica según la edad.

Para poder estudiar los marcadores fenotípicos en las células NK se realizó en todos los casos un doble marcaje en el que siempre se incluía el marcador de selección característico de las células NK (CD56), y el marcador a analizar.

Tal y como se ha descrito en el apartado de Metodología, los resultados de los marcadores analizados (CD16, marcador de caracterización; CD69 y HLA-DR, marcadores de inhibición; NKG2A e ILT-2, receptores de activación; NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46, receptores de activación) se muestran como el porcentaje de células positivas para cada marcador dentro de la población CD56 positiva (**Figura 4**).

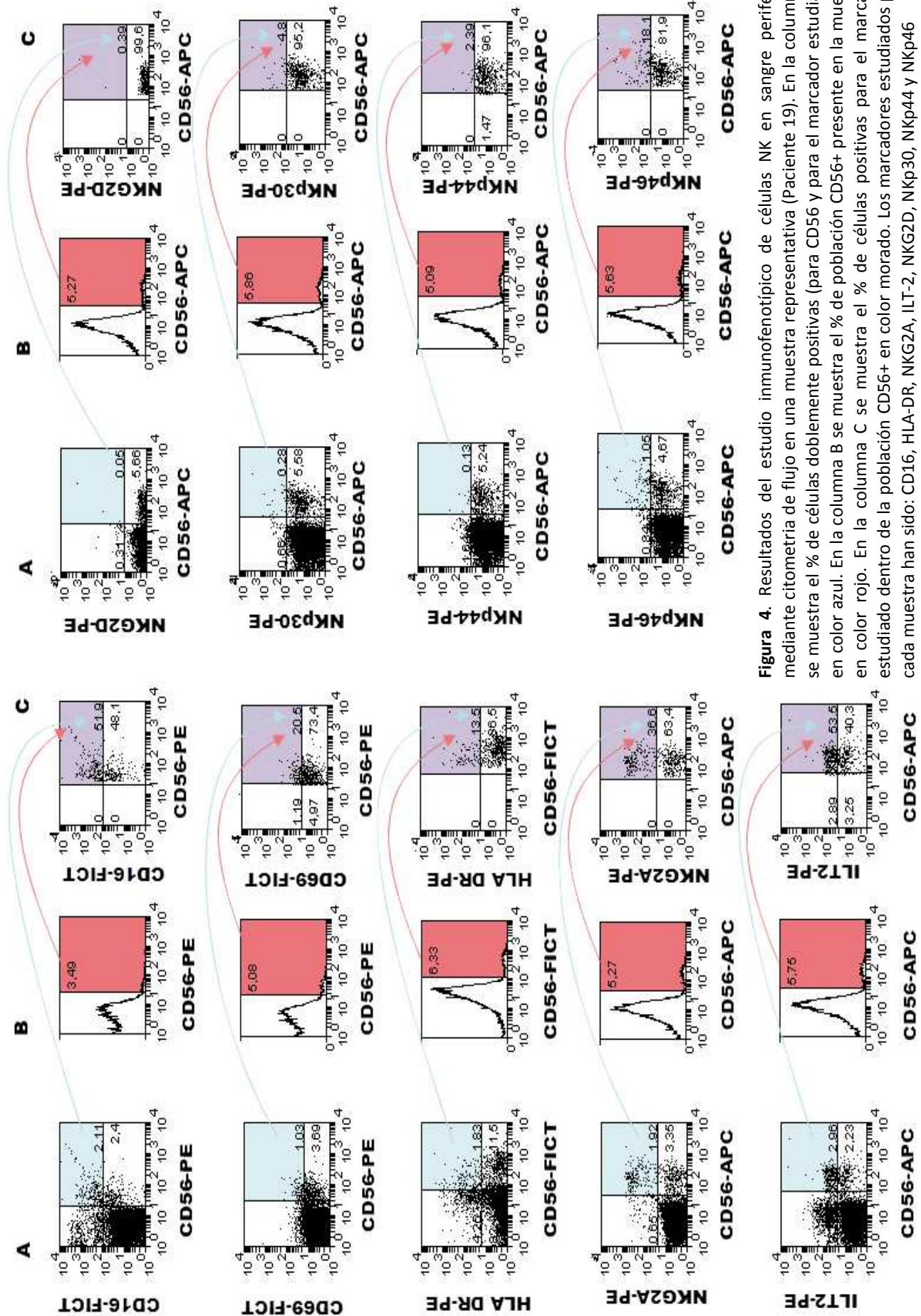
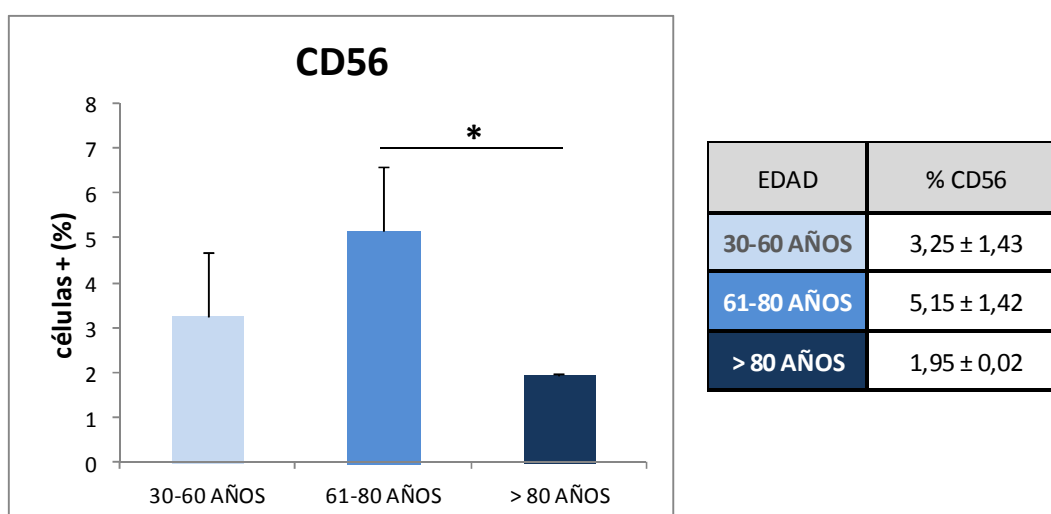


Figura 4. Resultados del estudio inmunofenotípico de células NK en sangre periférica mediante citometría de flujo en una muestra representativa (Paciente 19). En la columna A se muestra el % de células doblemente positivas (para CD56 y para el marcador estudiado) en color azul. En la columna B se muestra el % de población CD56+ presente en la muestra en color rojo. En la columna C se muestra el % de células positivas para el marcador estudiado dentro de la población CD56+ en color morado. Los marcadores estudiados para cada muestra han sido: CD16, HLA-DR, NKG2A, ILT-2, NKG2D, NKP30, NKP44 y NKP46

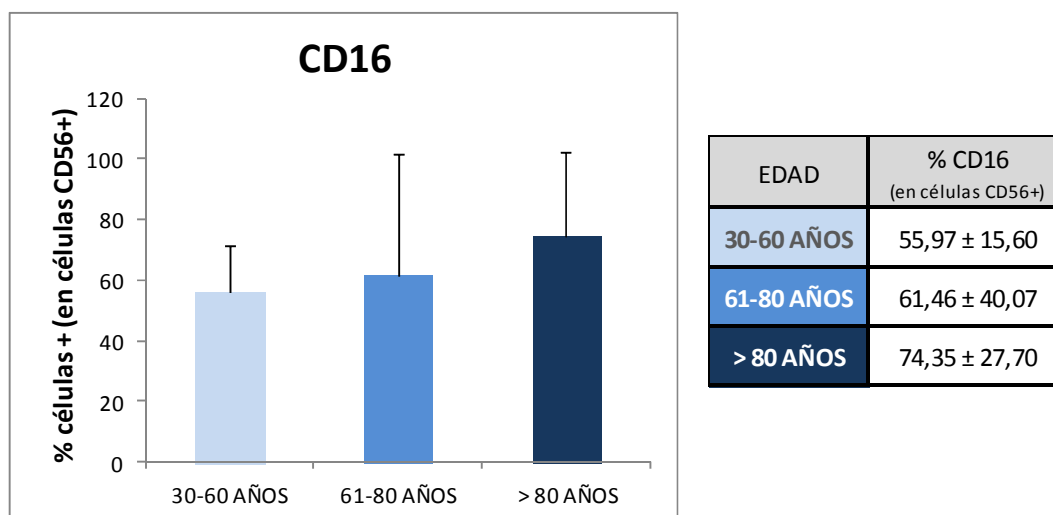
El análisis de los resultados se ha realizado dividiendo en los siguientes grupos los marcadores a estudiar:

- Marcadores de selección: CD56.
  - Marcadores de caracterización: CD16.
  - Marcadores de activación: CD69 y HLA-DR.
  - Receptores de inhibición y de activación: NKG2A, ILT-2, NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46.
- **Marcador de selección CD56:** se observa como la población de células NK aumenta con la edad (de un 3% a un 5%) hasta llegar a una edad superior a 80 años en la cual se observa una disminución de células NK (hasta aproximadamente un 2%), siendo significativo este descenso observado entre el grupo de edad de 61-80 años y el grupo >80 años (**Figura 5**).



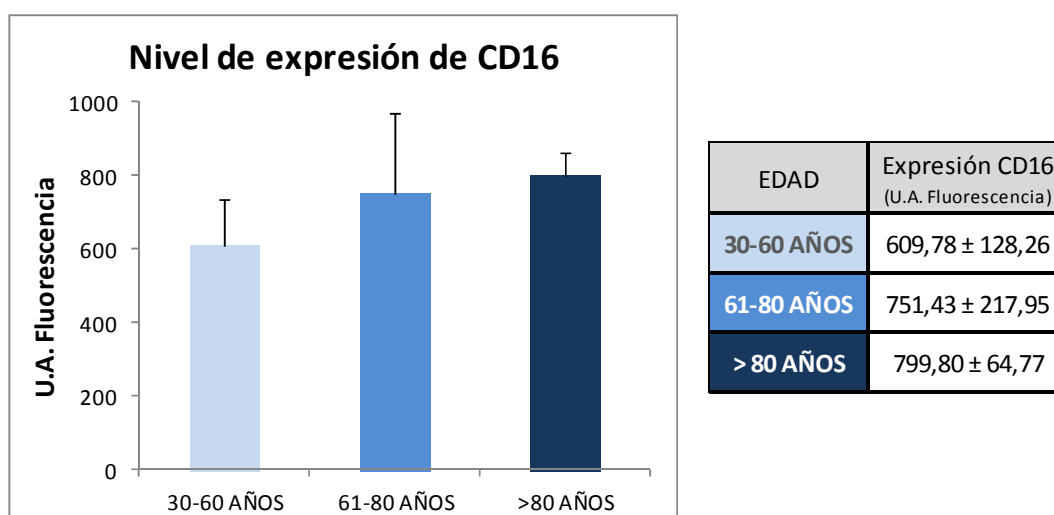
**Figura 5.** Gráfica que representa el promedio de células NK (CD56+) aisladas en los tres grupos poblacionales: entre 30-60 años (n=4), entre 61-80 años (n=3) y mayores de 80 años (n=2). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). \*  $p < 0,05$ .

- **Marcador de caracterización CD16:** se observa una tendencia al aumento en el número de células CD16 positivas (desde casi un 56% hasta un 74%) conforme se aumenta de edad (**Figura 6**).



**Figura 6.** Gráfica que representa el porcentaje de células que expresan CD16 dentro de la población CD56+ (células NK) en los tres grupos poblacionales: entre 30-60 años ( $n=4$ ), entre 61-80 años ( $n=3$ ) y mayores de 80 años ( $n=2$ ). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD).

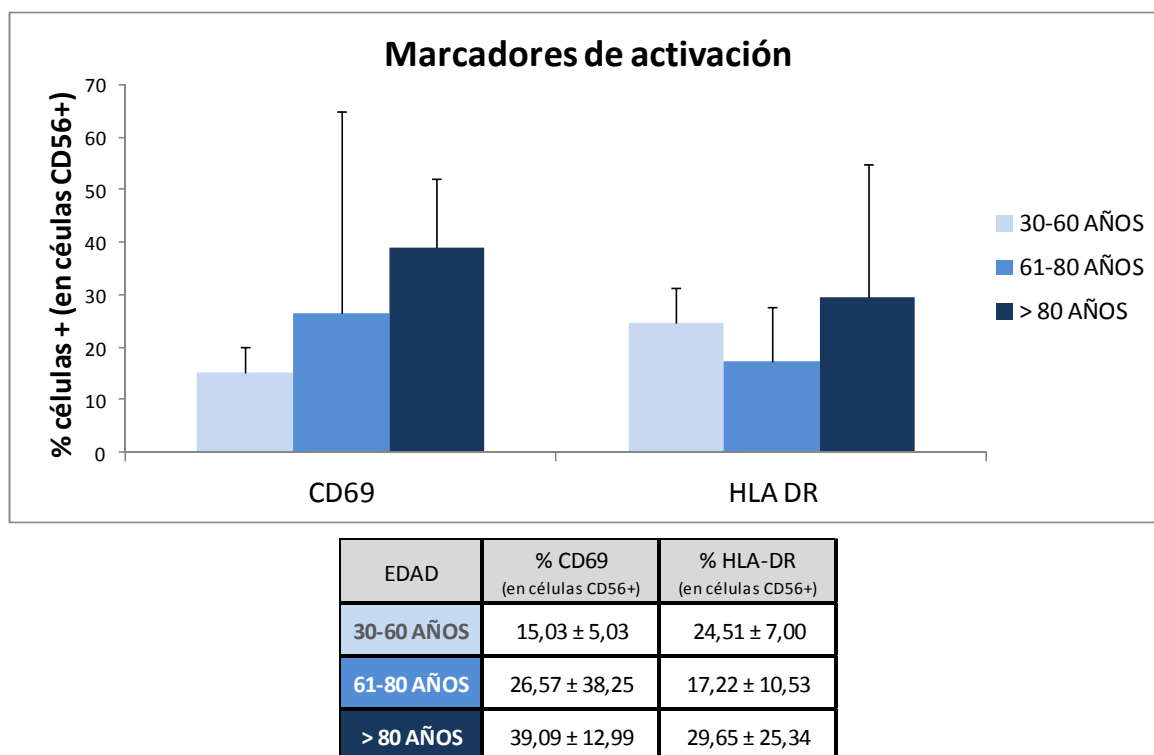
Además del porcentaje de células CD16 positivas, también se ha estudiado el nivel de expresión de CD16 en la población CD56 positiva analizando la intensidad de fluorescencia media de la población CD16 positiva. Al igual que en el caso del número de células que expresan este marcador, se observa una tendencia al aumento en la intensidad media de expresión de CD16 dentro de la población CD16 positiva (desde 600 unidades arbitrarias -U.A.- hasta casi 800 U.A. de fluorescencia) conforme se aumenta de edad (**Figura 7**).



**Figura 7.** Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de CD16 de las células que expresan este marcador dentro de la población CD56+ (células NK) en los tres grupos poblacionales: entre 30-60 años ( $n=4$ ), entre 61-80 años ( $n=3$ ) y mayores de 80 años ( $n=2$ ). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD).



- **Marcadores de activación CD69 y HLA-DR:** en el caso de **CD69**, a pesar de la gran variabilidad en el grupo de edad de 61-80 años, se observa un aumento progresivo de células CD69 positivas conforme se avanza en edad (de un 15% hasta prácticamente un 40%). En el caso de **HLA-DR**, no se observan cambios destacables en los tres grupos de edad estudiados (**Figura 8**).

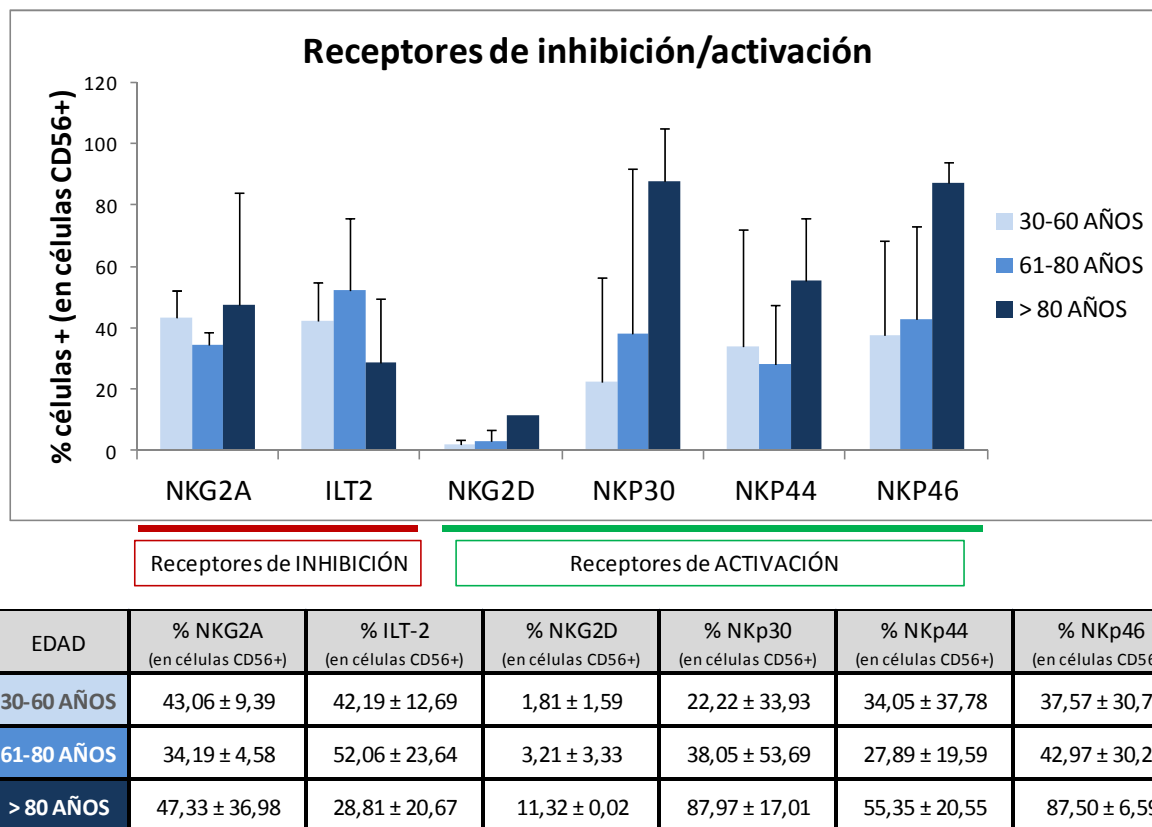


**Figura 8.** Gráfica que representa el porcentaje de células que expresan CD69 y HLA-DR dentro de la población CD56+ (células NK) en los tres grupos poblacionales: entre 30-60 años (n=4), entre 61-80 años (n=3) y mayores de 80 años (n=2). En la tabla inferior se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD).

- **Receptores de inhibición y de activación NKG2A, ILT-2, NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46:** en el caso de **NKG2A**, a pesar de la variabilidad en el grupo >80 años, no se observa una gran variación con la edad. En el caso de **ILT-2** parece observarse una tendencia a su disminución en el grupo >80 años.

Respecto a los marcadores de activación (NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46) se observa una tendencia clara a su aumento conforme se avanza en edad. Este aumento es más pronunciado en el caso de **NKp30, NKp44 y NKp46** (receptores de citotoxicidad natural) y sobre todo en el grupo de >80 años. Respecto a la expresión del receptor de

activación tipo KIR **NKG2D**, aunque el porcentaje de células NKG2D positivas es bajo en comparación con el resto de receptores estudiados, se observa también la tendencia progresiva a su aumento conforme se avanza en edad (**Figura 9**).



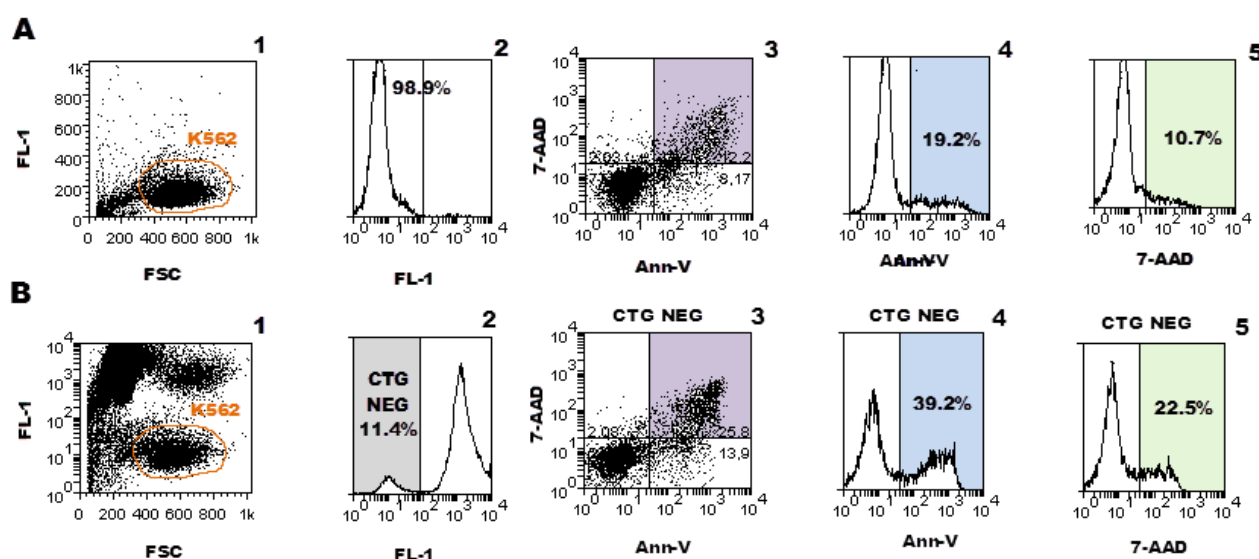
**Figura 9.** Gráfica que representa el porcentaje de células que expresan NKG2A, ILT-2, NKG2D, NKP30, NKP44 y NKP46 dentro de la población CD56+ (células NK) en los tres grupos poblacionales: entre 30-60 años ( $n=4$ ), entre 61-80 años ( $n=3$ ) y mayores de 80 años ( $n=2$ ). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD).

#### 4.1.2. Estudio citotóxico de las células NK en sangre periférica según la edad.

Tras purificar las células NK de las muestras de sangre periférica recibidas se procedió a la realización del ensayo de citotoxicidad para ver la muerte producida por dichas células NK en la línea celular K562 (Leucemia Mieloide Crónica). Dicha línea celular es una diana clásica de las células NK al ser deficiente en moléculas MHC-I. Se quería comprobar con ello el grado de activación de las células NK en pacientes sin ninguna patología para determinar si se observaban diferencias importantes en base a su edad.

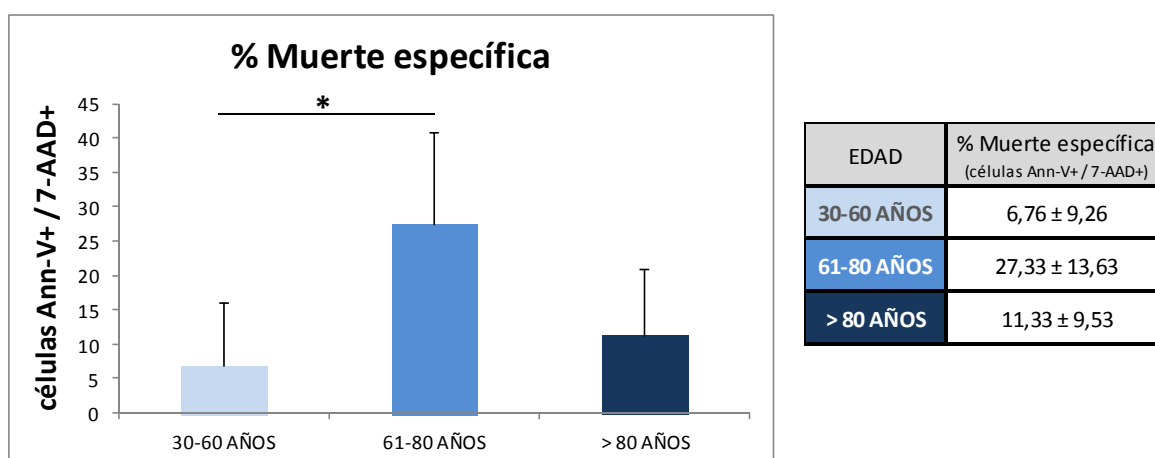
Tal y como se ha descrito en Metodología, el ensayo de citotoxicidad se realizó a una proporción **células efectoras (NK):células diana (K562)** de **10:1** durante 4 horas de incubación tras lo cual se analizaron los parámetros apoptóticos (Ann-V y 7-AAD) mediante citometría de flujo.

En la **Figura 10** mostramos el resultado de una muestra representativa (Paciente 20). Como ya se ha descrito en Metodología, para analizar la apoptosis exclusivamente en las células diana, se seleccionaba previamente la población CTG negativa (células K562). Finalmente, para calcular la apoptosis específica debida a la acción citotóxica ejercida por las células NK sobre las células K562, a la apoptosis observada en la población CTG negativa del pocillo donde se habían co-cultivado ambos tipos celulares, se le restaba la apoptosis basal observada en el pocillo control donde se habían cultivado células K562 solas.



**Figura 10.** Resultados de ensayos de citotoxicidad debida a las células NK sobre células K562 en una muestra representativa (Paciente 20). **(A)** Gráficas de citometría mostrando los porcentajes de células CTG, anexina-V y 7-AAD positivas en la línea celular K562 (gráficas 2, 4 y 5 respectivamente) así como los dot-plots que representan su morfología versus marcaje CTG (gráfica 1) y la combinación de ambos parámetros de muerte celular Ann-V+ y 7-AAD+ (gráfica 3). **(B)** Gráficas de citometría mostrando los porcentajes de células CTG, anexina-V y 7-AAD positivas en la línea celular K562 enfrentada a una población de células NK diez veces superior (gráficas 2, 4 y 5 respectivamente), así como los dot-plots que representan su morfología versus marcaje CTG (gráfica 1) y la combinación de ambos parámetros de muerte celular Ann-V+ y 7-AAD+ (gráfica 3).

Cuando se analiza la capacidad citotóxica de las células NK obtenidas de sangre periférica en función de la edad, se observa que hay un aumento de la muerte celular específica llevada a cabo por las células NK al avanzar en edad, siendo significativo entre el grupo 30-60 años y el grupo 61-80 años. Sin embargo, en el grupo >80 años se observa una disminución de dicha capacidad citotóxica hasta unos valores prácticamente similares a los de la población más joven representada por el grupo de entre 30-60 años (**Figura 11**).



**Figura 11.** Gráfica que representa el porcentaje de células apoptóticas mediante doble marcaje con Ann-V y 7-AAD dentro de la población K562 (muerte específica) para los rangos de edad analizados: entre 30-60 años ( $n=5$ ), entre 61-80 años ( $n=6$ ) y mayores de 80 años ( $n=3$ ). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). \*  $p<0,05$ .

## 4.2. Estudio comparativo de las células NK de sangre periférica y líquido sinovial.

Se ha realizado el análisis comparativo tanto del inmunofenotipo como de la capacidad citotóxica de las células NK procedentes de sangre periférica respecto a las de líquido sinovial en aquellos pacientes en los que se pudo obtener ambas muestras.

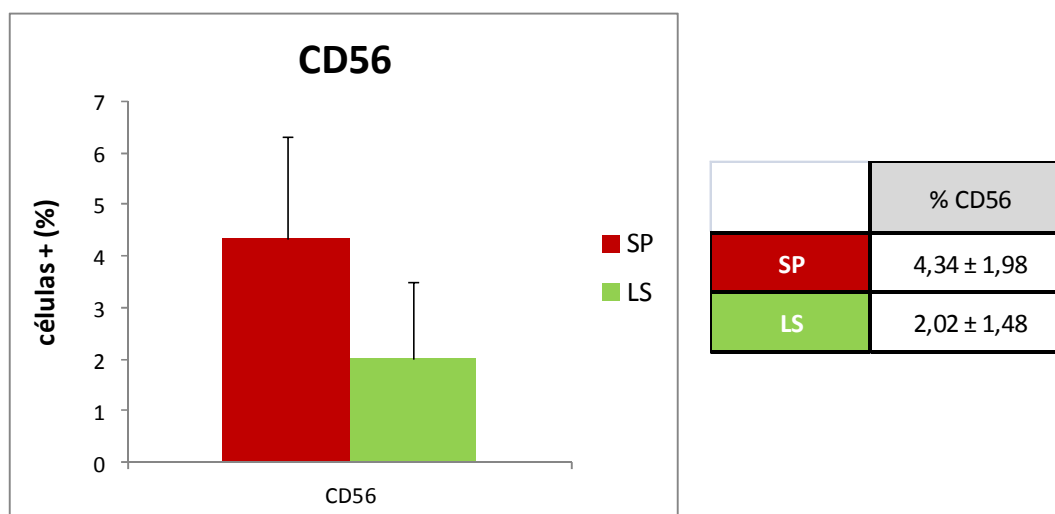
### 4.2.1. Estudio comparativo del fenotipo de las células NK de sangre periférica y de líquido sinovial.

Se estableció la comparación fenotípica entre sangre periférica (SP) y líquido sinovial (LS) para analizar las posibles diferencias inmunofenotípicas entre las células

NK implicadas en una respuesta inmune general (SP) y las células NK implicadas en un respuesta inmune local (LS).

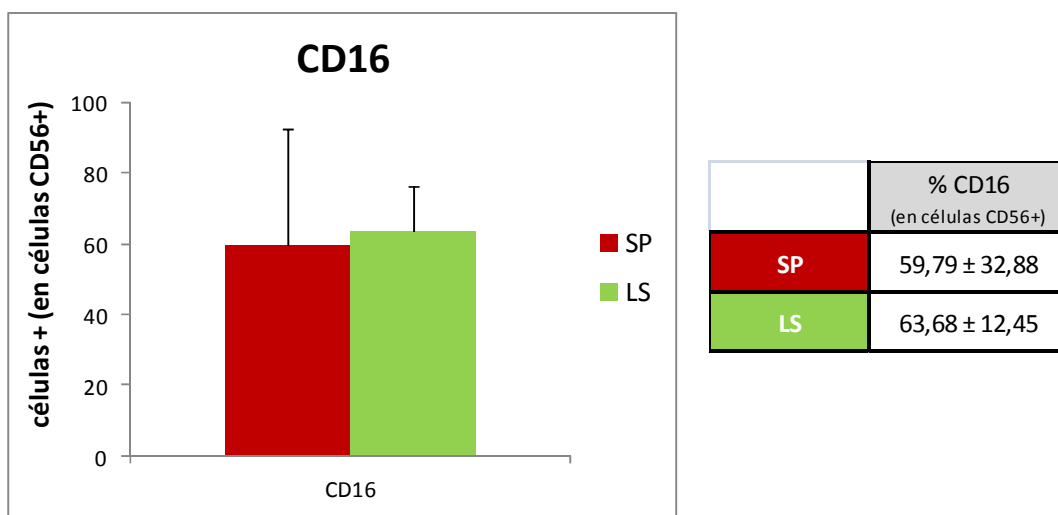
Se analizaron los mismos marcadores fenotípicos que en el caso del estudio por edad, de forma que el análisis de los resultados se ha realizado dividiendo en los mismos grupos los marcadores a estudiar.

- **Marcador de selección CD56:** a pesar de la gran variabilidad que se observa en ambos grupos de estudio, parece que el porcentaje de células NK en SP es superior al observado en LS (**Figura 12**).



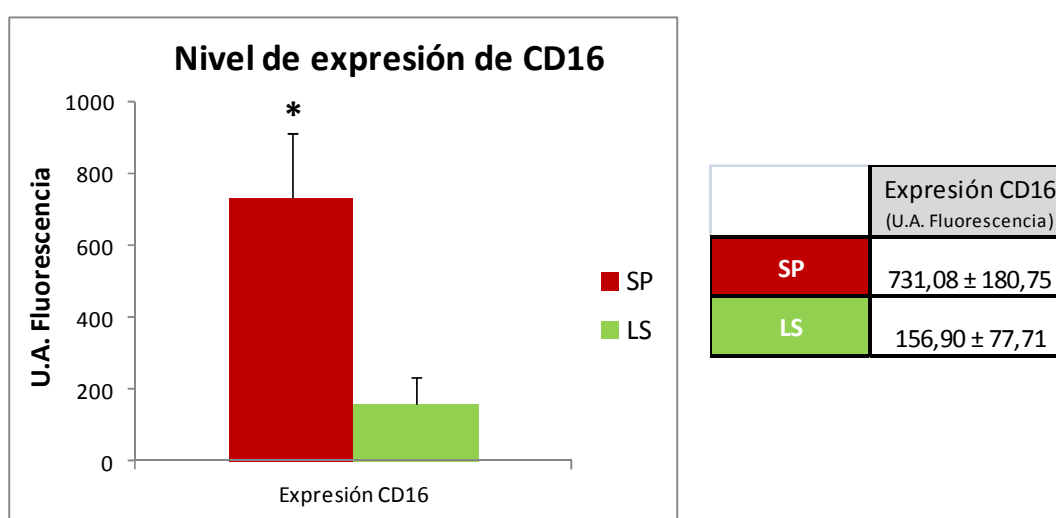
**Figura 12.** Gráfica que representa el promedio de células NK (CD56+) aisladas en SP y LS. En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). El número de pacientes analizado ha sido  $n=4$ .

- **Marcador de caracterización CD16:** en lo que al marcador CD16 se refiere, se observa unos porcentajes de células CD16 positivas similares en SP y LS, del 59% y el 63% respectivamente (**Figura 13**).



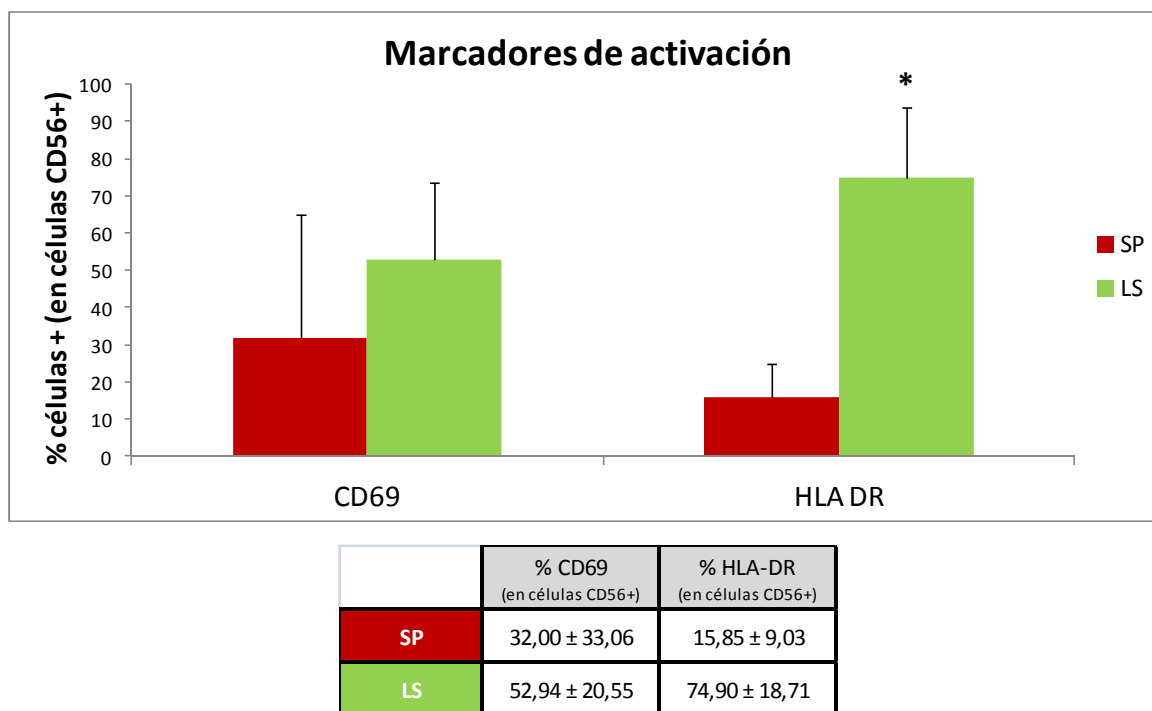
**Figura 13.** Gráfica que representa el porcentaje de células que expresan CD16 dentro de la población CD56+ (células NK) en SP y LS. En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). El número de pacientes analizado ha sido  $n=4$ .

Al igual que en el estudio de CD16 por edad, también se ha estudiado el nivel de expresión de CD16 en la población CD56 positiva analizando la intensidad de fluorescencia media de la población CD16 positiva. En este caso se observa que a pesar de que los porcentajes de células CD16 positivas en SP y LS son similares, el nivel de expresión de este marcador, es significativamente mayor en las células NK de SP respecto a las de LS (**Figura 14**).



**Figura 14.** Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de CD16 de las células que expresan este marcador dentro de la población CD56+ (células NK) en SP y LS. En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). El número de pacientes analizado ha sido  $n=4$ . \*  $p<0,05$ .

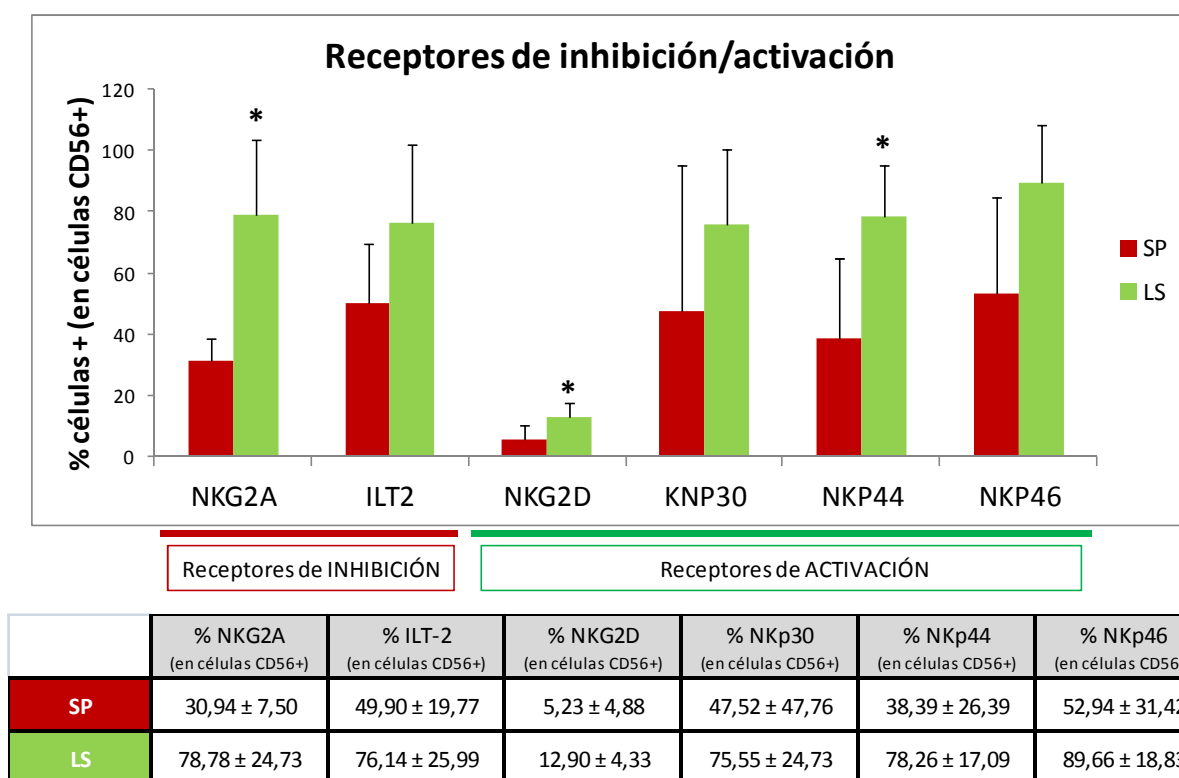
- **Marcadores de activación CD69 y HLA-DR:** en el caso de los marcadores de activación, el porcentaje de células NK positivas tanto para **CD69** como para **HLA-DR** son superiores en LS respecto a SP, llegando a ser significativo este incremento en el caso de HLA-DR (**Figura 15**).



**Figura 15.** Gráfica que representa el porcentaje de células que expresan CD69 y HLA-DR dentro de la población CD56+(células NK) en SP y LS. En la tabla inferior se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). El número de pacientes analizado ha sido  $n=4$ . \*  $p<0,05$ .

- **Receptores de inhibición y de activación NKG2A, ILT-2, NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46:** en el caso de los marcadores de inhibición (**NKG2A** e **ILT2**), se observa una clara tendencia al aumento en el porcentaje de células positivas en el LS para ambos marcadores respecto al porcentaje en SP, llegando a ser este aumento significativo en el caso de NKG2A.

Respecto a los marcadores de activación (**NKG2D**, **NKp30**, **NKp44** y **NKp46**), también se observa una tendencia a su aumento en el LS respecto a SP llegando a ser significativo en el caso de NKG2D y el NKp44 (**Figura 16**)

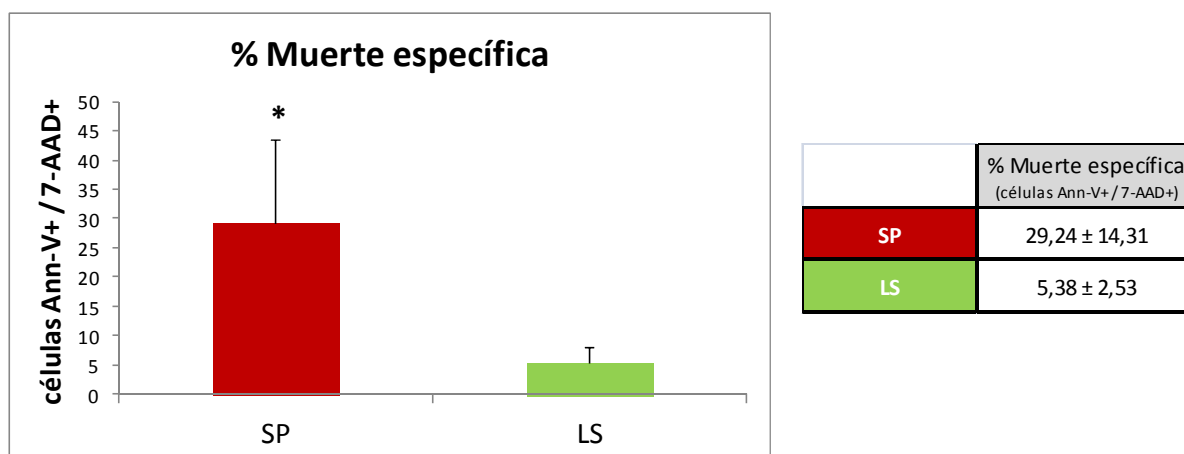


**Figura 16.** Gráfica que representa el porcentaje de células que expresan NKG2A, ILT-2, NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46 dentro de la población CD56+ (células NK) en SP y LS. En la tabla inferior se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). El número de pacientes analizado ha sido  $n=4$ .  
\*  $p<0,05$ .

#### 4.2.2. Estudio comparativo de la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica y de líquido sinovial.

También se analizó comparativamente la citotoxicidad de las células NK de SP y LS del mismo paciente en cada una de las muestras en las que fue posible, para estudiar las posibles diferencias de capacidad citotóxica entre las células NK implicadas en una respuesta inmune general (SP) y las células NK implicadas en una respuesta inmune local (LS) (**Figura 17**).





**Figura 17.** Gráfica que representa los niveles de apoptosis mediante doble marcaje con Ann-V y 7-AAD dentro de la población K562 (muerte específica) en SP y LS. En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje  $\pm$  SD). El número de pacientes analizado ha sido  $n=5$ . \*  $p<0,05$ .

En lo que al estudio comparativo de la citotoxicidad de las células NK se refiere, los resultados muestran como la muerte específica producida por las células NK es significativamente superior en SP (29%) frente a la producida en LS (5%).

#### 4.2.3. Estudio comparativo de la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica y de líquido sinovial en artritis reumatoide.

En este trabajo también se ha analizado la capacidad citotóxica de las células NK de SP y LS de un paciente con artritis reumatoide (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Representación de los niveles de apoptosis mediante marcaje con Ann-V, con 7-AAD y doble marcaje dentro de la población K562 (muerte específica) en SP y LS en paciente de artritis reumatoide.

	% Muerte específica (Ann-V+)	%Muerte específica (7-AAD+)	%Muerte específica (Ann-V+ 7-AAD+)
SP -AR-	2,70	0,20	1,00
LS -AR-	12,30	12,40	8,30

Como se observa, las células NK de SP de este paciente mostraron una menor capacidad citotóxica que las células NK de LS cuando se analiza tanto las células Ann-V positivas, las células 7-AAD positivas o las células dobles positivas (Ann-V y 7-AAD positivas).

## 5. Discusión

Los cambios funcionales en los componentes del sistema inmune conforme se avanza en edad (inmunosenescencia) todavía no han sido completamente caracterizados. Se ha comprobado que se produce una desregulación del sistema inmune conforme aumenta la edad que conduce a una mayor propensión a infecciones, tumores, enfermedades autoinmunes y resistencia a la acción de ciertas vacunas (1, 9, 78). Entre los estudios que se están realizando en este campo, cada vez más estudios se están centrando en el sistema inmune innato y dentro de éste, en el papel que juegan las células NK (16, 58, 61). Se ha demostrado que el papel de las células NK es muy importante, no sólo por su capacidad citotóxica frente a las células diana, sino también por su capacidad inmunoreguladora que influye en la inducción de una respuesta inmune adaptativa eficiente (34, 79).

En el presente trabajo se ha analizado la capacidad citotóxica y expresión de diversas moléculas de superficie en células NK de sangre periférica y su variación con la edad. Además, se ha estudiado estos mismos parámetros en paralelo en células NK de sangre periférica y de líquido sinovial para analizar las posibles diferencias en la actividad y fenotipo de las células NK a nivel sistémico y a nivel local, en este caso en la articulación afectada en muestras de pacientes candidatos a cirugía ortopédica del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

En el presente trabajo, en cuanto a los resultados obtenidos en el estudio de las células NK según la edad se refiere, los datos del análisis inmunofenotípico de células NK en sangre periférica indican un bajo porcentaje de células NK (CD56 positivas) en sangre en todos los grupos de edad estudiados. Aún así, se observa un aumento en el porcentaje de células NK en la población entre 61-80 años, lo cual se correlaciona con la mayor capacidad citotóxica de las células NK observada en este grupo de población. Según distintos estudios se ha observado que el número de células NK aumenta con la edad (1, 6), y este aumento se asocia a un aumento de células NK CD56<sup>dim</sup> (población con un alto nivel de expresión de CD16) (10). En nuestro estudio no hemos observado

diferencias significativas en el nivel de expresión de CD56 dentro de la población celular positiva para este marcador (datos no mostrados), pero se ha observado una tendencia tanto al aumento del porcentaje de la población CD16 positiva como de su nivel de expresión conforme se avanza en edad lo que sugiere en concordancia con lo descrito previamente (10), que se puede estar produciendo una reorganización fenotípica de las células NK (de una subpoblación CD56<sup>bright</sup> – más secretora-, a CD56<sup>dim</sup> –más citotóxica-) en un intento de compensar la disminución de la capacidad citotóxica observada en el grupo de mayores de 80 años.

Estudios previos han descrito un aumento de marcadores de activación conforme aumenta la edad en este caso en linfocitos T (80). En el presente trabajo también se ha analizado la expresión de marcadores de activación (CD69 y HLA-DR) ya descritos como tales en las células NK de sangre periférica (81). A pesar de la gran variabilidad observada (sobre todo en el grupo de edad de 61-80 años), los datos obtenidos indican que el marcador temprano de activación CD69 parece incrementarse con la edad (fundamentalmente en el grupo de mayores de 80 años), mientras que no se observan variaciones en el marcador tardío de activación HLA-DR, a diferencia de lo descrito en linfocitos T en los que el mayor aumento se observa en la expresión de HLA-DR. En lo referente a CD69, se ha descrito que entre otras funciones induce la actividad citolítica mediada por células NK (82). Sin embargo, en el presente trabajo el aumento observado de CD69 no parece conllevar un aumento de la capacidad citotóxica de las células NK (83). En este sentido, se ha descrito que CD16 es uno de los estímulos que aumenta la expresión de CD69 (84). La tendencia tanto al aumento del porcentaje de la población CD16 positiva como de su nivel de expresión junto con la tendencia al aumento paulatino de CD69 observado podría sugerir que las células NK conforme avanza la edad tienden a presentar un fenotipo “activado” temprano que correspondería con el estado de hiperreactividad de las células del sistema inmune observado en la inmunosenescencia, en un intento de compensar su menor capacidad citotóxica, mostrando un estado de activación inicial que no llegaría a mantenerse en el tiempo (no se observa variaciones con la edad del marcador tardío de activación HLA-DR). Este estado de activación que aumenta conforme avanza la edad, se observa principalmente en el grupo de población de mayores de 80 años sin

embargo, no es suficiente para mantener la capacidad funcional de las células NK, grupo en el cual se observa además un descenso significativo del porcentaje de células NK.

En este sentido, el mantenimiento de los receptores de inhibición analizados (NKG2A e ILT2) así como el aumento en el porcentaje de células NK que expresan receptores de activación (especialmente NKp30 y NKp46) que se observa con la edad y sobre todo en la población de mayores de 80 años estaría en la línea de lo anteriormente expuesto. Sin embargo, estos datos contrastan con otros previamente publicados que indican que la reducción de la capacidad citotóxica se refleja en una disminución de la expresión de receptores de citotoxicidad natural NKp30 y NKp46 (9). Estas discrepancias pueden ser debidas a diversos motivos como los distintos protocolos experimentales empleados, y la distinta edad de corte seleccionada para el estudio.

Los datos mostrados en el presente trabajo sugieren que las células NK presentan un mayor estado de activación conforme se avanza en edad en un intento de compensar sus defectos funcionales asociados a la edad contribuyendo al estado “proinflamatorio” observado en la inmunosenescencia. No obstante, el número de muestras analizado en el presente estudio ha sido reducido, de forma que para validar los resultados mostrados sería necesario ampliar el estudio a un mayor número de sujetos.

El conocimiento del fenotipo y actividad de células del sistema inmune asociado a la edad podría ser útil para establecer biomarcadores de riesgo inmune que puedan ayudar a la prevención de enfermedades asociadas a la edad en una sociedad actual en el que el número de personas mayores ha aumentado considerablemente, con el gasto socio-económico que ello supone.

Respecto a los resultados obtenidos en el estudio comparativo de células NK de LS y SP, se observa que el porcentaje de células NK es menor en LS respecto a SP. En lo referente a CD16, aunque se observa que aunque el porcentaje de células CD16

positivas es similar en SP y LS no ocurre lo mismo con su nivel de expresión, siendo éste significativamente inferior en LS, lo que concuerda con los estudios que indican un incremento de células NK tipo CD56<sup>bright</sup> en el sinovio de pacientes con lesiones inflamatorias candidatos a cirugía ortopédica (85). Se ha observado en LS que esta subpoblación de células NK además de una pobre expresión de CD16 se caracteriza por la secreción de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias que influyen en la comunicación entre las células NK y otras células (DCs, macrófagos) promoviendo la activación de dichas células NK reflejada a través de un incremento significativo del marcador de activación HLA-DR (86), tal y como observamos en los resultados obtenidos en el presente estudio. Para confirmar este fenotipo inmunosecretor observado en LS sería necesario realizar mediciones de los niveles de citocinas secretadas en el sobrenadante de los cultivos obtenidos de células NK tanto de LS como de SP.

En cuanto a los receptores de activación e inhibición, diversos estudios analizando la expresión en células NK de receptores de activación en el líquido pleural o lavado bronco-alveolar de pacientes con distintas patologías respiratorias, han reportado una amplia expresión de todos los receptores de activación como NKp30, NKp46, Nkp44 y NKG2D (87, 88). Los datos del presente trabajo obtenidos en este caso en LS de pacientes candidatos a cirugía ortopédica, están en la línea de los trabajos mencionados observándose un aumento significativo de los marcadores de activación NKG2D y NKp44, éste último marcador de activación sistémica de las células NK que no se observa en pacientes sanos (31). Además, se ha observado también un incremento del marcador de inhibición NKG2A en paciente con AR y que parece estar asociado a la disminución de la capacidad citotóxica observada en las células NK (89). En el presente estudio también se observa una disminución de la capacidad citotóxica en el LS y aunque la población incluida en el presente estudio no tiene patologías autoinmunes como la AR, su patología articular también puede conllevar un estado inflamatorio crónico. En este sentido, parece que el fenotipo de las células NK en LS puede estar asociado a lesión articular independientemente de su causa (artrosis o artritis) (18).

Los datos obtenidos parecen indicar que existe un fenotipo de las células NK en LS diferenciado respecto al observado en SP. En LS se observa un fenotipo

marcadamente “activado” reflejado en el aumento tanto de los receptores de activación anteriormente descritos como de los marcadores de activación CD69 y sobre todo HLA-DR indicando éste último que se trata de una activación persistente en el tiempo. Sin embargo, se produce una disminución significativa de la capacidad citotóxica que podría estar relacionada con el aumento también observado del receptor de inhibición NKG2A y/o con la disminución de la expresión de CD16 (implicado en la ADCC) y con el aumento de la producción de citocinas (fenotipo inmunosecretor) que conducen a la disfunción de las células NK.

La existencia de este posible fenotipo “activado e inmunosecretor” en células NK de LS y diferenciado del fenotipo de las células NK presentes en SP hace pensar en la importancia de estudiar una población celular en el entorno local en el que se está produciendo la afectación y no suponer el mismo fenotipo y capacidad funcional a nivel sistémico (SP), hecho también observado en otros estudios (87, 88) y que permitirá un mejor entendimiento de la patología asociada y así como de un diseño de la mejor estrategia terapéutica posible.

A la vista de estos datos, resulta importante estudiar las células NK (y en general cualquier tipo celular inmunológico implicado) en el entorno local en que se encuentran (en el presente trabajo, en LS) ya que como se ha visto, el fenotipo y capacidad funcional observado a nivel sistémico (SP), no tiene por qué ser el mismo que el observado a nivel local.

En cuanto al análisis funcional de las células NK en pacientes de AR, sólo se pudo realizar el ensayo de citotoxicidad en uno de los dos pacientes de los que se recibió muestra. En este paciente se observó que la capacidad citotóxica de las células NK era superior en LS respecto a SP, lo que contrasta con los estudios que indican que la capacidad citotóxica de las células NK está disminuida en LS (74). Sin embargo, el único dato de citotoxicidad del presente trabajo es muy preliminar y se debe realizar un estudio con un número más amplio de pacientes de AR para confirmar lo observado en este único paciente.

## 6.Conclusiones

Los resultados expuestos en el presente trabajo permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. Las células NK de sangre periférica tienden a presentar un fenotipo de activación inicial conforme se avanza en edad.
2. La capacidad citotóxica de las células NK en sangre periférica aumenta en el grupo de edad de 61-80 años para luego disminuir en el grupo de edad de mayores de 80 años.
3. Las células NK del líquido sinovial de pacientes candidatos a cirugía ortopédica muestran un fenotipo de activación persistente, en comparación con las células NK de sangre periférica de estos pacientes.
4. Las células NK del líquido sinovial de pacientes candidatos a cirugía ortopédica muestran una menor capacidad citotóxica en comparación con las células NK de sangre periférica de estos pacientes.

## 7. Bibliografía

1. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. 2010. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 22: 507-13
2. Orr MT, Lanier LL. 2011. Natural killer cell licensing during viral infection. *Adv Exp Med Biol* 780: 37-44
3. Waldhauer I, Steinle A. 2008. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27: 5932-43
4. Facchini A, Mariani E, Mariani AR, Papa S, Vitale M, Manzoli FA. 1987. Increased number of circulating Leu 11+ (CD 16) large granular lymphocytes and decreased NK activity during human ageing. *Clin Exp Immunol* 68: 340-7
5. Fietta A, Merlini C, Dos Santos C, Rovida S, Grassi C. 1994. Influence of aging on some specific and nonspecific mechanisms of the host defense system in 146 healthy subjects. *Gerontology* 40: 237-45
6. Mocchegiani E, Malavolta M. 2004. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 3: 177-84
7. Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S, Dan K. 2001. Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. *Clin Exp Immunol* 124: 392-7
8. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, Lord JM, Shaw AC. 2009. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 30: 325-33
9. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. 2012. Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol*
10. Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, Pena J, Solana R. 1999. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol* 34: 253-65
11. Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, Nayak L, Moss PA. 2006. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing* 3: 10
12. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debre P, Merle-Beral H, Vieillard V. 2010. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 9: 527-35
13. Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglini D. 1999. The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res* 20: 117-26
14. Penschow J, Mackay IR. 1980. NK and K cell activity of human blood: differences according to sex, age, and disease. *Ann Rheum Dis* 39: 82-6
15. Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Perumal SR, Miller SC. 2005. Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing* 2: 17
16. Lutz CT, Moore MB, Bradley S, Shelton BJ, Lutgendorf SK. 2005. Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech Ageing Dev* 126: 722-31
17. Garcia-Alvarez F, Gonzalez P, Navarro-Zorraquino M, Larrad L, Garcia-Alvarez I, Pastor C, Lozano R. 2008. Immune cell variations in patients with hip fracture. *Arch Gerontol Geriatr* 46: 117-24
18. de Matos CT, Berg L, Michaelsson J, Fellander-Tsai L, Karre K, Soderstrom K. 2007. Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion. *Immunology* 122: 291-301



19. Harris ED, Jr. 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 322: 1277-89
20. Andersson AK, Li C, Brennan FM. 2008. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10: 204
21. Ahern DJ, Brennan FM. 2011. The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators? *Immunol Lett* 136: 115-21
22. Huntington ND, Voshchenrich CA, Di Santo JP. 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 7: 703-14
23. Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Schlossman SF. 1988. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42: 181-211
24. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., Tutt M, Kumar V. 1986. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 137: 2735-9
25. Ljunggren HG, Karre K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11: 237-44
26. Lopez-Botet M, Bellon T. 1999. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 11: 301-7
27. Griffiths GM. 2003. Endocytosing the death sentence. *J Cell Biol* 160: 155-6
28. Robertson MJ. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71: 173-83
29. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214: 73-91
30. Cheent K, Khakoo SI. 2009. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* 126: 449-57
31. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19: 197-223
32. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42: 501-10
33. Lanier LL. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225-74
34. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106: 2252-8
35. Nagata S, Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-56
36. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271: 12687-90
37. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3: 673-82
38. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-53
39. Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. 1993. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73: 213-6
40. Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2: 420-30
41. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-45
42. Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Trapani JA, Smyth MJ. 2010. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol Rev* 235: 73-92
43. Chowdhury D, Lieberman J. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26: 389-420

44. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Mullbacher A, Anel A, Simon MM. 2004. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 167: 457-68
45. Pardo J, Balkow S, Anel A, Simon MM. 2002. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *Eur J Immunol* 32: 2881-7
46. Pardo J, Balkow S, Anel A, Simon MM. 2002. The differential contribution of granzyme A and granzyme B in cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptosis is determined by the quality of target cells. *Eur J Immunol* 32: 1980-5
47. Pinkoski MJ, Hobman M, Heibei JA, Tomaselli K, Li F, Seth P, Froelich CJ, Bleackley RC. 1998. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* 92: 1044-54
48. Schmidt RE, MacDermott RP, Bartley G, Bertovich M, Amato DA, Austen KF, Schlossman SF, Stevens RL, Ritz J. 1985. Specific release of proteoglycans from human natural killer cells during target lysis. *Nature* 318: 289-91
49. Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM. 1997. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 158: 2680-8
50. Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, Marzo I, Monleon I, Kaspar AA, Susin SA, Kroemer G, Krensky AM, Naval J, Anel A. 2001. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 167: 1222-9
51. Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y, Kanoh T. 1989. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies. *Life Sci* 44: 1655-64
52. Comin F, Speziali E, Martins-Filho OA, Caldas IR, Moura V, Gazzinelli A, Correa-Oliveira R, Faria AM. 2007. Ageing and Toll-like receptor expression by innate immune cells in chronic human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol* 149: 274-84
53. Andre P, Biassoni R, Colonna M, Cosman D, Lanier LL, Long EO, Lopez-Botet M, Moretta A, Moretta L, Parham P, Trowsdale J, Vivier E, Wagtmann N, Wilson MJ. 2001. New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol* 2: 661
54. Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Pena J, Solana R, Coligan JE. 2002. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 38: 637-60
55. Lesourd BM. 1990. [Immunologic aging. Effect of denutrition]. *Ann Biol Clin (Paris)* 48: 309-18
56. Ogawa K, Oka J, Yamakawa J, Higuchi M. 2005. A single bout of exercise influences natural killer cells in elderly women, especially those who are habitually active. *J Strength Cond Res* 19: 45-50
57. Mariani E, Monaco MC, Cattini L, Sinoppi M, Facchini A. 1994. Distribution and lytic activity of NK cell subsets in the elderly. *Mech Ageing Dev* 76: 177-87
58. Vitale M, Zamai L, Neri LM, Galanzi A, Facchini A, Rana R, Cataldi A, Papa S. 1992. The impairment of natural killer function in the healthy aged is due to a postbinding deficient mechanism. *Cell Immunol* 145: 1-10
59. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-40
60. Mariani E, Mariani AR, Meneghetti A, Tarozzi A, Cocco L, Facchini A. 1998. Age-dependent decreases of NK cell phosphoinositide turnover during spontaneous but not Fc-mediated cytolytic activity. *Int Immunol* 10: 981-9
61. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Malavolta M. 2009. NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins. *J Clin Immunol* 29: 416-25
62. Mariani E, Meneghetti A, Formentini I, Neri S, Cattini L, Ravaglia G, Forti P, Facchini A. 2003. Telomere length and telomerase activity: effect of ageing on human NK cells. *Mech Ageing Dev* 124: 403-8

63. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL. 2010. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116: 3865-74
64. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Flodstrom-Tullberg M, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116: 3853-64
65. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcao RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. 2011. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol* 72: 319-29
66. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, Porgador A, Honigman A, Plachter B, Mevorach D, Wolf DG, Mandelboim O. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6: 515-23
67. Arnon TI, Markel G, Mandelboim O. 2006. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol* 16: 348-58
68. Gayoso I. 2009. Phenotypic analysis of human NK cells in the healthy elderly. In *2nd European Congress of Immunology*, ed. RE Schmidt, pp. 105-9. Pianoro, Italy
69. Mariani E, Pulsatelli L, Neri S, Dolzani P, Meneghetti A, Silvestri T, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A. 2002. RANTES and MIP-1alpha production by T lymphocytes, monocytes and NK cells from nonagenarian subjects. *Exp Gerontol* 37: 219-26
70. Mariani E, Meneghetti A, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A. 2002. Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians. *Eur J Immunol* 32: 1524-9
71. Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G, Perricone R. 2011. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmun Rev* 10: 577-81
72. Flodstrom-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Hoglund P, Ljunggren HG. 2009. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 21: 634-40
73. Dalbeth N, Callan MF. 2002. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum* 46: 1763-72
74. Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H, Kawakami A, Origuchi T, Matsuoka N, Eguchi K. 2009. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 19: 245-52
75. Leavenworth JW, Wang X, Wenander CS, Spee P, Cantor H. 2011. Mobilization of natural killer cells inhibits development of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14584-9
76. Lo CK, Lam QL, Sun L, Wang S, Ko KH, Xu H, Wu CY, Zheng BJ, Lu L. 2008. Natural killer cell degeneration exacerbates experimental arthritis in mice via enhanced interleukin-17 production. *Arthritis Rheum* 58: 2700-11
77. Soderstrom K, Stein E, Colmenero P, Purath U, Muller-Ladner U, de Matos CT, Tarner IH, Robinson WH, Engleman EG. 2010. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13028-33
78. Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. 1998. Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol* 64: 703-12
79. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331: 44-9

80. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. 1999. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. *Exp Gerontol* 34: 79-93
81. Benlahrech A, Donaghy H, Rozis G, Goodier M, Klavinskis L, Gotch F, Patterson S. 2009. Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon gamma Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)* 9: 386-403
82. Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N, Augugliaro R, Bottino C, Ciccone E, Moretta L. 1991. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 174: 1393-8
83. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97: 159-65
84. Borrego F, Pena J, Solana R. 1993. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol* 23: 1039-43
85. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJ, Lee YC, McMichael AJ, Callan MF. 2004. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 173: 6418-26
86. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A. 2006. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 214: 219-28
87. Katchar K, Soderstrom K, Wahlstrom J, Eklund A, Grunewald J. 2005. Characterisation of natural killer cells and CD56+ T-cells in sarcoidosis patients. *Eur Respir J* 26: 77-85
88. Schierloh P, Yokobori N, Aleman M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, Alves L, Abbate E, de la Barrera SS, Sasiain MC. 2005. Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy. *J Immunol* 175: 6852-60
89. Walsh CE, Ryan EJ, O'Farrelly C, Golden-Mason L, FitzGerald O, Veale DJ, Bresnihan B, Fearon U. 2011. Differential expression of NK receptors CD94 and NKG2A by T cells in rheumatoid arthritis patients in remission compared to active disease. *PLoS One* 6: e27182