

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

ESTABLECIMIENTO DE VALORES NORMALES DE LINFOCITOS
ASESINOS NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE BOGOTÁ

PAOLA ANDREA GARCÍA RINCÓN

JULIANA NAVARRO HERNÁNDEZ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, JULIO DE 2004

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

ESTABLECIMIENTO DE VALORES NORMALES DE LINFOCITOS
ASESINOS NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE BOGOTÁ

PAOLA ANDREA GARCÍA RINCÓN

JULIANA NAVARRO HERNÁNDEZ

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar al título de Bacterióloga.

DIRECTORA

CATHERINE CIFUENTES

BACTERIÓLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, JULIO DE 2004

ESTABLECIMIENTO DE VALORES NORMALES DE LINFOCITOS
ASESINOS NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE BOGOTÁ

PAOLA ANDREA GARCÍA RINCÓN

JULIANA NAVARRO HERNÁNDEZ

CATHERINE CIFUENTES BSc, MSc
DIRECTORA

ADRIANA CUELLAR BSc, MSc
CODIRECTORA

ANGELA UMAÑA BSc, PhD
MSc
DECANA FACULTAD DE CIENCIAS

AURA ROSA MANASCERO BSc,
DIRECTORA CARRERA DE
BACTERIOLOGÍA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, JULIO DE 2004

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

ESTABLECIMIENTO DE VALORES NORMALES DE LINFOCITOS
ASESINOS NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE BOGOTÁ

PAOLA ANDREA GARCÍA RINCÓN

JULIANA NAVARRO HERNÁNDEZ

APROBADO

Dr. GERMÁN DARÍO DÍAZ ,M.D. Ph.D. Dra. ADRIANA RODRIGUEZ, BSc. Sc.

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

NOTA DE ADVERTENCIA

*Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1946.
“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus
alumnos en sus tesis de grado”*

AGRADECIMIENTOS

Dra CATHERINE CIFUENTES ROJAS, Bacterióloga de la Universidad del Valle, por brindarnos la oportunidad, apoyo y paciencia en la elaboración del presente trabajo durante el transcurso de su desarrollo.

Dra. ADRIANA CUÉLLAR ÁVILA Bacterióloga y docente de la Pontificia Universidad Javeriana y JOHN MARIO GONZÁLEZ, MD. Ph.D. Department of Neurology Keck School of Medicine, USC California U.S.A. por permitirnos trabajar en la Unidad de Citometría de flujo de la Pontificia Universidad Javeriana y prestarnos su colaboración y conocimientos científicos en la realización de éste trabajo.

Agradezco fielmente a Dios por brindarme todos los medios necesarios para llevar a cabo con excelencia el presente trabajo de grado. Porque engrandeció el amor, la confianza y la comprensión de nuestros padres y hermano para brindarme apoyo .Gracias por tu bendición porque fue conforme a tu amor.

**ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE LINFOCITOS ASESINOS
NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE BOGOTÁ**

INDICE

		Pág
1	Introducción	17
2	Marco teórico	19
2.1.	Células asesinas naturales	19
2.1.1.	Grupos de identificación	20
2.1.1.1.	CD 16	20
2.1.1.2.	CD 56	20
2.1.1.3	Otros grupos de diferenciación	21
2.1.2.	Receptores	22
2.1.21.	Receptores inhibitorios	22
2.1.2.1.1.	Similares a la familia de las inmunoglobulinas	22
2.1.2.1.2.	Similares a la familia de las lectinas	23
2.1.2.2.	Receptores activadores	24
2.1.2.2.1.	Similares a la familia de las inmunoglobulinas	24
2.1.2.2.2.	Similares a la familia de las lectinas	25
2.1.2.2.3.	Correceptores activadores	25
2.1.2.2.3.1.	2B4 y NKp80	25
2.1.2.2.3.2.	NKp46, NKp44 y NKp30	26
2.1.2.2.4.	Otros medios de activación	26
2.1.3.	Interleucinas	27
2.1.3.1.	Interleucina 15 (IL 15)	27
2.1.3.2.	Interleucina 12 (IL 12)	28
2.1.3.3.	Interleucina 5 (IL5)	29
2.1.4.	Pérdida de lo propio por parte de las células NK	29
2.1.4.1.	Restricción de activación de las células NK por antígenos de MCH-I	30
2.1.5.	Mecanismos de citotoxicidad	31
2.1.5.1.	Citotoxicidad mediada por perforinas	32
2.1.5.2.	Inducción de apoptosis a través de receptores	33
2.1.6.	Papel de las células NK en algunas alteraciones fisiopatológicas	34
2.1.6.1.	Defensa contra células malignas	34
2.1.6.2.	Transplante de médula ósea	37
2.1.6.3.	Defensa contra infecciones	37

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

2.1.6.4.	Regulación de la hematopoyesis	38
2.1.6.5.	Papel en el embarazo	39
2.1.6.6.	Regulación de inmunidad y autoinmunidad	41
2.1.7.	Los efectos en los tratamientos contra el cáncer	42
2.2.	Citometría de flujo	44
2.2.1.	Definición de citometría de flujo	44
2.2.2.	Anticuerpos en citometría de flujo	54
2.3.	Valores de referencia	58
2.3.1.	Generalidades de los valores normales	58
2.3.2.	Aspectos en la población para la determinación de valores normales	59
2.3.2.1.	Muestra	59
2.3.2.2.	Diseño estadístico	60
2.3.2.3.	Generalidades del cuestionario	61
2.3.3.	Consideraciones preanalíticas y analíticas	62
3.	Justificación y planteamiento del problema	64
4.	Objetivos	66
4.1.	Objetivo general	66
4.2.	Objetivos específicos	66
5.	Materiales y métodos	67
5.1.	Tipo de estudio	67
5.2.	Población	68
5.3.	Individuos	68
5.4.	Recolección de datos	69
5.5.	Criterios de exclusión e inclusión	69
5.5.1.	Del individuo	69
5.5.2.	De la muestra	70
5.6.	Tamaño de la muestra	71
5.7.	Muestra de sangre	71
5.8.	Recuento leucocitario	72
5.9.	Evaluación de marcadores por citometría de flujo	72
5.9.1.	Marcaje	72
5.9.2.	Adquisición de análisis	73
5.10.	Plan de análisis estadístico	74
6.	Resultados	75
6.1.	Análisis descriptivo de la población	75
6.2.	Estandarización	77
6.3.	Validación de los métodos de recuento de linfocitos en valores relativos	79
6.3.1.	Estratificación por género y edad	82
6.4.	Valores relativos y absolutos de las células asesinas naturales (Natural killer)	84
6.4.1.	Establecimiento de la población celular y especificidad del método	84
6.4.2.	Análisis descriptivo de la población CD3(-)/CD16CD56(+)	86
6.4.3.	Distribución de los valores normales por	88

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

	percentiles	
6.5.	Correlación de los valores normales de células asesinas naturales con otras publicaciones	91
7.	Discusión	94
8.	Conclusiones	99
9.	Perspectivas	101
	Anexos	102
	Bibliografía	

**ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE LINFOCITOS ASESINOS
NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE BOGOTÁ**

LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla nº2.1.	Fluorocromos usados con FACSCallibur	52
Tabla nº5.1.	Lista de variables	74
Tabla nº6.1.	Estadística descriptiva del total de la población (n=95)	79
Tabla nº6.2.	Valores absolutos de linfocitos en mujeres	83
Tabla nº6.3.	Valores absolutos de linfocitos en hombres	83
Tabla nº6.4.	Descripción estadística de los valores relativos y absolutos de células CD3(-)/CD16CD56(+)	87
Tabla nº6.5.	Distribución de los valores celulares por percentiles	90
Tabla nº 6.6.	Comparación de los valores normales de linfocitos asesinos naturales del presente estudio con otras publicaciones	92
Tabla nº 6.7.	Valores normales de células natural killer de la población de donantes voluntarios del Banco de Sangre de Bogotá y de donantes de Bancos de Sangre de Italia	93

**ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE LINFOCITOS ASESINOS
NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE BOGOTÁ**

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura nº2.1.	Receptores inhibitorios de las células NK	24
Figura nº2.2.	Pérdida del complejo mayor de histocompatibilidad	30
Figura nº2.3.	Inhibición de las células NK por medio de ligandos de CMH-I	31
Figura nº2.4.	Mecanismos de citotoxicidad	33
Figura nº2.5.	Citómetro de flujo COAS Becton Dickinson FACSCalibur	45
Figura nº2.6.	Esquema de la instrumentación del citómetro de flujo	48
Figura nº2.7.	Diagrama esquemático del citómetro de flujo	51
Figura nº2.8.	Esquema de unión específica del anticuerpo al antígeno de superficie de una célula	55
Figura nº 6.1.	Distribución por género	76
Figura nº 6.2.	Distribución etárea	76
Figura nº 6.3.	Titulación de los anticuerpos CD3FITC-CD16/56PE	77
Figura nº 6.4.	Metodologías de recuento de linfocitos (%)	80
Figura nº 6.5.	Análisis de las muestras por citometría de flujo	85
Figura nº 6.6	Distribución de los valores de células CD3 (-)/CD16CD56 (+) por percentiles	89

RESUMEN

Las células asesinas naturales (Natural killer) son una subpoblación de linfocitos granulares, que debido a su capacidad lítica contra células tumorales y células infectadas con virus y parásitos intracelulares, se encuentran relacionadas con diversas patologías como cáncer, abortos espontáneos, endometriosis y en trasplantes de médula ósea, lo que les confiere un gran interés clínico. El objetivo del presente trabajo es establecer valores normales de células NK. Para ello se recolectaron 95 muestras de sangre de donantes voluntarios de sangre, a los cuales luego de realizarles recuentos celulares directos e indirectos, manuales y automatizados, se les evaluó la expresión de los marcadores CD3, CD16 y CD56 por citometría de flujo, con el objeto de cuantificar la población de células con el fenotipo CD3(-)/CD16(+)/CD56(+). Los datos obtenidos se procesaron con estadística descriptiva y cálculo de percentiles obteniendo valores absolutos de leucocitos (Total 4400-8450cel/ μ l; mujeres 4888-8688cel/ μ l; hombres 4358-8263cel/ μ l), y absolutos y relativos de linfocitos (Total 21-43%, 1354-3031cel/ μ l; mujeres 24-40%, 1427-2880cel/ μ l; hombres 21-45%, 1326-3081cel/ μ l). Los valores normales de linfocitos asesinos naturales establecidos para la población total, están comprendidos entre 6% que equivale a 118cél/ μ l y 28% a 603cél/ μ l. Cuando la población se estratificó por género, se obtuvo que en las mujeres los valores de células

CD3(-)/CD16CD56(+) se encuentran entre 5% que equivale a 102cél/ μ l y 24% que corresponde a 542cél/ μ l. En los hombres, los valores de las células CD3(-)/CD16CD56(+) se encuentran entre 6% que equivale a 128cél/ μ l y 29% que corresponde a 619cél/ μ l. Estos resultados fueron correlacionados con otros datos reportados en otras poblaciones,⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹ observándose que no se encuentran diferencias significativas a pesar de compararlos con individuos con raza y hábitos culturales y alimenticios diferentes a los de la actual población de estudio. En este trabajo hemos demostrado que los valores normales de los linfocitos NK en hombres son mayores que los presentados en las mujeres y que esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La importancia de establecer los valores normales de células asesinas naturales radica en otorgar diagnósticos y pronósticos clínicos precisos acerca de la fisiopatología de un individuo. En tal caso, el establecimiento de valores normales llega a ser útil en el control de rechazos de trasplantes de médula ósea, donde un aumento moderado del número de células NK indica la presencia de un proceso de rechazo,¹⁻¹¹ aportando de esta manera en el esclarecimiento del estudio de la relación celular Receptor- Donante.¹¹⁻¹²⁻²⁷⁻³²

Palabras claves: Citometría de flujo. Linfocitos asesinos naturales. Sanos. Valores normales.

ABSTRACT

The natural killer cells are an inner of granular lymphocytes due to their lytic capacity against the tumor cells and cells infected with virus and intracellular parasites. This type of lymphocytes killer are related to a sort of pathologies as cancer, miscarriage, that gives them a lot of clinical concern. The goal in this project is to stablish regular values of NK cells, for this purpose we collect 95 blood samples from voluntary donors "healthy donors" from the blood bank. Then we tested them for cellular count by hematological analysis using a Coulter counter and manual protocols, the marker CD3, CD16 and CD56 expression was evaluated to them by flow cytometry, with the intention of quantifying the population of cells with the phenotype CD3(-)/CD16(+)/CD56(+). The data of the samples were process using descriptive statistic, calculating percentiles procedures the normal values for natural killers lymphocytes established in the total pattern are found between the 6% that is the value equivalent to 118 cell/ml and 28% for 603cell/ml. When the population was classified by sex, women obtained the following values of cells CD3(-)/CD16CD56(+), they were found between 5% equivalent to 102cell/ml and 24% that correspond to 542cells/ml. And Men, the values of the same cells are found between 6% equivalent to 128cél/ μ l y 29% that correspond to 619cél/ μ l. We saw that there aren't significant differences although they were compared against people with race and different cultural and living habits related to the

other pattern studied. The importance of establishing the normal values of cells NK is in granting precise diagnoses and clinical prognoses about the pathologies of an individual. In such case, the establishment of normal values gets to be useful in the control of rejections of transplants of bone marrow, where a moderate increase of the number of cells NK indicates the presence of a process by ricochet, contributing this way in the elucidation of the study of the cellular relation Receiving Donor.

KEY WORDS: Flow cytometry. Healthy .Natural killers lymphocytes. Normal values.

1. INTRODUCCIÓN

Las células asesinas naturales (del inglés natural killer, NK) son un grupo de linfocitos incluidos en las barreras internas no específicas del sistema inmune,¹⁻²⁻³ con capacidad de lisar células tumorales y células infectadas con virus u otros parásitos intracelulares a través de mecanismos citotóxicos⁴⁻⁵ y de secreción de citocinas.⁶⁻⁷ Estas células carecen del receptor de linfocitos T (TCR) y de receptor de linfocitos B (BCR), y expresan en su superficie los marcadores CD16 y CD56; que permiten su identificación por citometría de flujo.⁸⁻⁹

Las células asesinas naturales se han visto involucradas en diferentes patologías.⁶⁻¹⁰ En pacientes con cáncer, la citotoxicidad de las células NK se reduce por varios factores fisiológicos debido a tratamientos como radioterapia¹¹⁻¹² Además, en desordenes hematológicos e inmunológicos de pacientes sospechosos de presentar alteraciones en la respuesta inmune celular específica,¹³ la inmunotipificación de linfocitos en sangre periférica es una herramienta importante en el diagnóstico.

A pesar de su utilidad en la clínica, en la comunidad científica la literatura acerca de los linfocitos asesinos naturales como parte de estudios para definir

la distribución de las subpoblaciones de linfocitos en la población sana es escasa, a pesar de que los marcadores de superficie de los linfocitos se pueden usar como herramientas para estimar las variaciones de los niveles linfocitarios para cada subgrupo celular por citometría de flujo. Las instituciones calificadas optan por manejar medias y percentiles de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica, sin hacer ninguna clase de diferenciación de este grupo de células, lo que puede no ser representativo para la población analizada, otorgando datos que no se correlacionan perfectamente con la realidad fisiopatológica del paciente, por la diferencia en el lugar de ubicación, alimentación y enfermedades habituales.

Los avances en la instrumentación de citometría de flujo, reactivos y técnicas han abierto una nueva era para las investigaciones clínicas y biológicas otorgando poderosos instrumentos que contribuyen a un mejor desempeño en el diagnóstico clínico, en el pronóstico de enfermedades y en la investigación de funcionamiento celular.¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶ Por todo lo anterior, en este trabajo se analizan muestras de sangre de una población adulta de individuos sanos por medio de la técnica de citometría de flujo; con el propósito de determinar los valores normales de linfocitos NK CD3-/CD16+CD56+.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CÉLULAS ASESINAS NATURALES

Las células asesinas naturales son linfocitos granulares no B no T, que actúan en la inmunidad innata;¹⁷ tienen la capacidad de lisar rápidamente células tumorales, células infectadas por virus y otros patógenos intracelulares;¹⁸ corresponden a cerca del 15% de los linfocitos de sangre periférica y tienen una alta localización en el bazo, con una disminución en los pulmones, hígado, y tracto gastrointestinal.¹⁻⁴⁻¹⁹ Es característico de los linfocitos asesinos naturales humanos expresar las moléculas CD16 (FcγRIII) que corresponde al receptor III para la porción Fc de las cadenas gamma de las Igs y CD56 que es una molécula de adhesión hemofílica perteneciente a la superfamilia Ig (N-CAM). Además una característica importante de este tipo celular es que carece de CD3. El marcador celular CD16 es comúnmente utilizado para identificar las células NK en poblaciones purificadas de linfocitos de manera no muy específica en poblaciones totales ya que el CD16 es también expresado por neutrófilos, macrófagos y algunas células Tγδ. En los granulocitos está unido a la superficie de membrana por phosphatidyl inositol glycan (PIG), más en las células NK, macrófagos y células Tγδ expresan la molécula de forma transmembranal.¹⁻⁴⁻¹⁹

Por otro lado, en cuanto a su morfología, es característico de los linfocitos asesinos naturales humanos ser células grandes con un citoplasma amplio

que contiene gránulos utilizados para la citotoxicidad, carecen del marcador de linfocitos T ayudadores CD4 y cerca de la mitad expresan marcador de los linfocitos T citotóxicos CD8 (solo la forma a/a).¹⁻²⁰⁻²¹

2.1.1. Grupos de diferenciación

2.1.1.1. CD16.

El CD16 es una molécula (~70KD) perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y sirve como receptor de baja afinidad para la porción Fc de IgG; a través del cual las células NK reconocen y asesinan células cubiertas con anticuerpos, mecanismo celular conocido como citotoxicidad mediada por células dependiente de Anticuerpos (CCDA).¹⁻²²⁻²³ La permanencia del CD16 sobre las NK es debido a los incrementos de los niveles de Ca^{2+} y de la cascada de eventos bioquímicos similares a los que activan las células T.²²

De esta manera, para accionar el mecanismo de CCDA es necesario que las células blanco estén cubiertas de anticuerpos en su superficie, que unan al CD16.²² La señalización intracelular de esta glicoproteína involucra la interacción de tirosinas quinasas (Src-familia), motivos de activación ITAM, ZAP70.¹⁷

2.1.1.2. CD56.

Las células NK también expresan CD56, una forma de molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM), que puede enlazar las células unas con otras durante el proceso de adhesión hemofílico. Se expresa en baja densidad en cerca del 95% de linfocitos de sangre periférica (SP). La mayoría coexpresa

CD16, mientras que las células CD16-/CD56+ existen en una mínima cantidad (2%) en SP.¹¹

Por otra parte, la relación de expresión de CD16 y CD56 varía entre las células NK de diferentes sitios del cuerpo; y las células que tienen alta expresión de CD56 y baja expresión de CD16 tienen bajos niveles de citotoxicidad.¹

2.1.1.3. Otros Grupos de Diferenciación.

En el pasado se usaba como marcador para las células NK el CD57, sin embargo, éste detecta los linfocitos asesinos naturales en muy baja cantidad. Además, existen otros marcadores como CD25 y CD69 para estas células, que sirven para evidenciar la actividad y proliferación, ya que cuando éstas son activadas tiene unos cambios consistentes en los marcadores de superficie.⁴⁻¹¹

De la misma forma, el CD2 es una glicoproteína de membrana (50kDa) perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresado sobre la superficie de los linfocitos T y en las células NK²³; otro marcador importante es el CD28 que sólo es expresado en células NK fetales, con una pérdida considerable en células NK maduras de sangre periférica²³ y el CD34+ presente en progenitores de médula ósea, identificadas también por su marcador temprano de linaje CD7.¹¹

2.1.2. Receptores.

2.1.2.1. Receptores Inhibitorios.

Existen dos clases estructurales de receptores inhibitorios sobre las células NK: los primeros son llamados receptores similares a las inmunoglobulinas (Igs), y el otro grupo corresponde a los receptores similares a lectinas.¹⁹⁻²²

2.1.2.1.1. Similares a la familia de las inmunoglobulinas.

Sus genes están ubicados en el cromosoma 19, a este grupo pertenecen KIR; KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, siendo específico para cada grupo de alelos HLA-I.²³⁻²⁴⁻²⁵ Los receptores KIR son encontrados sobre una fracción de las células T que expresa los marcadores de memoria; de ésta manera, no sólo sirve para contrarrestar la actividad de las NK si no también para restringir la activación de las células T de memoria que reconocen las células huésped.¹⁻¹⁹

Se pueden identificar dos subfamilias KIR, con base en el número de dominios tipo Inmunoglobulina en la región extracelular de las moléculas y en el tamaño del motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina.²³

La subfamilia KIR3D contiene tres dominios tipo Inmunoglobulina, mientras que la estructura de KIR2D contiene dos dominios tipo Inmunoglobulina, las moléculas KIR2D reconocen principalmente ligandos HLA-C, el cual contiene variedad de alelos haciendo de éste polimórfico siendo reconocidos por diferentes miembros de la familia KIR2D. Sin embargo, KIR2D no es estrictamente específico para HLA-C, pues también reconoce HLA-B, que es identificado en segundo lugar por la molécula KIR3DL. El reconocimiento de HLA-B y HLA-C polimórficos por KIR3D y KIR2D respectivamente puede ser

influenciado por la composición de los péptidos que se enlazan en el surco del MHC-I.²³ Según algunos autores, muchos alotipos de HLA-A y HLA-B aparentemente no tienen correspondencia con ninguna de las moléculas KIR, indicando que el repertorio KIR no incluye todos los alotipos humanos de clase I.²⁴

2.1.2.1.2. Similares a la familia de las lectinas.

Sus genes están ubicados en el cromosoma 12.¹⁹⁻²²⁻²⁵ Dos receptores pertenecientes a los tipo lectina son CD94 (encontrado en su mayoría en células fetales) y NKG2A.²⁶⁻²⁷ El CD94 es codificado por un gen, mientras que la familia NKG2 compromete cuatro genes, NKG2A, NKG2C, NKG2E, y NKG2D/F23 a pesar de esto, el NKG2 no es capaz de expresarse sobre la célula, así que el CD94 actúa como medio de transporte para instalar NKG2 en la superficie²³. Dentro de la familia de las lectinas también se encuentra el receptor CD161 (NKR-P1), el cual se expresa sobre las células T y B activadas. Esta glicoproteína activa las células T vírgenes y las células NK.²¹

El receptor CD94/NKG2A indirectamente detecta la expresión de los antígenos clásicos-I HLA-A, B, C, que permite la expresión de HLA-E.²¹ La inhibición de las células NK a través del receptor CD94/NKG2A puede ser más completo utilizando los KIR.¹⁻²³ Normalmente en individuos “sanos” éstos receptores de muestran una diversidad y prevalencia más alta de expresión de los receptores inhibitorios que de los de activación.²⁶ Los receptores CD94/NKG2A pueden reconocer ciertos alotipos de HLA-C diferentes o similares a las posiciones reconocidas por KIR2D.²³

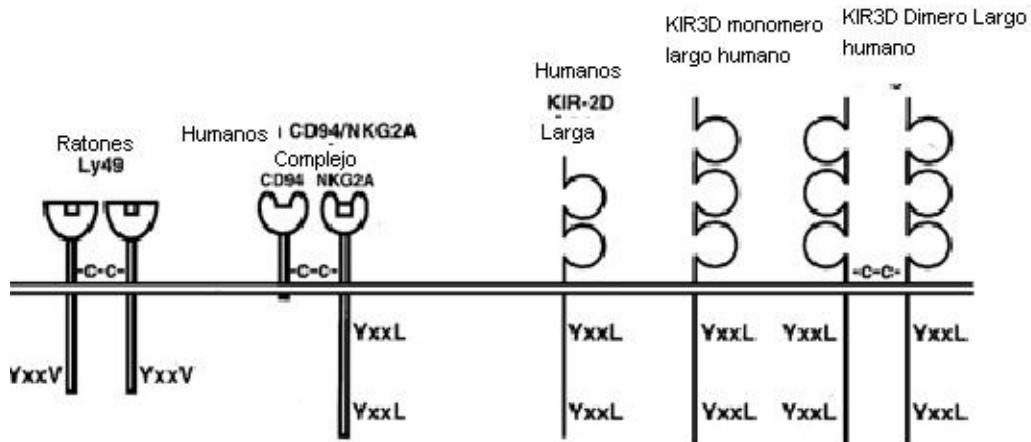


Figura 2.1. Receptores inhibitorios de las células NK

Adaptado de LANIER Lewis L. NK cell receptor. 1998, Immunology .

2.1.2.2. Receptores Activadores

2.1.2.2.1. Similares a la familia de las inmunoglobulinas.

A este grupo pertenecen KIR; KIR2DS1, KIR2DS2, estos receptores activadores también interactúan con diferentes productos de alelos de HLA de la célula blanco, tal interacción activadora puede ser sola o junto con otras moléculas por ejemplo: CD2/LFA responsable de la activación de las células NK.¹⁹

2.1.2.2.2. Similares a la familia de las lectinas.

De igual forma, la familia KIR la familia semejante a las lectinas, presenta una forma activadora; el CD94 unido con receptor activador NKG2C; es decir el

CD94 puede inhibir o activar las células NK dependiendo con quien se encuentre, y en los dos casos se une al HLA-E, teniendo en cuenta que éste se expresa cuando se encuentra presente HLA-G.²⁸

El NKR-P1 (CD161) receptor que enlaza a la molécula tipo lectina, es expresado en tejido normal. El enlace de las células NK con las células susceptibles es seguido por un incremento en el metabolismo del fosfoinositol con un resultado en el incremento de calcio, magnitud que es proporcional a la sensibilidad de la célula para una lisis subsiguiente.²⁷

2.1.2.2.3. Correceptores activadores.

2.1.2.2.3.1. 2B4 y NKp80.

Casi todas las células NK expresan el correceptor 2B4, el cual activa células citolíticas T y monocitos,¹ este correceptor enlaza a CD48 que es ampliamente expresado sobre células hematopoyéticas, sirviendo como un activador que contribuye a la lisis de estas células.²⁹ Por otra parte, la literatura demuestra que el NKp80 se une inespecíficamente a un ligando aún no identificado, tanto 2B4 como NKp80 se han documentado en asociación con NKp46, cuando en la célula blanco no se expresa CD48.²⁹

2.1.2.2.3.2. NKp46, NKp44, NKp30.

Son reconocidos como receptores activadores. NKp46 está involucrado en la lisis de algunos tumores,²² NKp30 únicamente está expresado sobre las células NK, a diferencia de NKp44 que es inducido sobre la activación de la célula NK.¹ Estos receptores se encuentran involucrados en la citotoxicidad

natural de la célula, correlacionado con la capacidad de las NK para destruir ampliamente líneas tumorales.²⁶

2.1.2.2.4. Otros medios de Activación.

Las células dendríticas (CD) son centinelas del sistema inmune derivados en su mayoría de la línea mieloide y menor frecuencia de línea linfoide, se encuentran en sangre periférica en forma inmadura, reconocen a su alrededor células muertas y en el trayecto hasta nódulos linfáticos éstas células maduran presentando los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).³⁰

Las células dendríticas son capaces de inducir proliferación de las células NK, ésta capacidad estimuladora es independiente de la maduración de las CDs según algunos autores; sin embargo en los resultados de éstos estudios se observa que la proliferación de las células NK es aumentada en las CD inmaduras.²⁹

En cocultivo de las NK con CD existe un leve cambio en el fenotipo de las CD, en la adquisición de funciones efectoras por parte de las células NK y en la susceptibilidad de las CD inmaduras al ataque de las células NK. En la activación de las células NK por medio de las CD el receptor más importante es el NKp30, evidenciada su funcionalidad por anticuerpos contra el receptor; provocando de ésta forma una baja en la lisis contra las células y una disminución en la producción de INF- γ de las células NK.²⁹ De ésta manera se ha evaluado los receptores NKp46 y NKG2D con CD concluyendo que tienen cierto grado de participación en la activación a diferencia del receptor NKp44

que no muestra ninguna vinculación en la activación con éste tipo de células, a pesar de ser inducido sobre la activación de las células NK.²⁹

2.1.3. Interleucinas. (IL)

La producción de citocinas por parte de las células NK juega un papel importante en las funciones inmunorreguladoras de la respuesta contra virus, bacterias e infecciones parasitarias.³¹

Las células NK pueden ser activadas por citocinas como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α .²³ La IL-2 estimula las células asesinas a proliferar, secretar citocinas, y lisar células blanco, la IL-15 ayuda en el desarrollo de la célula, y la IL-18 activa la célula en forma sinérgica con la IL-12.¹

2.1.3.1. Interleucina 15 (IL-15).

La IL-15 es producida por múltiples tejidos y tiene una gran participación en la ontogenia y la maduración de las células NK; en cultivo las células CD34+ (células progenitoras de las células NK) con IL-15 se estimula a la diferenciación de CD56- en ausencia de estroma y de citocinas, éstas células tienen alta expresión de CD56 en sangre periférica, y poca expresión de CD16, existiendo una mayor expresión del receptor tipo lectina CD94/NKG2, con una disminución de la proporción de receptores KIR. Las células NK constitutivamente expresan IL-2/15R pero carecen de IL-2 durante la respuesta temprana de la inmunidad innata.¹⁸

La IL-15 actúa junto con la IL-12 para inducir la activación de macrófagos, INF- γ y TNF- α . Las células NK estimuladas con IL-15 e IL-12 producen

aproximadamente diez veces más la cantidad de INF- γ , TNF- α , y CSF-GM. La acción de la IL-15 sola es ser un potencial estimulador de la producción SCF-GM.¹⁸

2.1.3.2. Interleucina 12 (IL-12).

La IL-12 es producida inicialmente por células presentadoras de antígenos seguida de la estimulación con bacterias o productos bacterianos tipo lipopolisacáridos (LPS), sin embargo, la IL-12 también es producida por fagocitos, sirviendo como mediador de la respuesta inmune innata para microorganismos intracelulares; activa las células, promoviendo la producción de INF- γ y linfocitos T, aumenta la actividad citolítica de células NK y citotóxica, promoviendo al desarrollo de linfocitos ayudadores Th1.¹⁷

De esta manera, la respuesta biológica de la IL-12 es mediada a través del enlace específico al receptor de alta afinidad que está presente sobre las células NK y otros linfocitos activados,³² también actúa junto a la IL-18, citocina producida por macrófagos en respuesta a lipopolisacáridos, el cual es buen inductor de inmunidad mediada por células. Estas citoquinas en sinergia actúan como estimulador del INF- γ por las células NK y linfocitos T (LT).³²

2.1.3.3. Interleucina 5 (IL-5).

In vivo, la interleucina 5 juega un papel importante en la producción, activación y localización de eosinófilos en varias condiciones alérgicas. Los actuales paradigmas científicos sugieren que las células ayudadoras Th2 son la principal fuente de producción de IL-5. Sin embargo, in vivo la producción de IL-5 por

parte de los linfocitos asesinos puede influenciar sobre la respuesta inflamatoria asociada con la eosinofilia.³¹

2.1.4. Pérdida de lo propio por parte de las NK.

Las células NK defienden el organismo de diferentes formas y una de ellas puede ser discriminada entre lo normal y la aberración celular. De acuerdo a lo anterior, una de las funciones de las células NK es reconocer la carencia de expresión de MHC-I¹⁸⁻³³, como se ha visto en los rechazos de linfoma alogénico y de injerto de médula ósea provocados por las células NK. La alta expresión de MHC-I puede incitar a que los tumores sean más malignos debido a que los habilita a sobrevivir con la interacción de las células NK.³³ Las células asesinas naturales destruyen células infectadas con virus, y células tumorales que presentan bajos niveles de MHC-I con los que pudieron escapar al reconocimiento de las células T.²⁹

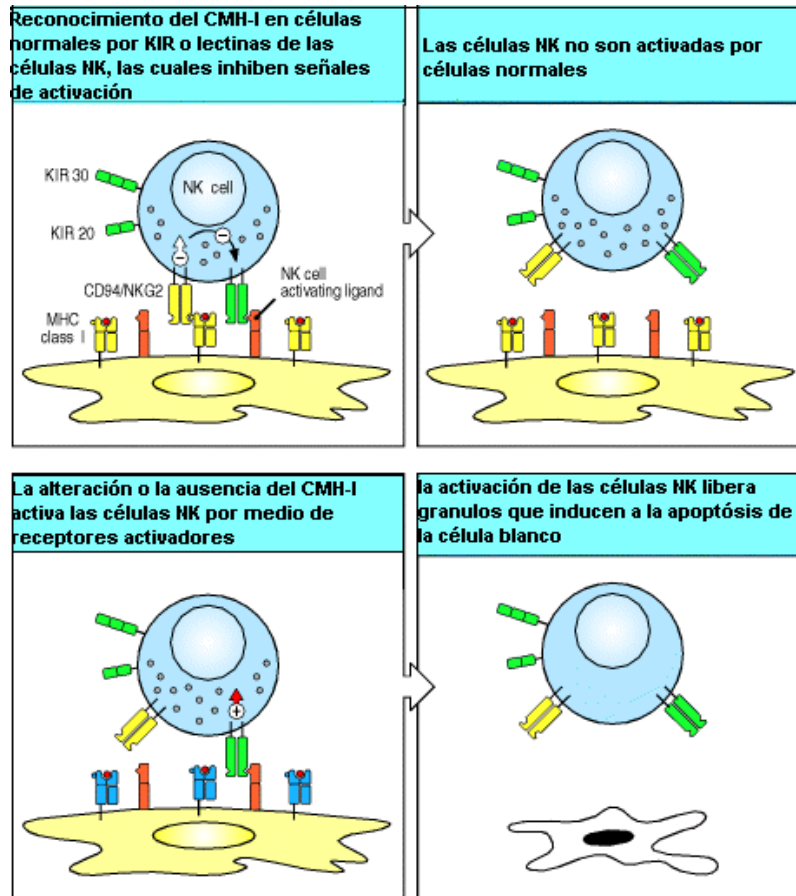


Figura 2.2. Pérdida del Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Adaptado de: www.immunology.com celular and molecular/janeway

2.1.4.1. Restricción de activación de las células NK por Antígenos del MHC-I.

En general, los antígenos MHC-I, entre los que se incluyen los antígenos clásicos de HLA; HLA-A, HLA-B, y HLA-C y los no clásicos HLA-E y HLA-G inhiben la citotoxicidad de las células NK. Todas las células asesinas naturales expresan por lo menos un receptor inhibitorio análogo los antígenos de HLA, lo cual permite el reconocimiento por parte de las células NK de lo propio y lo

extraño. La pérdida o la alteración de los antígenos del MHC-I permite la activación de la NK contra las células huésped.³³

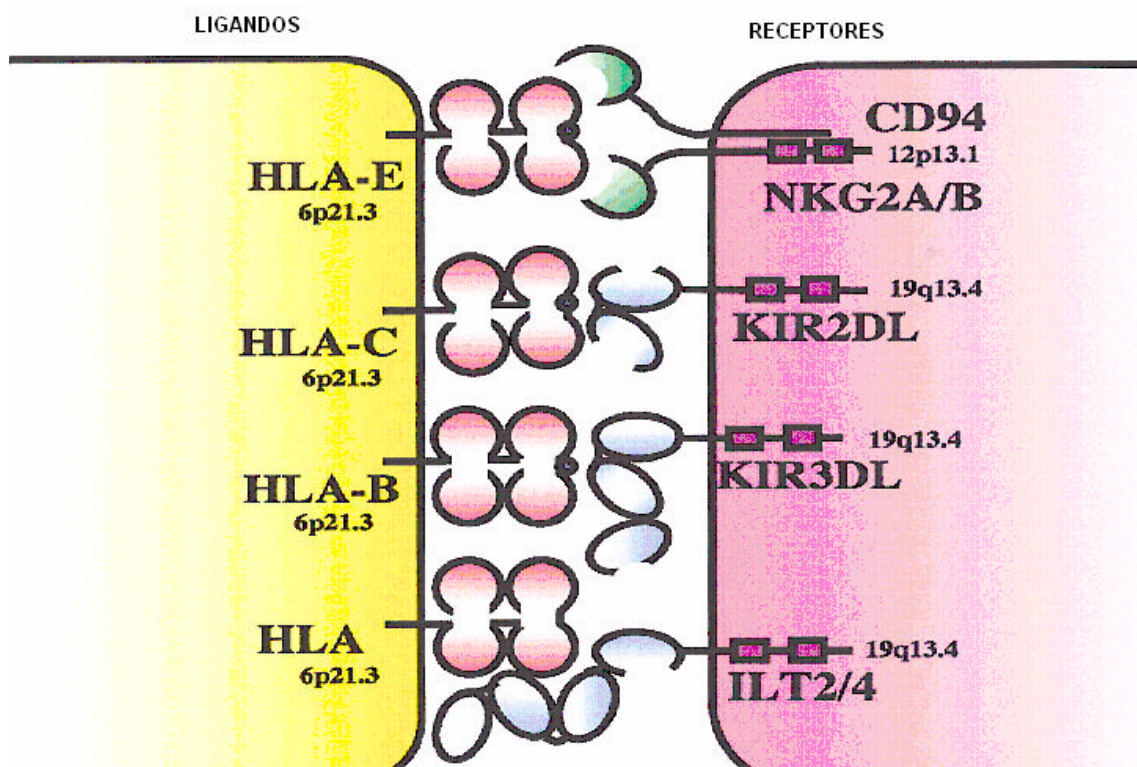


Figura 2.3. Inhibición de las células NK por medio de ligandos de CMH-I

Adaptado de www.nature.com

2.1.5. Mecanismos de citotoxicidad.

El número y la actividad de las células asesinas naturales varían con la edad del paciente, sobre todo en infantes recién nacidos en los cuales tiene una significativa reducción de la actividad comparada con la población adulta, ya que en ésta última los estudios han demostrado que la actividad de las células NK se encuentra incrementada en hombres comparada con mujeres.¹⁴ Las

células NK tienden a aumentar con la edad, resultando en aproximadamente dos veces más entre los recién nacidos y los de edad media.¹⁴ También se ha evidenciado en los pacientes mayores de 80 años un modesto aumento en la citotoxicidad de las células NK, esto puede ser debido a la maduración del linaje.¹⁴ La actividad también varía según el grupo sanguíneo, Rhesus o la clase de HLA, del mismo modo varía la actividad según las infecciones, el alcohol, el stress, la contaminación, y uso de diferentes medicamentos.¹⁴

Una gran característica de las células NK es, el proceso de lisis que puede ocurrir en minutos después de la exposición de las células blanco a las células efectoras. De esta forma, los mecanismos de citólisis pueden ocurrir en cuatro etapas: las células blanco son enlazadas (adhesión), activación de la célula efectora (reconocimiento/ transducción de señal), entrega de señal letal hacia la célula blanco (golpe letal) y separación de la célula efectora.¹⁴

2.1.5.1 Citotoxicidad mediada por perforinas.

Las perforinas son proteínas que forman poros en las células blanco, este daño celular es causado por la liberación (exocitosis)¹⁴ de gránulos de proteinasas granenzima A y B, que entran a la célula (lisis por osmosis coloidal) y activan la fragmentación del DNA .¹⁴⁻²¹

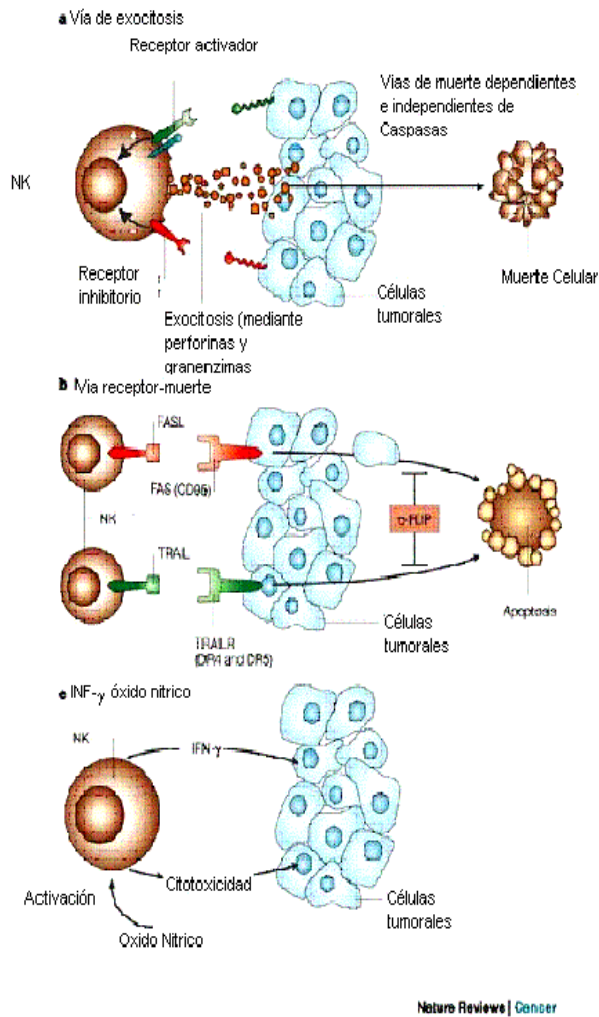


Figura 2.4. Mecanismos de citotoxicidad de las células NK.

Adaptada de www.nature/reviews/cancer.com

2.1.5.2. Inducción de apoptosis a través de receptores.

Entre los receptores encargados de la muerte celular encontramos el CD95 (Fas). Sin estimulación de las células NK no se expresa el fas ligando (FasL), impidiendo de ésta forma la apoptosis en las células Fas+. Mediante la activación de CD16, las células NK secretan citocinas que puede resultar en apoptosis como consecuencia del Fas-L.¹⁻³⁴

2.1.6. Papel de las células NK en algunas alteraciones fisiopatológicas.

2.1.6.1. Defensa contra células malignas.

Las células NK se distinguen por su habilidad de reconocer ciertas células tumorales, su potencial está enfocado contra las células malignas. La IL-2 y el INF- γ activa las células NK para atacar a células tumorales, teniendo en cuenta esto, clínicamente se han utilizado estas moléculas para inducir activación de las células NK y el aumento de citotoxicidad¹⁻⁴.

En contraste con la citotoxicidad de los linfocitos T los cuales son unidos al MHC-I con un péptido específico, las células NK lisan células blanco deficientes en la expresión de proteínas del MHC-I; de ésta manera las células NK son un mecanismo inmunovigilante de lo propio.²² Los defectos moleculares y de biosíntesis en la deficiencia de HLA humano incrementa la sensibilidad de las células NK, manifestándose de forma incorrecta los marcadores de superficie.²⁷⁻³³

Las células NK y los linfocitos con actividad asesina (LAK) juegan un papel terapéutico en los tratamientos contra el cáncer, por la capacidad de las células NK para lisan células inmaduras en médula ósea y timo. Las células NK cultivadas con IFN- γ o IL-2, junto con linfocitos de sangre periférica (PBL) son capaces de lisan monocitos humanos infectados.¹ En animales, se ha visto la importancia de éstas células NK con baja funcionalidad, pues el incremento en el desarrollo de tumores es significativo²⁷. Varios estudios han demostrado

que la citotoxicidad natural en sangre periférica es reducida en quienes tienen familiares con antecedentes de cáncer²⁷.

Uno de las principales dificultades en pacientes con cáncer es la amplia variación biológica que existe en el número y actividad de las células NK en comparación con los pacientes control³⁵, a pesar de esto, existen pacientes que no tienen cambios en el número de CD56+ (carcinoma prostático), pero una actividad lítica mucho más baja. En las investigaciones con éstos pacientes se ha determinado que la citotoxicidad natural se encuentra correlacionada con el estadio de la enfermedad.¹⁴

La actividad de las células NK en nódulos linfáticos ha sido marcadamente más baja que el encontrado en sangre periférica. El número de células CD16+, CD56+ es reducido en nódulos linfáticos de pacientes con cáncer gástrico. Las clases de células NK en enfermedades linfoproliferativas de linfocitos granulares (LDGL) es caracterizada por una proliferación anormal de linfocitos, con alteraciones en el fenotipo de las células NK generalmente (CD3-CD56+CD16+), e incluye forma diferente de clasificación, de condiciones asintomáticas definida como linfocitosis crónica NK agresivo usualmente en enfermedades fatales como la leucemia NK-LDGL.²⁶ En éstos pacientes se observa en su mayoría la presencia de receptores inhibitorios como CD94/NKG2A, receptores como ILT2 y en muy pocos casos receptores con ligandos activadores como CD94/NKG2C.²⁶

La proporción de receptores de citotoxicidad natural (NCR) también se halla en baja expresión. Se encuentra la expresión de NKp30 en todos los pacientes

con algunas excepciones, similarmente NKp46 es detectado en una pequeña fracción de las células NK. NKp44 tiene una expresión normal sólo en células NK activadas y esto realmente no son niveles significativos en linfocitos de sangre periférica de pacientes. A diferencia de éstos receptores, los correceptores (NKp80 y 2B4) del receptor NKG2D se expresan homogéneamente en la mayoría de los pacientes, es decir, que las células NK de muestras de sangre periférica en pacientes NK-LDGL, son habitualmente caracterizados por una expresión de KIR, y una baja expresión de superficie de los NCR.²⁶ Tal vez ésta sea la causa de la gran patogenicidad de este tipo de enfermedades.

Para el reconocimiento de receptores inhibitorios y activadores en algunos estudios son utilizados anticuerpos con diferentes magnitudes de fluorescencia, sin embargo, la intensidad de fluorescencia es diferente en la poblaciones de células NK, lo cual puede ser útil para diferenciar receptores de activación de receptores de inhibición dependiendo al anticuerpo utilizado.²⁶ Para el estudio de cáncer también se ha descrito la activación de las células NK por parte de las células dendríticas, las cuales ayudan a retardar el crecimiento de tumores.²⁹

2.1.6.2. Transplante de médula ósea.

En el estudio de las células NK se ha encontrado la existencia de por lo menos un receptor inhibitorio sobre ellas, de ésta manera las células NK no rechazan trasplantes autólogos de médula ósea con MHC idéntico. La respuesta de las células NK a la médula ósea transplantada es mediada por receptores inhibitorios, lo que indica que los órganos pueden ser rechazados por NK, lo cual difiere significativamente del rechazo de los injertos por células T.¹⁻¹¹ Las células T rechazan injertos extraños por que son reconocidos y activados por antígenos extraños; las células de médula ósea no son rechazadas simplemente por que son reconocidas como extraños, sino porque carecen de antígenos propios.¹

El anterior mecanismo descrito es conocido como regulación de transplante contra el huésped, las células NK pueden ser importantes en el transplante de médula ósea no sólo por su capacidad de lisar células hematopoyéticas sino también por su capacidad de alterar el curso del transplante.¹

2.1.6.3. Defensa contra infecciones.

Las células asesinas naturales son importantes para defensa contra patógenos intracelulares, por el mecanismo de lisis directa. Su importancia se debe a la producción de citocinas, lo cual le permite regular la actividad de otras células, incluyendo IFN- γ , FSC-GM, TNF-a, IL-3, IL-5, IL-10 y IL-13.¹⁹ El INF- γ promueve la respuesta Th1 apropiada para infecciones intracelulares; la IL-4 promueve la respuesta Th2 incluyendo la producción de IgE, de IgG4,¹ y la

activación de eosinófilos apropiada para infecciones por parásitos extracelulares. La capacidad de las células NK para secretar IL-5 es significativa en la respuesta de eosinófilos para alergias en la cavidad peritoneal.¹

La producción de IL-5 en modelos de inflamación alérgica in vitro, es dependiente de IL-2 y requiere la presencia de células blanco específicas para las células NK. Sin embargo, la secreción de IL-5 e INF- γ es detectada en altos niveles con la adición de IL-4, IL-12, IL-10 y IL-15. Esto permite concluir que el microambiente de las citoquinas presentes en el inicio de la respuesta inflamatoria puede inducir a la polarización de un patrón de citoquinas en las células NK, el cual, es similar al patrón reconocido en los tipos celulares Th1 y Th2, influenciando de forma particular el resultado de la respuesta inmune.³¹

2.1.6.4. Regulación de hematopoyesis.

Las células NK lisan células inmaduras, como blastos hematopoyéticos. Además pueden regular el crecimiento de éstas células por la liberación de citocinas.¹⁹ En pacientes con aumento de células NK, se ha demostrado características clínicas de neutropenia, anemia, trombocitopenia, artritis y vasculitis.¹⁹

La citotoxicidad de las células asesinas naturales ejercen un papel importante contra las células tumorales. Sin embargo, las células NK disminuyen en número y en su función durante el curso de enfermedades como leucemia mieloide crónica (LMC).³⁴ La leucemia es una enfermedad mieloproliferativa

fatal caracterizada por la expansión masiva de progenitores hematopoyéticos con la aparición de células del linaje granulocítico en sangre periférica.³⁴ Normalmente, el número absoluto de células NK es profundamente reducido en pacientes con estados tardíos de la enfermedad en comparación con personas saludables; por consiguiente ésta reducción de la actividad de las células asesinas naturales permite la progresión de la enfermedad.³⁴

2.1.6.5. Papel en el embarazo.

De manera interesante, las células NK son abundantes en el útero, donde expresan altos niveles de CD56 y poco o nada de CD16, a diferencia de las células NK de sangre periférica que en su mayoría son CD16+.³⁶ Varios reportes sugieren que las células NK uterinas pueden provocar endometriosis, (implantación de fragmentos de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina), al reconocer como extraño el tejido semialogénico fetal, abortos o que su presencia aumentada se debe a la posibilidad de protección del feto contra infecciones.¹⁻³⁶ Las células NK uterinas producen IL-15, lo cual incrementa la expresión de mediadores citolíticos. La IL-15 puede estar involucrada en la producción de citocinas por las células NK, jugando un papel importante en la diferenciación o en la homeostasis, de manera particular de las células NK uterinas.¹

Una de las grandes preguntas en la inmunología es como las células NK maternas toleran el tejido fetal semialogénico, cuando son éstas células precisamente las responsables de reconocer lo propio y lo no propio en el organismo.²⁴⁻²⁶ Existen varias respuestas para este interrogante una de ellas es

que el tejido fetal evade la detección de las células NK maternas por la pérdida de expresión de antígenos que provocan el ataque de las células NK convirtiéndolo en un sitio inmunológico privilegiado;²⁴⁻²⁶ también se ha planteado que los linfocitos maternos pueden suprimir (turn off) las funciones efectoras de la defensa inmune de la madre. De la misma manera, algunos autores han descrito que en las mujeres embarazadas existe una alta regulación de los receptores inhibitorios de NK donde su principal ligando es HLA-G.²⁴⁻²⁶

El tejido fetal carece de HLA-A, B, tiene bajos niveles de HLA-C, suficiente para la protección del feto contra la destrucción por células T pero no por células NK.²⁶ En las células trofoblásticas fetales existe la presencia de HLA-G que se expresa sobre la superficie de las células como un complejo trimolecular, el cual comprende una cadena pesada asociado de forma no covalente con β -microglobulina.²⁴ La presencia de ésta molécula protege al feto de la respuesta inmunológica alogénica por parte de la madre, haciendo relevancia en que las células B están involucradas con la generación de plasmocitos responsables de la secreción de anticuerpos contra partes vitales del feto o de la placenta³⁶. De ésta forma, la respuesta inmunológica de la madre contra las células de la placenta podrían aumentar la pérdida fetal en etapas tempranas del embarazo.¹⁸⁻³⁶

Algunos receptores inhibitorios KIR, tienen reacción cruzada con HLA-G como si actuara con un HLA clásico (KIR2DL4).²⁴ La expresión de HLA-G sobre las células hace posible la presencia de HLA-E, dando paso a la acción del

receptor CD94/NKG2A, el cual en algunos casos actúa directamente con HLA-G,²⁴ inhibiendo de la misma manera el ataque de las células NK. De esta manera, la expresión del HLA-G actúa como ligando de estos receptores para evitar la destrucción de las células fetales.

2.1.6.6. Regulación de inmunidad y autoinmunidad.

Los linfocitos asesinos naturales hacen parte de las barreras internas no específicas del sistema inmune y liberan citoquinas que regulan la respuesta inmune.¹⁹

En pacientes con trombocitopenia autoinmune existe un leve aumento de las células NK en circulación. La expresión de granenzima B parece ser debido a las células NK, las cuales se aumentan en sangre y en el sinovio en pacientes con artritis reumatoidea (RA). Aún no es muy claro, pero se sugiere que las células NK estimulan la activación de células B en respuesta a antígenos.¹⁻²¹

La infiltración del tejido en artritis reumatoidea está compuesta por células T y B. Esto es indicativo de que la sinovitis reumatoidea está asociada con la formación de los tejidos linfoides terciarios; la acumulación de las anteriores células, macrófagos y células dendríticas, afectan los mecanismos homeostáticos entrando a poblar linfocitos que son anormales en pacientes con artritis reumatoidea. Debido a un bloqueo transcripcional del gen CD28, clonalmente las células T CD4+ carecen de la mayor molécula coestimuladora CD28, existiendo de ésta manera en altas cantidades células T CD4+/CD28- en pacientes con artritis reumatoidea (AR).²¹

Las células CD4+/CD28- liberan grandes cantidades de INF- γ y contienen perforinas intracelulares y granzima B, promoviendo la habilidad para lisar células blanco. Como las células NK, las CD4+/CD28-R son citotóxicas y pueden expresar el marcador CD57.²¹ Algunos receptores de las células NK como CD158a y CD158b se encuentran en éstas patologías. CD158b es expresado por CD16+ (NK) junto con una pequeña población de CD8+ encontrándose también sobre CD4+. El CD158a parece ser exclusivo de células T CD28-.²¹

Los pacientes con artritis reumatoidea con células CD4+/CD28- bajos, también tienen bajos niveles de expresión CD8+ y una mediana expresión de CD158b+.²¹ El segundo miembro de la familia de las lectinas CD161 se expresa también en éstas enfermedades pero habitualmente lo encontramos en personas saludables. Por el contrario, el receptor CD94 no ha sido detectado sobre células CD4+ indicando que la aparición de los receptores de las células NK sobre las células T es un proceso selectivo.²¹

2.1.7. Los efectos de los tratamientos contra el cáncer

En el caso de cirugía como tratamiento tumoral, la depresión post-operación en la actividad de las células NK no cambia con el tiempo de la anestesia, esto varía según la enfermedad.¹¹ En pacientes con cáncer de ovario etapa III, y IV la reducción en la actividad de las células NK no es variable, en otros casos la reducción de las células NK son evidentemente reducidas en el segundo día después de la operación, como en pacientes de cirugía de abdomen. Esto se diferencia de pacientes con cáncer de cuello y cabeza en los cuales no se

demuestran cambios en la actividad de las células NK después de un año de la cirugía.¹¹

Una de las drogas más utilizada en terapia contra el cáncer es el tamoxifen que como antagonista del estrógeno, bloquea la síntesis de la hormona. En su mayoría es utilizada por mujeres con cáncer de seno tanto para premenopausica como para posmenopáusicas. En la actualidad, el éxito de ésta droga es la capacidad de enlace con la citotoxicidad natural, pues en pacientes posmenopáusicas se ha demostrado un significativo incremento en citotoxicidad de las células NK después de la cuarta semana de estar ingiriendo tamoxifen.¹¹⁻³⁷

La radioterapia induce marcadamente efectos de linfopenia de células T resultando en una continua disminución después de un tratamiento de tres años.¹¹ Estudios con animales han sugerido que las células NK son resistentes ha este método pero incluye que las células progenitoras son relativamente sensibles a la radioterapia.¹¹ La duración de la supresión de las células NK depende del área de exposición, y de que tan grave sea la enfermedad, así por ejemplo en pacientes con cáncer de seno se reduce la actividad de las células NK y la expresión de CD16 aparentemente en una semana, pero retorna a la normalidad durante tres o cuatro meses.¹¹

2.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

Los avances modernos en la instrumentación de citometría de flujo, reactivos, y técnicas han abierto una nueva era para las investigaciones clínicas, patológicas y biológicas. Recientes avances en el hardware, software, producción de anticuerpos monoclonales, fluorocromos y reactivos citoquímicos han brindado poderosas herramientas para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. De ésta manera, la citometría de flujo es ampliamente usada en investigaciones, inmunología clínica y hematología para realizar inmunofenotipificaciones, clasificación de células, cuantificaciones del diámetro celular y estructura interna, determinaciones acerca del potencial de membrana, volumen y análisis de ADN sobre células en suspensión, ³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰ detectando también, células apoptóticas. ²⁰

2.2.1. Definición de citometría de flujo.

La citometría de flujo permite el análisis de poblaciones celulares, cuantificando sus componentes heterogéneos; éste método automatizado utiliza un citómetro de flujo que adquiere un gran número de células (4.000-20.000/segundo) individualizadas en suspensión, dentro de un sistema de flujo laminar sobre el que incide un haz de luz láser (sistema electrónico) que proporciona información acerca de sus características físico- químicas. ⁴¹

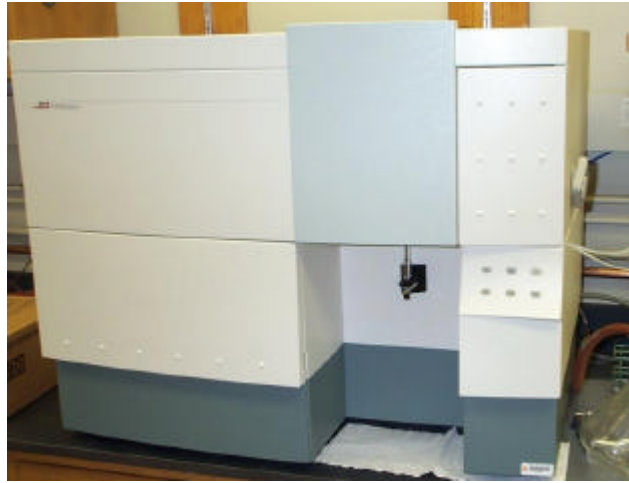


Figura 2.5. Citómetro de flujo COAS Becton Dickinson FACSCalibur
Adaptado de <http://bioloc.coas.oregonstate.edu/facilities/FCMwebsite.html>

El FACSCalibur[®] Becton Dickinson junto con el software CELLQuest permite el análisis rápido y altamente sensible.⁴⁰⁻⁴¹

El diseño de experimentos en citometría de flujo involucra tres fases distintas e independientes; la primera es la fase pre-citometría de flujo en la que se encuentra la preparación de reactivos, preparación celular, diseño de protocolos y marcaje de las células con los reactivos fluorescentes. La segunda es la fase de citometría de flujo, en la cual se encuentra el procesamiento por medio del citómetro de flujo de las células marcadas; y la colección de datos para realizar las mediciones de cada célula. Finalmente, la fase de análisis que corresponde al estudio de los datos recopilados.⁴⁰

En la metodología, las células en suspensión son llevadas a una cámara de flujo celular en donde se hacen las mediciones. En éste dispositivo, las células

pasan a través de un pequeño canal en donde son seguidas por una corriente eléctrica. Cuando las células entran en el canal, la corriente de flujo se disminuye debido a que las células no son conductoras. Los circuitos electrónicos detectan la disminución en la corriente y de ésta manera la presencia de la célula. El aire presionado o el sistema de bomba de empuje inyectable saca la muestra a través de un tubo de diámetro de 200 μm atravesando la inclinación del inyector y dentro de la punta. El orificio final de la punta de flujo mide aproximadamente de 50-250 μm ¹⁷. El enfoque hidrodinámico induce a las células a viajar en un perfeccionamiento singular a través de la región de las medidas ópticas con una proporción de 5000 células por segundo.⁴¹

El dispositivo fluídico está compuesto por un sistema de circulación con una solución tampón que permite el paso de las células.⁴⁰⁻⁴¹

Para controlar el posicionamiento alineado de las células que permite realizar las medidas ópticas, los citómetros de flujo usan el encauzamiento hidrodinámico. Una vez éste fluido hidrodinámico entra en la cámara de flujo se reduce el diámetro del flujo de la región de detección y aumenta la velocidad. Esta técnica confina las células a un flujo central muy estrecho, de tal modo que las células sigan una trayectoria hacia la región de detección.⁴¹

Cuando las células son iluminadas por el rayo láser ocurren dos fenómenos. En el primero, las células absorben y dispersan la luz incidente en todas direcciones, esto forma dos señales de dispersión, conocidas como ángulo de

dispersión frontal (Forward Scatter), relacionada con el área de la superficie celular y dispersión de 90° (Side Scatter), relacionada con la granularidad o complejidad celular. El segundo fenómeno es debido a la emisión de fluorescencia celular natural (autofluorescencia) o a la fluorescencia con las que se marcan las células. La luz dispersada es captada por detectores, usualmente fotomultiplicadores (PMTs) o fotodiodos. Estos tipos de detectores convierten la señal de luz en una señal eléctrica que puede ser procesada por una unidad de análisis y procesamiento de datos.⁴¹

Los componentes ópticos permiten colección óptica, generalmente se utiliza láser (gas) porque emite ondas de luz paralelas y monocromáticas gracias a el conjunto de lentes, los cuales son utilizados para regular y focalizar el rayo láser. La colección de espejos y filtros dirigen las longitudes de onda hacia los detectores ópticos designados.⁴¹

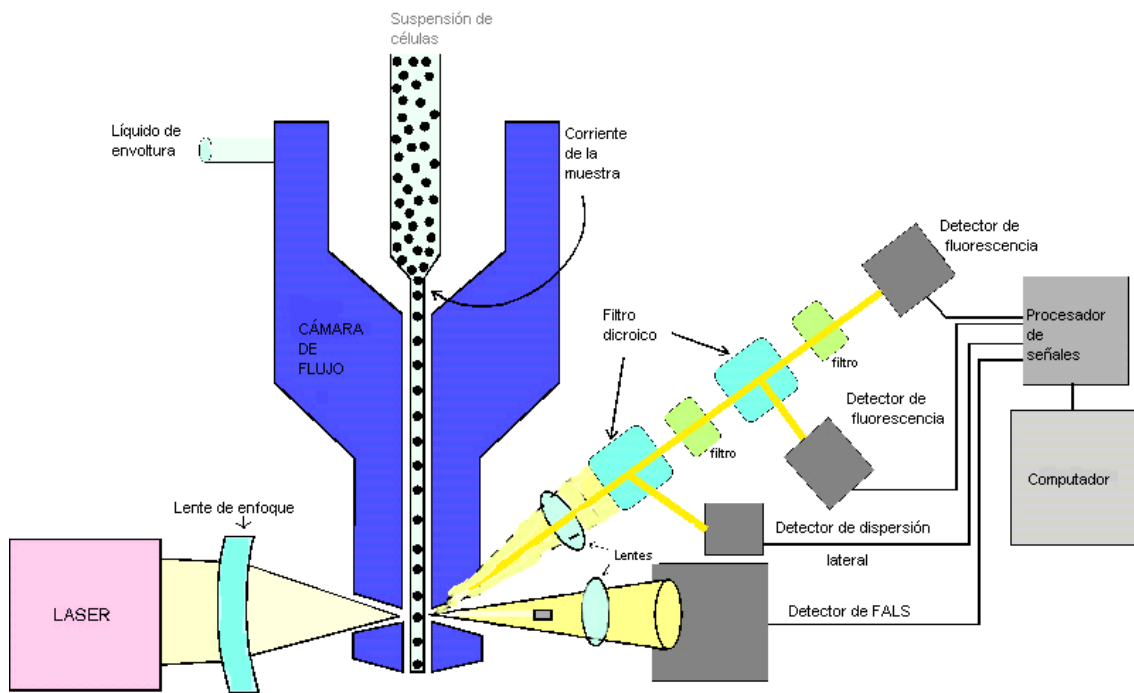


Diagrama esquemático los instrumentos del citómetro de flujo

Figura 2.6. Esquema de la instrumentación del citómetro de flujo.

Adaptado de www.kumc.edu/instruction/medicine/pathology/ed/ch_4/c4_flow.html

El láser de ión argón es el comúnmente usado en citometría de flujo. En un láser, los fotones (la unidad básica de la radiación) son expulsados en un alineamiento de frecuencia regular, produciendo ondas constantes. Esta característica distingue de luz láser de luz blanca ordinaria, la cual emite longitudes de onda inconstantes y en muchas direcciones. La luz del láser es exclusivamente de un color o longitud de onda. Los láseres ofrecen radiaciones extremadamente altas, estabilidad y pureza espectral; es por éstas propiedades, que puede ser enfocada a áreas iguales de dimensión celular.⁴¹

Los fotomultiplicadores son sensibles al rayo de luz, por tal razón son utilizados para rayos de luz débiles (fluorescencia); mientras que los fotodiodos son utilizados para rayos de luz fuerte (dispersión de luz). Como la célula

pasa a través de la cámara de flujo dispersando la luz incidente que es recogida por los detectores, la longitud de tiempo que mide el paso de la célula a través del rayo es proporcional al ancho de la célula. En el caso que la célula esté marcada con un fluorocromo, el fotomultiplicador medirá la cantidad de fluorescencia emitida por la célula mientras esta pasa por el rayo de luz, produciendo una señal proporcional al contenido de marcador celular.⁴¹

Los detectores convierten la señal de luz en una señal eléctrica que puede ser procesada por una unidad de análisis y procesamiento de datos. Convierten cada señal óptica o señal análoga a señales digitales electrónicas proporcionales y establece interfaces con el computador para transferir los datos.

Los datos son recolectados y almacenados en una lista (matriz) o histograma gracias al sistema de análisis y herramientas. En la lista, se almacenan las mediciones de los diferentes parámetros. Los datos son representados por medio de histogramas permitiendo ocupar un menor espacio de almacenamiento y correlacionar dos parámetros simultáneamente; graficando la intensidad de la fluorescencia en el eje X y el número de células en el eje Y. Los histogramas son específicos para analizar los datos seleccionados y predeterminados por el operador. Se diferencia del modo de lista porque en el último es necesario que el operador seleccione solo los parámetros que serán analizados.⁴¹

En la determinación de dos parámetros celulares medidos simultáneamente es útil graficar los datos en graficas de contornos o de puntos, en donde los

parámetros de intensidad se ubican sobre el eje Y y X, mientras que el número de células sobre el eje Z. Éstos datos son generados en forma de matriz de 64 X 64. El número de filas y columnas corresponde a la medición de los dos parámetros; el valor que se halla en alguna intersección en la matriz es igual al número de células con el valor del parámetro correspondiente a éste punto en la matriz.⁴¹

Gracias al uso de lentes frente al fotomultiplicador e incorporar un segundo fotomultiplicador de filtro diferente tres mediciones pueden ser realizadas.

El fotodiodo se encuentra situado directamente enfrente de colector de dispersión del ángulo delantero, compilando la información acerca del tamaño y viabilidad celular. El otro fotodetector (el fotomultiplicador) esta situado en un ángulo recto, recoge la dispersión del ángulo de 90°, proporcionando la información acerca de la granularidad y la estructura celular.⁴¹

Cuando el rayo del láser atraviesa la célula, los fluorocromos unidos a la célula son excitados y emiten un haz de luz con una longitud de onda. El lente refleja la luz hacia abajo a una longitud de onda específica. Esta modificación es usada cuando se realiza un marcaje con más de un solo marcador, que se excitan a la misma longitud de onda pero emite una diferente longitud de onda. Los lentes reflejan los fotones hacia adelante y hacia atrás a lo largo del dispositivo, aumentando la emisión por amplificación. Los reflectores consisten típicamente de un prisma que permite la selección de una sola longitud de onda.⁴¹

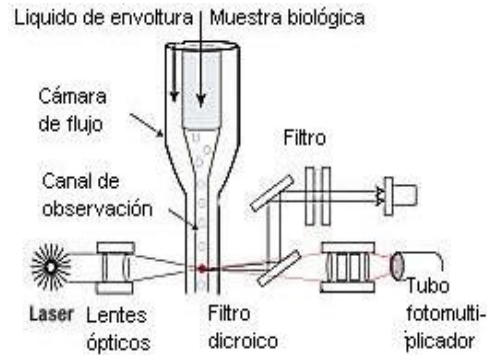


Figura 2.7. Diagrama esquemático del citómetro de flujo

Adaptado de www.engin.umich.edu/research/images/mifcschematic2.jpg

La fluorescencia es emitida por fluorocromos los cuales, son sustancias químicas que tienen la propiedad de absorber fotones de alta energía procedentes de radiación ultravioleta o del espectro visible (espectro de absorción), lo que produce una redistribución de sus electrones de tal forma que algunos de ellos pasan a ocupar una órbita más alejada del núcleo (excitación), dicha situación es inestable por lo que el electrón tiende a volver a su estado fundamental o primitivo, emitiendo la energía absorbida de una longitud de onda distinta (espectro de emisión). La luz de multicolor es separada dentro de su longitud de onda (color) y cada uno es observado por diferentes detectores. ⁴¹

La tabla nº 1 muestra la lista de los fluorocromos más comunes usados con FACS calibur®Becton Dickinson. En la actualidad, muchos citómetros tienen dos láseres que operan a diferente longitud de onda y excitan hasta cuatro fluorocromos simultáneamente. El análisis de tres fluorocromos puede ser diseñado utilizando yoduro de propidio, Percp, Cychrome, Rojo 670 o 7-amino-actinomicina D (7-AAD), entre otros. Las combinaciones más comunes de

fluorocromos comprende isotiocianato (FITC, fluorescencia verde; detector FL1), ficoeritrina (PE, fluorescencia naranja; detector FL2), y PE-Cy5 o PerCP (fluorescencia roja; detector FL3).⁴¹

Fluorocromos	Pico de emisión (nm)	Detector	Filtro
Isocianato de fluoresceína (FITC)	525 (verde)	FL1	530/30
Ficoeritrina (PE)	575 (naranja)	FL2	585/42
Yodo de propidio (PI)	620 (rojo)	FL2, FL3	670 LP
PerCP	675 (rojo)	FL3	670 LP
PE-Cy (CyChromo)	767 (rojo)	FL3	670 LP
APC	660	FL4	661/16
Cy-5	670	FL4	661/16

Tabla 2.1. Fluorocromos usados con FACS Calibur

Adaptado de Current protocols in immunology, Flow cytometer analysis using the Becton Dickinson FACSCalibur, (2001) Unit 5.4.2, p:50.

El eje horizontal presenta la amplitud de fluorescencia o luz dispersada por célula, mientras que eje vertical muestra la frecuencia en que se presenta el evento. El gráfico de puntos es efectivo para mostrar la correlación entre 2

parámetros.⁴¹ Cada vez que el láser atraviesa una célula se realiza la medición de cómo mínimo cinco parámetros, dependiendo del equipo. Estos cinco parámetros son FSC, SSC, FL1, FL2 y FL3. Con el segundo láser, el FACScalibur® Becton Dickinson es capaz de medir la fluorescencia como un parámetro adicional FL4.³⁹

Los detectores convierten los fotones en una proporción igual de voltaje. Éste voltaje es convertido a valores digitales apropiados para su almacenamiento. De ésta forma, los citómetros de flujo procesan esos datos en una variedad de pasos que lo reducen a un único valor. Cada medida de los detectores produce un pulso que representa el tiempo contra la intensidad.⁴¹

El análisis de los datos de estudios inmunológicos es generalmente diseñado para establecer la frecuencia de subpoblaciones y la cantidad relativa de determinantes antigénicos o receptores celulares.⁴¹

Algunos estudios son diseñados para determinar la frecuencia de las células con una característica en particular. Por ejemplo: el porcentaje total de células que reaccionan positivamente con un anticuerpo fluorescente.

2.2.2. Anticuerpos en citometría de flujo.

El uso de anticuerpos en pruebas sensibles y específicas para la detección de antígenos de superficie celular ha proveído el entendimiento de las bases de la respuesta inmune.⁴¹

Aunque la tecnología de anticuerpos fluorescentes que complementa otras técnicas para la identificación de antígenos tisulares estaban disponibles en 1950, el mayor avance en la aplicación de ésta tecnología no ocurrió antes de 1961 cuando Moller demostró que las células in vitro pueden ser marcadas con complejos anticuerpo-fluoresceína.⁴¹ Moller claramente describió la presencia de antígenos de histocompatibilidad en células de ratón aunque faltó correlacionar estas observaciones. Luego postuló que la reactividad de los Anti-Ig de ratón se relaciona con la habilidad del animal de sintetizar anticuerpos, pudo representar la presencia de la inmunoglobulina sobre la membrana celular.⁴¹

En la década de los 60`s se desarrollaron metodologías para el marcaje de proteínas con reactivos fluorescentes como isocianato de fluoresceína (FITC).⁴² Sin embargo, no fue antes de 1970 cuando Raff aplicó la tecnología de anticuerpos marcados con fluoresceína, demostrando que debido a la unión de la inmunoglobulina a antígenos de la superficie de la membrana celular de los linfocitos puede distinguirse las poblaciones de linfocitos que expresan antígeno Thy-1 (linfocitos T).⁴²

Los anticuerpos monoclonales (AM) fueron producidos por vez primera por Kohler y Milstein en 1975, que obtuvieron el Premio Nóbel de Medicina en 1984 por tal descubrimiento. Los mencionados autores consiguieron unir dos células y obtener un híbrido (Híbridoma) que presentaba características funcionales de ambas poblaciones celulares.⁴²

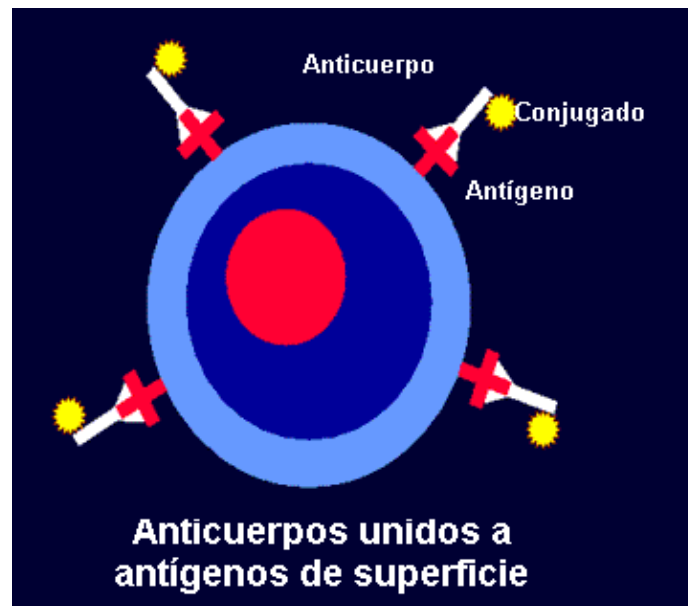


Figura 2.8. Esquema de unión específica del anticuerpo al antígeno de superficie de una célula.

Adaptado de <http://pleiad.umdj.edu/hemepath/immuno/immuno.html>

La producción de anticuerpos monoclonales esta basada en la fusión de linfocitos B con una pareja mieloma (mieloma partner) para producir un híbridoma celular que secreta un único anticuerpo. Este proceso depende del repertorio de células linfoides del huésped inmunizado, de la asociación conveniente con el mieloma, y de una prueba tamizaje eficiente que seleccione el híbrido que produce los anticuerpos deseados. La inmunización genera altos títulos de anticuerpos circulantes dependiendo de la naturaleza del antígeno, el

animal usado, y el protocolo de inmunización seguido. En el desarrollo de anticuerpos monoclonales es importante tener en cuenta escoger un mieloma para la asociación capaz de otorgar la información genética apropiada para que la división celular continúe en el cultivo celular una vez sea extraída del huésped. Para ello, se separan todas las células del hibridoma y se cultivan por separado. De esa manera, cada célula en solitario se dividirá produciendo clones de células idénticas de hibridoma. El resultado es la producción de anticuerpos monoclonales uniformes.⁴²

Las células asesinas naturales identificadas como CD3-, CD16+ y CD56+, relacionadas con la citotoxicidad contra tumores y células infectadas con virus. Cuando los anticuerpos monoclonales artificiales son adicionados a la muestra de sangre humana, el anticuerpo marcado con un fluorocromo se une específicamente con antígenos de superficie de los linfocitos. Los anticuerpos monoclonales son utilizados comúnmente para la identificación de subpoblaciones linfoides.⁴²

El reactivo CD3/CD16+CD56 contiene CD3 (Leu-4) marcado con isocianato de fluoresceína (FITC) para la identificación de linfocitos T y subpoblaciones de linfocitos T que expresan CD16 y/o CD56. También contiene CD16 marcado con phycoerythrin (PE) y CD56 marcado con PE para identificar la población de linfocitos NK.⁴³

El anticuerpo CD3 (Leu-4) es una inmunoglobulina de memoria tipo G₁ (IgG₁) extraída de ratón. El anti-CD3 reacciona con la cadena epsilon del antígeno

receptor del complejo TCR de los linfocitos T/CD3. Este complejo esta compuesto por lo menos por seis proteínas de 20 a 30 kdaltons (KDa).⁴³

El anticuerpo CD16 (leu-11) está conformado por una inmunoglobulina de memoria tipo G₁ (IgG₁) extraída de ratón, que reconoce un receptor proteico de 50 a 65 KDa conocida como receptor IgG₁ Fc III presente en los linfocitos NK y en los neutrófilos.⁴³

El anticuerpo CD56 (leu-19) es una inmunoglobulina IgG₁ de ratón que reconoce el antígeno CD56 que está presente solo en los linfocitos asesinos naturales. El anticuerpo se une específicamente a una molécula de adhesión neural-celular: N-CAM. El antígeno CD56 esta esencialmente presente en linfocitos CD16+ y aproximadamente en el 5% de los linfocitos CD3+ de linfocitos de sangre periférica. El CD56 aumenta su densidad cuando la subpoblación de NK está activada.⁴³

2.3. VALORES DE REFERENCIA

2.3.1. Generalidades de los valores normales:

Con el fin de correlacionar el estado clínico de un paciente para planear un manejo terapéutico, los resultados del laboratorio se comparan con los valores normales. En éste contexto, los valores normales se refieren a las medidas que han sido observadas en personas en buen estado de salud.⁴⁴ Sin embargo, en un sentido amplio los valores normales no permiten ser usados para clasificar a un individuo como enfermo.

Los términos “valores normales” y “rango normal” se han usado frecuentemente como un equivalente a valores de referencia en individuos sanos. La palabra normal tiene diferentes connotaciones en el laboratorio clínico, lo cual puede causar confusiones. A menudo se dice que los valores normales siguen una distribución Gaussiana. No obstante, los datos biológicos frecuentemente no siguen una distribución Gaussiana y el término normal puede llevar a pensar erróneamente, infiriendo que los datos son simétricos o que se distribuyen en forma de campana.⁴⁴

2.3.2. Aspectos de la población para la determinación de valores normales.

Para la determinación de valores normales de un analito en particular, se debe realizar una selección adecuada de los individuos de referencia. Sin embargo, es de vital importancia retomar algunos conceptos básicos antes de hablar acerca de la muestra de referencia.⁴⁵

La población es un grupo de personas que comparten las características demográficas, hábitos culturales, raza, hábitos alimentarios que en un momento dado son variables que necesitamos para responder a las preguntas planteadas con antelación. Es decir, la población es un grupo universo que poseen una característica cuantificable en común que puede representarse como una variable la cual puede constituir un universo finito.⁴⁶

2.3.2.1. Muestra.

La muestra es una parte definida de la población que permite inferir y calcular los resultados obtenidos de la observación y medición total. La muestra es definida de la población elegible de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos; entendiendo por criterios de inclusión aquellos que se consideran importantes para analizar en el estudio y que permiten realizar conclusiones que respondan el interrogante original.⁴⁶

El objetivo de un muestreo adecuado es poder generalizar los resultados del estudio a un grupo de personas que comparten las características de interés. Existen diferentes métodos para asegurar que la muestra escogida represente

realmente a la población y que sea elegida en forma aleatoria. Las unidades de estudio son seleccionadas de manera independiente hasta obtener el tamaño de la muestra deseado. Este método asegura la validez de cualquier inferencia que se pueda generar a partir de la muestra y es conocido como muestreo probabilístico.⁴⁶

La muestra de referencia debe definirse en forma tal, que se puedan seleccionar individuos de referencia apropiados para la muestra y ensayos. Los individuos sanos, usados como referencia, deben ser seleccionados no sólo bajo el criterio de buena salud sino teniendo también en consideración otros factores biológicos y medioambientales, que pueden incidir en los resultados de los análisis. La selección de individuos en buen estado de salud, para hacer parte de un grupo de referencia puede ser difícil. La definición de salud es problemática y ciertamente subjetiva, pues lo que puede ser considerado buena salud en una parte del mundo, puede no serlo en otra. El buen estado de salud absoluto, probablemente no existe y si existiera no se podría identificar en forma total en un individuo dado. Para efectos de establecer valores normales, en la práctica clínica utilizamos buen estado de salud como la característica subjetiva de estar bien, la ausencia de enfermedad o de una patología detectable.⁴⁴

2.3.2.2. Diseño estadístico.

El diseño de la investigación, analizando los objetivos establecidos en éste trabajo, nos permite seleccionar los estudios observacionales con diseños descriptivos. El estudio descriptivo o de corte transversal permite recoger

información y describir la distribución de frecuencias de las características de salud de la población y de las asociaciones de estas variables con otras variables. Los estudios de corte transversal proveen claves importantes sobre las posibles causas de las enfermedades y de otras condiciones de salud. También proporcionan información a partir de una observación hecha en una sola oportunidad y en un punto en el tiempo.⁴⁶

2.3.2.3. Generalidades del cuestionario.

El uso de cuestionario continúa siendo el pilar de la recolección de la información pertinente. Las preguntas que conforman el cuestionario generan, posteriormente en el análisis, un gran número de variables que permitirán alcanzar los objetivos trazados desde un principio.⁴⁶

La definición operativa debe ser pragmática, sin dejar de ser lo más precisa posible. Un procedimiento engorroso para llegar al diagnóstico aumenta la demanda logística y la tasa de rechazo de los casos potenciales.⁴⁶

En el momento de revisar un cuestionario, es recomendable clasificar las variables en varios grupos, para disminuir así el riesgo de omisiones involuntarias en la recolección de información crucial.⁴⁶

Finalmente, la población que se selecciona debe estar representada por la definición de cada una de las preguntas que se incluyan en el cuestionario. En el análisis se identifica los sujetos que cumplan con los criterios establecidos.⁴⁶

Toda la información recolectada debe ser utilizada en el análisis. Si una pregunta genera variables cuya función no es clara deberá ser excluida del cuestionario.⁴⁶

2.3.3. Consideraciones preanalíticas y analíticas.

Los métodos preanalíticos y analíticos deben ser los mismos, tanto para la determinación de los valores normales como para los pacientes, y se deben seleccionar y utilizar teniendo en cuenta las condiciones fisiopatológicas, causas de variación, preparación de pacientes, tiempo y técnica para la recolección y manejo de muestras. Se deben definir los métodos analíticos y la instrumentación y usar la metodología para cada uno de los individuos de la muestra de referencia.⁴⁴

Los datos recopilados durante el desarrollo de éste estudio son una serie de números que reflejan el comportamiento de las variables propuestas. Los datos son sometidos a operaciones matemáticas que permiten obtener medidas estadísticas.⁴⁴

Las medidas de tendencia central son valores que representan aquel valor de la variable alrededor del cual tienden a agruparse o distribuirse los datos de una serie. La media corresponde al valor central hacia el cual convergen los puntos de las series de datos. Se define como el promedio matemático de la suma de todos los valores que adquieren la variable problema, entre el número total de sujetos. La mediana (Md) se define como el valor que no supera ni es superado por el 50% de los datos de la serie. Para su cálculo es necesario

establecer un ordenamiento de los datos según un criterio específico. La moda es el valor de la variable que más se repite. ²⁴

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células asesinas naturales (NK) son linfocitos granulares involucrados en la respuesta inmune innata con capacidad de lisar células infectadas y células tumorales a través de la producción y liberación de citocinas,¹⁻⁵⁻⁶⁻⁷ y reconocer el Complejo Mayor de Histocompatibilidad-I atacando las células que expresen bajos niveles de éste.¹⁻⁴⁻⁵ Las Natural Killer conforman el 5 al 20% de linfocitos en sangre periférica⁵ y están presentes en el bazo, hígado, médula ósea y en baja frecuencia en el timo.¹

Estudiando la importancia de las células NK en varios campos, utilizaremos como técnica para el análisis la citometría de flujo por el conteo celular y por las características relativas más cercanas que éste método proporciona de la célula.⁴⁻¹⁵⁻²⁰⁻⁴¹ Anteriormente ha sido utilizado el CD57 como marcador para las células NK, siendo detectando sólo un 30 al 70% de las células¹¹ sin tener correlación con la citotoxicidad de los linfocitos NK. Así mismo, se han utilizado otros marcadores (CD2, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD45 y CD69) sin la especificidad más adecuada, asociándose con las células asesinas naturales maduras.²² Lo anterior nos hace pensar que es necesario un marcador más sensible para nuestro estudio, por eso hemos escogido para éste el CD56 (Leu19) el cual está expresado en baja densidad sobre más del 95% de

linfocitos en sangre periférica,¹¹⁻¹⁷ y el CD16 receptor para Ig-G, que en su mayoría es un antígeno coexpresado con el CD56, que nos ayuda a observar la población CD16-/CD56+ que está en sangre periférica.¹¹

En la actualidad, en clínica son constantemente requeridas por su importancia diagnóstica, ya que se encuentran relacionadas con varias patologías como abortos espontáneos, endometriosis, cáncer, transplantes, entre otras.¹² En Colombia no contamos con valores normales de las células asesinas naturales propias de la población, sino con valores otorgados por estudios realizados en poblaciones de otros países como EE.UU.,¹² sin contar en todos los casos con una información completa acerca de las variables tenidas en cuenta en las investigaciones.

Hoy en día, las instituciones de diagnóstico clínico necesitan cada vez más establecer valores de referencia de linfocitos asesinos naturales para satisfacer la necesidad de correlacionar veridicamente los resultados proporcionados por las muestras sanguíneas. Existen escasos estudios experimentales, en los cuales se demuestre la importancia y el comportamiento local de los valores normales de natural killer.

En Colombia, los valores normales de linfocitos NK, son adoptados de estudios de poblaciones internacionales impidiendo una relación directa con la población nacional. Es por ésta razón que nuestro proyecto busca determinar y establecer los valores normales de linfocitos asesinos naturales en adultos de la ciudad de Bogotá.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Hallar valores normales de células Natural Killer CD3-/CD16+CD56+ utilizando métodos directos e indirectos de recuento celular y métodos automatizados de conteo celular como citometría de flujo y coulter en una muestra de la población adulta de Bogotá.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1. Determinar los valores absolutos de leucocitos a través de métodos directos e indirectos y métodos automatizados de conteo celular como citometría de flujo y coulter .
- 4.2.2. Obtener un valor relativo de Células natural killer en una población de donantes adultos perteneciente al banco de Sangre del Hospital San Ignacio por medio de citometría de flujo.
- 4.2.3. Determinar los valores absolutos de la población de NK a través de los valores relativos obtenidos de las muestras de donantes para lograr los valores normales de las células natural killer en adultos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Tipo de estudio

El diseño metodológico es descriptivo, que se caracteriza por la obtención de un grupo de estudio reducido y altamente seleccionado. Además, es excelente como fuente de hipótesis, y debido a que se realizan descripciones completas, se puede llegar a una mejor comprensión del comportamiento de características particulares.

También es llamado de corte transversal e incluye una muestra representativa de la población con el estado de interés. Asimismo, está limitado a una descripción de la población y permite recolectar información y describir la distribución de frecuencias de características de salud de la población y de las asociaciones de éstas con otras variables.

Este tipo de estudio permite determinar cuales grupos de personas experimentan en mayor o menor grado ciertos desordenes, eventos vitales o comportamientos de interés.

Es importante notar, que los estudios de corte transversal proporcionan información a partir de una observación hecha en una sola oportunidad y en un punto en el tiempo. Los estudios de corte transversal son una “fotografía

instantánea” de un problema dinámico, donde los sujetos identificados como casos no son seguidos en el tiempo.

5.2. Población.

La población estudiada, está constituida por adultos sanos sin discriminación de raza ni género que cumplieron con los criterios de inclusión, de nacionalidad colombiana, aceptados como donantes del banco de sangre del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá.

5.3. Individuos.

La población de estudio incluyó individuos sanos que cumplieron con los criterios para ser donantes del Banco de Sangre del Hospital San Ignacio de Bogotá, el cual se rige de igual manera bajo las normas de los demás banco de sangre Americanos, tutelados por la FDA, y por la AABB (Asociación Americana de Bancos de Sangre).

Previa identificación de los individuos que cumplieron los criterios de inclusión, se les informó del estudio y aquellos que manifestaron su deseo de participar firmaron un informe de consentimiento escrito (Anexo 1: Formato de consentimiento).

5.4. Recolección de datos

La información de los individuos se recolectó a través de la consulta del formulario de recolección de datos del banco de sangre (Anexo 3: Formato de recolección de datos), que fue completado detalladamente por el clínico durante la entrevista antes de la donación y previo consentimiento escrito (Anexo 1: Consentimiento escrito)

5.5. Criterios de exclusión e inclusión.

5.5.1 Del individuo.

Los criterios que se tuvieron en cuenta para la inclusión de los individuos en el estudio son:

- Firma del consentimiento informado (Anexo 1: Consentimiento Informado)
- Los establecidos por el Banco de Sangre para aceptar un donante (Anexo 2: Criterios de Inclusión del Banco de Sangre), algunos de los cuales son evaluados a través de un formato de recolección de datos (Anexo 3: Formato de recolección de datos), que permanece archivado en el Banco de Sangre por un periodo de 5 años.
- Adultos sanos, menores de 60 años, sin discriminación de raza ni género.
- Talla correspondiente a su edad.
- Peso mayor a 51Kg.
- Hematocrito mayor de 45%.

- Resultado negativo para todas las pruebas de enfermedades infecciosas.
- Recuento entre 4000 - 10000 leucocitos/microlitro.
- Distribución normal de las células evaluadas en el extendido de sangre periférica.

Dentro de los criterios de exclusión se encuentran:

- El incumplimiento de los criterios establecidos por el Banco de Sangre para la selección de donantes y de los criterios adicionales antes expuestos. (Anexo 2).
- Donantes que presentaron enfermedades sistémicas, hepatitis o alguna enfermedad infecciosa en algún momento de su vida.
- Donantes que fueron positivos en las pruebas de enfermedades infecciosas realizadas por el banco de sangre.
- La negación del donante a contestar la entrevista y a llenar el formato de recolección de datos.
- El suministro de información falsa.

5.5.2. De la muestra

Los criterios que se tuvieron para la aceptación de la muestra, su posterior procesamiento y la admisión de los datos, se encuentran:

- No hemólisis.
- No más de 12 horas de extraída.

- Proporción adecuada sangre / anticoagulante.
- Diferenciación clara de las poblaciones negativas y positivas para una característica en el citómetro de flujo.

5.6. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra es de 95 individuos y es aceptable para la estimación de los percentiles y de las medidas de tendencia central de un estudio descriptivo.

5.7. Muestra de sangre

La muestra de sangre se obtuvo por punción directa y a partir de la bolsa, previo consentimiento informado (Anexo 1)

Para la punción directa se utilizaron los protocolos estándares para el sistema Vacutainer® y se obtuvo 4 ml de sangre completa anticoagulada con EDTA.

Por otro lado, en un tubo seco, se obtuvo una muestra de 3 ml de sangre completa a partir del piloto de la bolsa extraída a cada voluntario, anticoagulada con CPDA (citrato-fosfato-destroxa-adenina) y previamente homogenizada.

A todas las muestras se les asignó un código secuencial, teniendo en cuenta la fecha de obtención.

5.8. Recuento de leucocitos

Se realizó un recuento total y diferencial de linfocitos siguiendo los protocolos hematológicos manuales y automatizados estándar. El recuento total se realizó manualmente con reactivo de turk en cámara de Neubauer y automatizado en un contador de células STKS (Coulter®). Además, se confirmó la distribución de los leucocitos por medio de un extendido de sangre periférica coloreado con Wright. A partir de éstos recuentos se obtuvieron valores relativos (%) y absolutos (células por microlitro) de los leucocitos de sangre periférica para cada voluntario.

5.9. Evaluación de marcadores por citometría de flujo

5.9.1. Marcaje

Se realizó un marcaje a cada una de las muestras con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, específicos para las moléculas a evaluar previa titulación de los anticuerpos y teniendo en cuenta lo recomendado por la casa comercial. A un tubo de poliestireno Falcon (Becton Dickinson®) con capacidad para 5 ml, debidamente marcado con el código del voluntario y la fecha, se adicionaron 25 µl de sangre total anticoagulada. Se agregaron 5 µl de anticuerpos monoclonales anti-CD3 humano marcado con FITC (Becton Dickinson, Pharmingen™) y 5 µl de anti-CD16/CD56 humano marcado con PE a cada tubo (Becton Dickinson, Pharmingen™). Se homogenizó en un vortex (Thermolyne, Maxi Mixx II) y se incubó a 4°C por 30 minutos en oscuridad. Luego de la incubación, se lisaron los glóbulos rojos con 500 µl de solución de lisis 1X (FACS LYSING SOLUTION, 10X, Becton Dickinson®) preparada con agua destilada. Se homogenizó en un vortex

(Thermolyne, Maxi Mixx II) y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos en oscuridad. Luego se lavó con PBS1X-Azida de sodio al 0.1% y se centrifugó. Se mezcla y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 15 minutos. Para el primer lavado se adicionaron 3 ml PBS 1X-Azida de sodio al 0.1% y se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 rpm, se descartó el sobrenadante de cada tubo y se resuspendió el botón celular para realizar un segundo lavado con 4 ml del buffer. Finalmente, luego de resuspender nuevamente el botón celular se fijó con 500 μ l de PBS 1X paraformaldehído 0.05%. Se conservó a 4° y en oscuridad hasta la lectura 24 horas después en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson®).

5.9.2. Adquisición y Análisis

Para la adquisición y el análisis se utilizó el programa CELL QUEST (Becton Dickinson®). El número de eventos adquiridos fue de 2500 en la región de los linfocitos, previamente establecida con base en las características de tamaño celular y complejidad interna.

El análisis se hizo en diagramas de puntos, con base en la expresión de los marcadores CD3,CD16/CD56 sobre células pequeñas y de baja complejidad. Las células que se clasificaron como NK son las que se ubicaron en el cuadrante superior izquierdo del gráfico de puntos, o sea que expresaron las moléculas CD16/CD56 pero no el CD3. Se obtuvieron valores relativos respecto a la población de linfocitos y a la población total, siendo convertidos luego a valores absolutos utilizando los datos obtenidos del recuento leucocitario.

5.10. Plan de análisis de estadístico

Se realizó una base de datos con la totalidad de los datos obtenidos de los recuentos manuales y automatizados tanto absolutos como relativos y porcentajes de células obtenidos en el citómetro de flujo. Los datos purificados se procesaron por medio de estadística descriptiva y cálculos de percentiles de las variables en estudio, dentro de las que se encuentran:

VARIABLE	UNIDAD DE MEDIDA	TIPO DE VARIABLE
Género	f/m	Nominal
Edad	Años	Razón
Recuentos de Leucocitos directo	Células/ μ l	Razón
Recuentos de leucocitos por cont. Hematológico	Células/ μ l	Razón
Porcentaje de linfocitos por cont. Hematológico	%	Razón
Porcentaje de linfocitos por recuento diferencial	%	Razón
Porcentaje de linfocitos por citometría de flujo	%	Razón
Porcentaje de linfocitos asesinos naturales	%	Razón

Tabla 5.1. Variables obtenidas a partir del análisis celular.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN.

Se recolectaron 129 muestras de sangre de donantes voluntarios, entre los 18 y 60 años, que asistieron al Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio de la ciudad de Bogotá, durante el periodo comprendido entre 15 de octubre de 2002 al 20 de febrero de 2003.

De la población inicial, se descartaron 34 muestras de voluntarios por problemas técnicos o porque presentaron valores extremos, de acuerdo a lo observado en el grado de asimetría de la distribución por medio del diagrama de caja.⁴⁷

De esta manera, para el tratamiento de los datos se utilizaron métodos estadísticos descriptivos, elaborando el análisis con base en la población total. Aunque también se analizó la muestra estratificada por edad y género.

De las 95 aptas para el estudio, el 67% (64/95) correspondían a muestras de voluntarios del género masculino y el 33% (31/95) al género femenino. (Fig. 6.1)

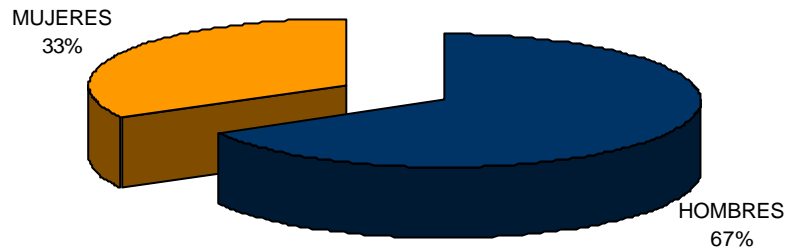


Fig 6.1. Distribución por género. El 67% (64/95) de la población pertenece al género masculino y el 33% (31/95) al género femenino.

En la estratificación por edad, la población se agrupó en dos percentiles: P5 – P50 corresponde al rango entre 18 a 34 años y con el 49% (47/95) de la población; P50 – P100 a las edades entre 35 y 56, con el 51% (48/95) del total. (Fig. 6.2)

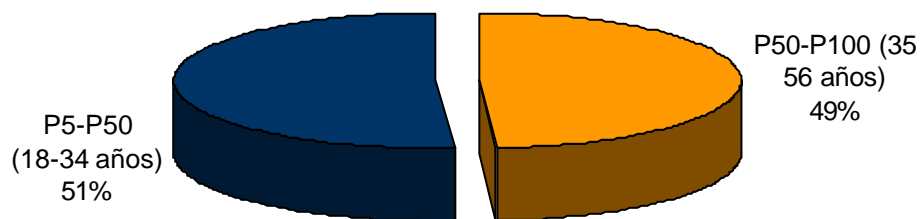


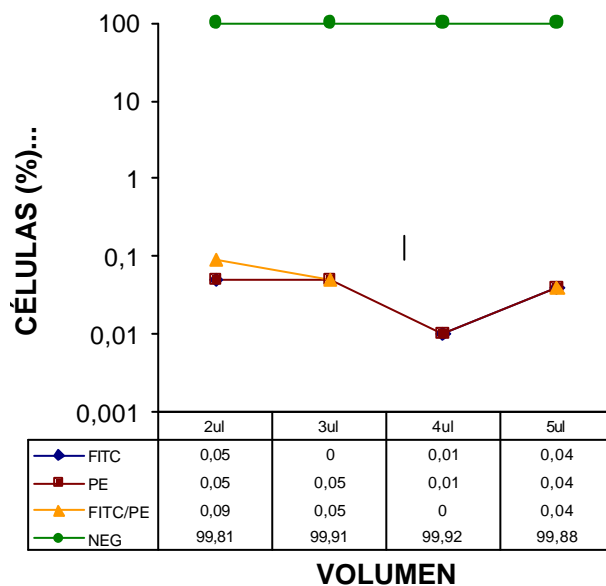
Figura 6.2. Distribución etárea. P5-50 (18-34años): 49% (47/95). P50-P100 (35-56 años): 51% (48/95).

6.2 ESTANDARIZACIÓN.

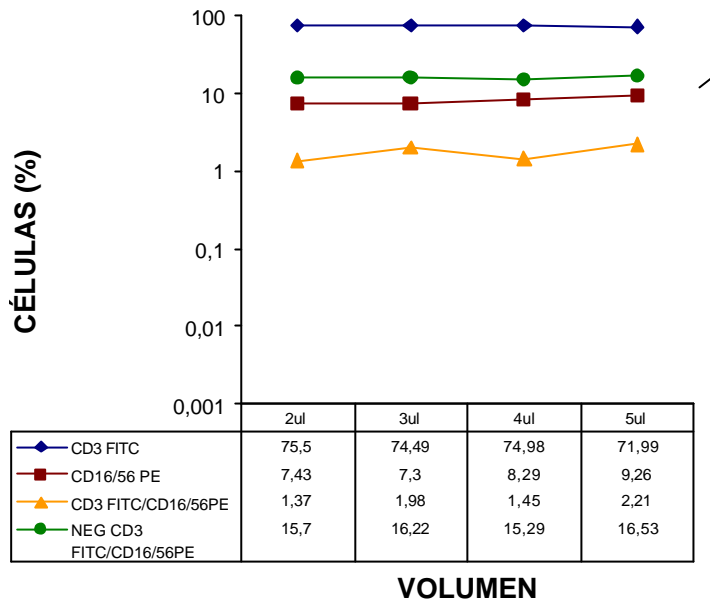
La concentración de anticuerpos, tanto isotipos como específicos para CD3, CD16 y CD56 se definió por medio de una titulación.

Para los isotipos se partió de un vial de anticuerpos de ratón IgG2a marcado con FITC y de una solución inicial de anticuerpos de ratón IgG2b marcado con PE. En el caso de los anticuerpos específicos, se utilizó un kit de Simultest™ CD3/CD16+CD56 (Leu™-4/11c+19) que contiene una solución de anticuerpos IgG1 de ratón anti-CD3 humano marcados con FITC y anti-CD16/CD56 humano marcados con PE. Para esto, se procesó una muestra de sangre completa de control de calidad externo proporcionada por la casa comercial, utilizando la metodología previamente descrita. En tubos diferentes, se adicionó 25 µl de muestra, que se marcó con 2, 3, 4 y 5 µl de cada anticuerpo.

A.



B.



C.

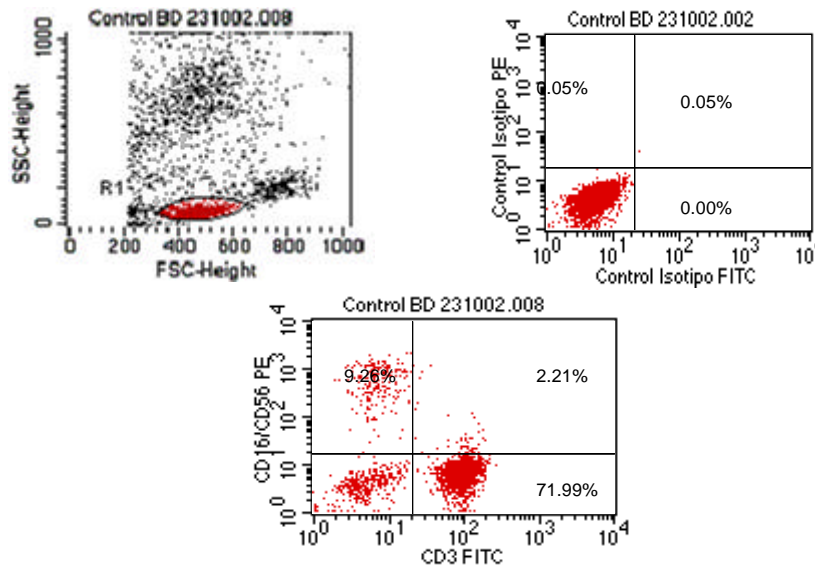


Fig. 6.3 Titulación de los anticuerpos CD3 FITC – CD16/56 PE. A. Titulación de los anticuerpos utilizados para isotipos en términos de volumen y porcentaje de células positivas. B. Titulación del Simultest™. Las células CD3-CD16/CD56 Neg corresponde a células mononucleares de baja complejidad que no expresan ninguno de los marcadores. (/) Punto de Corte C. Gráficos de puntos de la muestra control marcada con 3µl de isotipos y con 5µl de los anticuerpos anti-CD3/CD16/CD56.

Para los isotipos, la cantidad de anticuerpo a utilizar (3 μ l) se definió como el volumen al que se obtiene un equilibrio en la cantidad de uniones inespecíficas, representado en este caso como un porcentaje de células positivas. (Fig 6.3AC). Y para los anticuerpos específicos se decidió utilizar 5 μ l, debido a que es la menor cantidad de anticuerpo a la que se obtiene mayor número de células positivas para la condición específica y a la que la población de células negativas se mantiene (Fig 6.3BC).

6.3. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE RECUESTO DE LINFOCITOS EN VALORES RELATIVOS.

En la Tabla 6.1, se presenta la estadística descriptiva de la totalidad de los datos (n=95) obtenidos por los tres métodos de recuento de linfocitos, analizada respecto a la población total.

Tabla 6.1. Estadística descriptiva del total de la población (n=95). Recuentos de linfocitos obtenidos por los métodos de recuento automatizado, recuento manual y por citometría de flujo.

	Recuento Automatizado	Recuento Manual	Citómetro
Promedio	33,06	33,20	32,46
Mediana	32,40	33,00	32,76
Desviación Estándar	7,41	8,08	6,99
Coficiente de Variación	22,40	24,35	21,55

Al comparar las medias de los recuentos de leucocitos totales de los donantes voluntarios de sangre por medio del método de t student se comprobó que no

existe ninguna diferencia significativa entre los valores hallados por las tres metodologías empleadas. ($p > 0.05$) (Fig 6.4).

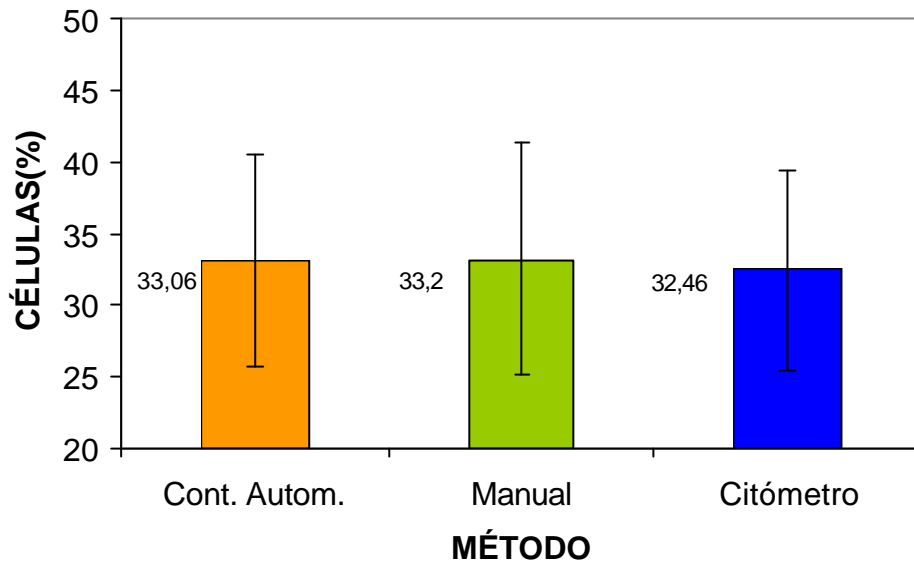


Fig 6.4. Metodologías de recuento de linfocitos (%). Contador automatizado. Método manual (Extendido de Sangre Periférica coloreado con Wrigth). Citómetro de flujo.

Las diferencias en las medias aritméticas y las desviaciones estándar son semejantes en los tres métodos utilizados para evaluar el porcentaje de linfocitos en toda la población, confirmando que los datos arrojados por cada una de las metodologías se correlacionan.

Sin embargo, por medio de una prueba F o una prueba de hipótesis comparamos las varianzas de cada uno de los métodos empleados para el recuento de linfocitos totales, bajo el supuesto de que la hipótesis planteada (H_0) es verdadera. Entonces, buscamos responder la siguiente hipótesis: ¿Hasta qué punto es probable que exista alguna semejanza entre los

resultados observados y los esperados en cada una de las metodologías de recuento de linfocitos totales?. La comprobación de las varianzas de los datos obtenidos por los métodos de recuento automatizado y recuento manual rechaza la hipótesis alterna con un $p=0.839$. Del mismo modo, cuando se compararon el recuento manual con el porcentaje de células en la región de menor tamaño y de baja complejidad del citómetro de flujo se obtuvo una $p>0.05$ ($p=0.646$). Además, también se rechazó la hipótesis de desigualdad de varianzas cuando se comparó el método de recuento automatizado con los datos obtenidos del citómetro de flujo ($p=0.788$). Una vez seleccionada y analizada la muestra se rechaza la hipótesis alterna a favor de la hipótesis nula, basándonos en que p (la probabilidad de cometer el error tipo 1, donde la hipótesis nula se rechaza si la $p < 0.05$) fue mayor que 0.05.

Tabla 6.2. Valores absolutos de linfocitos en mujeres. Recuento de linfocitos obtenidos por los métodos de recuento automatizado, recuento manual y por citometría de flujo para la población femenina (n=31). Los valores de recuento se encuentran expresados en células/ μ l y fueron obtenidos por cálculos de estadística descriptiva.

Mujeres	Automatizado		Manual		Citómetro	
	%	Cél/ μ l	%	Cél/ μ l	%	Cél/ μ l
Promedio	32	2110	32	2109	30	2047
Mediana	32	2072	32	2070	31	1968
Desv. Estàndar	7	512	5	701	8	561
Coef. Variaciòn	22	24	16	33	27	27

Tabla 6.3. Valores absolutos de linfocitos en hombres. Recuento de linfocitos obtenidos por los métodos de recuento automatizado, recuento manual y por citometría de flujo para la población masculina (n=64). Los valores de recuento se encuentran expresados en células/ μ l y fueron obtenidos por cálculos de estadística descriptiva.

Hombres	Automatizado		Manual		Citómetro	
	%	Cél/ μ l	%	Cél/ μ l	%	Cél/ μ l
Promedio	34	2061	34	2016	33	2012
Mediana	34	1933	34	2021	33	1895
Desv. Estàndar	8	595	8	666	7	571
Coef. Variaciòn	22	29	25	33	22	28

6.4. VALORES RELATIVOS Y ABSOLUTOS DE CÉLULAS ASESINAS NATURALES (NATURAL KILLER).

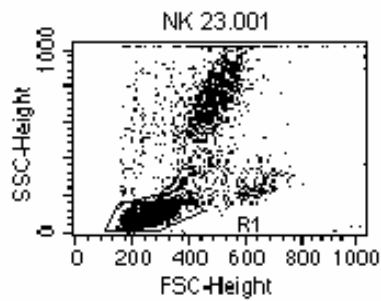
6.4.1 ESTABLECIMIENTO DE LA POBLACIÓN CELULAR Y ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.

Los resultados obtenidos se expresaron en valores absolutos (μl) y valores relativos (%). Las 95 muestras se interpretaron a través de medidas de tendencia central como la media y medidas de dispersión como desviación estándar (DS) y percentiles 5, 25, 50, 75 y 95; los cálculos estadísticos se obtuvieron a partir del empleo de bases de datos en Excel.

Luego de la adquisición de la muestra por el citómetro, se analizó el software CellQuest® (Becton Dickinson), utilizando diagramas de puntos. El análisis se inició con un gráfico de tamaño (FSC) vs complejidad interna (SSC), en donde se definió como población de estudio la que correspondía a las características de menor tamaño y menor complejidad interna (R1), ya que es en esta región donde se ubican las células con características linfoides, como las NK. El análisis de la fluorescencia se llevó a cabo en gráficos de puntos tomando solo las células que se ubicaron en R1 (Fig 6.5A).

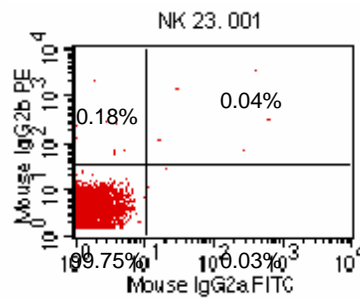
De esta manera, el valor relativo de células NK se definió como el porcentaje de células de la región de linfocitos (R1) que expresaban CD16/56 pero que eran negativas para CD3 (Fig 6.5A). En el gráfico de fluorescencia de CD3 FITC vs CD16/56 PE estas células se ubican en el cuadrante de arriba a la derecha (UL) (Fig 6.5C). La especificidad de la técnica se aseguró con el control de isotipo, ya que más del 95% de las células no presentó fluorescencia inespecífica (Fig 6.5B)

A.

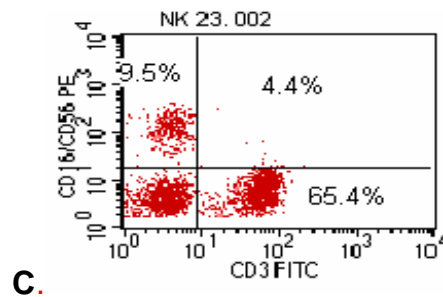


9 (a)

B.



9 (b)



C.

Fig. 6.5 Análisis de las muestras por Citometría de Flujo. A. Gráfico de puntos de tamaño (FSC) vs complejidad interna (SSC). R1: Población de características linfoides dentro de la que se ubican las NK **B.** Isotipo FITC vs PE. **C.** Expresión de CD3, CD16/56. Cuadrante de arriba a la izquierda corresponde a las células CD3(-)/CD16/CD56(+).

6.4.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN CD3(-)/CD16CD56(+)

En la tabla 6.4 se presenta la descripción estadística de la población, en términos de promedio y desviación estándar. El análisis descriptivo se presenta en la población total (n=95) y estratificado por género para el promedio de los valores obtenidos por las tres metodologías de recuento total de leucocitos y para el recuento de linfocitos. En el caso de las células NK, CD3(-)/CD16CD56(+), se muestra el dato obtenido por citometría de flujo. Cuando se analiza la población total, se obtiene que las células NK corresponden a un 15% (± 7) de los linfocitos, lo que equivale a 298 (± 161) cél/ μ l. Cuando se estratificó por género, se observa para el género masculino, un valor relativo promedio de células NK de 16% (± 7) y a 319 cél/ μ l (± 163). En el caso del género femenino, un se obtuvo promedio de 12% (± 6), lo que corresponde a 253 cél/ μ l (± 152). Al comparar los valores de células CD3(-)/CD16CD56(+) entre los grupos femenino y masculino, se encontraron mayores niveles en hombres, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con un $p=0.006$.

Tabla 6.4. Descripción estadística de los valores relativos y absolutos de células CD3(-)/CD16CD56(+). Descripción de la población total y estratificada por género. Los valores relativos equivalen al porcentaje de células que no expresan CD3 pero que sí expresan CD16 y CD56. Corresponden a las células ubicadas en el cuadrante superior izquierdo del gráfico de puntos.

	Hombres				Mujeres				Población Total			
	%		cél/ul		%		cél/ul		%		cél/ul	
	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS
Leucocitos Totales			6107	128			6632	1428			6278	1286
Linfocitos Totales	34	7	2029	551	32	5	2088	511	33	6	2049	536
Linfocitos CD3(-)/CD16CD56(+)	16	7	319	136	12	6	253	152	15	7	298	161

Valores relativo(%), Valores absolutos (cél/ul)

Los valores expresados son los promedios de los leucocitos y linfocitos hallados por los diferentes métodos

6.4.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS VALORES NORMALES POR PERCENTILES.

A pesar de que la distribución de los datos tiene forma simétrica debido a que los valores de sus medias y medianas se encuentran próximos, se decidió mostrar los datos por percentiles. Estos son especiales porque indican el porcentaje de distribución igual o menor a esa cifra.

Los valores de los percentiles de las células CD3-/CD16CD56+ son similares para el total de la población y cuando se estratificó por género (Fig. 6.6 y Tabla 6.5). A pesar de que al analizar la población en su totalidad o por género el *n* es diferente, la distribución de los percentiles es proporcional, lo cual se puede observar en el percentil 50, donde el 50% de los datos tienen un valor igual o menor al percentil 50 para cada caso (Fig 6.6).

En la tabla 6.5 se presentan los valores celulares obtenidos para el percentil 5 y el 95 en la población total y distribuida por género.

De esta manera, cuando se consideran los datos de la población total, el valor de leucocitos corresponde a 4400 1cél/ μ l para el percentil 5 y a 8450 1cél/ μ l para el 95; el valor relativo de linfocitos a 21% en Pt5 y 43% en Pt95 y el valor absoluto a 1354 1cél/ μ l para Pt5 y a 3031cél/ μ l para Pt95; y en el caso de las células CD3(-)/CD16CD56(+) los valores se encuentran entre 6% para Pt5 que equivale a 118cél/ μ l y 28% para Pt95 que corresponde a 603cél/ μ l. (Tabla 6.5)

Por otro lado, cuando la población se estratificó por género, se obtuvo que en las mujeres el recuento de leucocitos se encuentra entre 4888 $\text{cél}/\mu\text{l}$ en Pt5 y 8688 $\text{cél}/\mu\text{l}$ en Pt95; los valores de linfocitos entre 24% que equivale a 1427 $\text{cél}/\mu\text{l}$ para Pt5 y 40% que corresponde a 2880 $\text{cél}/\mu\text{l}$ para Pt95; y en el caso de las células CD3(-)/CD16CD56(+) los valores se encuentran entre 5% para Pt5 que equivale a 102 $\text{cél}/\mu\text{l}$ y 24% para Pt95 que corresponde a 542 $\text{cél}/\mu\text{l}$. (Tabla 6.5)

Por el contrario, se obtuvo que en los hombres el recuento de leucocitos se encuentra entre 4358 $\text{cél}/\mu\text{l}$ en Pt5 y 8688 $\text{cél}/\mu\text{l}$ en Pt95; los valores de linfocitos entre 21% que equivale a 1326 $\text{cél}/\mu\text{l}$ para Pt5 y 45% que corresponde a 3081 $\text{cél}/\mu\text{l}$ para Pt95; y en el caso de las células CD3(-)/CD16CD56(+) los valores se encuentran entre 6% para Pt5 que equivale a 128 $\text{cél}/\mu\text{l}$ y 29% para Pt95 que corresponde a 619 $\text{cél}/\mu\text{l}$. (Tabla 6.5)

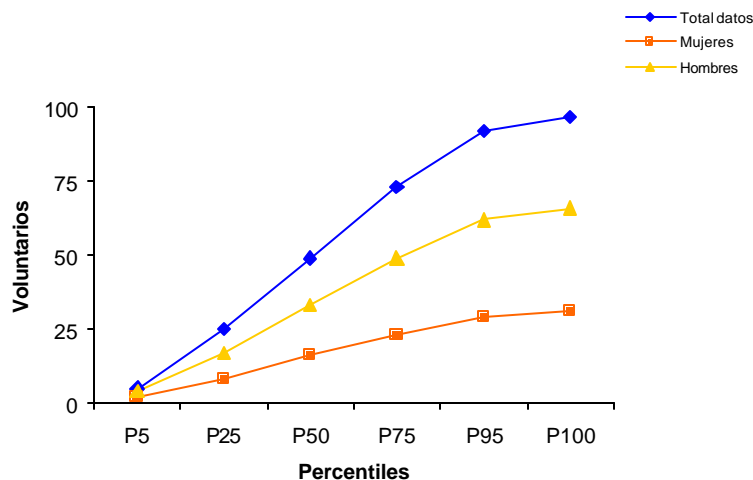


Fig. 6.6 Distribución de los valores de células CD3(-)/CD16CD56(+) por percentiles. Se analizó en la población total y estratificada por género.

Tabla 6.5. Distribución de los valores celulares por percentiles. Valores celulares relativos y absolutos de células. Para las células CD3(-)/CD16CD56(+), los valores relativos equivalen al porcentaje de células que no expresan CD3 pero que sí expresan CD16 y CD56 respecto a la región de menor tamaño y baja complejidad. Corresponden a las células ubicadas en el cuadrante superior izquierdo del gráfico de puntos.

Población	Hombres				Mujeres				Total			
	% ^a		Cél/ul ^b		% ^a		Cél/ul ^b		% ^a		Cél/ul ^b	
	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95
Leucocitos totales*	NA	NA	4358	8263	NA	NA	4668	8668	NA	NA	4400	8450
Linfocitos totales*	21	45	1326	3081	24	40	1427	2660	21	43	1364	3031
Linfocitos CD3(-)/CD16CD56(+)	6	29	128	619	5	24	102	542	6	28	118	603

^aValor relativo(%), ^bValor absoluto(cél/ul)

*Los valores expresados son los promedios de los leucocitos y linfocitos hallados por los diferentes métodos
(NA) no determinado

6.5. CORRELACION DE LOS VALORES NORMALES DE CÉLULAS ASESINAS NATURALES CON OTRAS PUBLICACIONES

Los valores absolutos y relativos de las células asesinas naturales obtenidos en el presente estudio fueron comparados con datos publicados en diferentes poblaciones. En el 2002, Abdulla Al Qouzi y colaboradores reportó valores absolutos de linfocitos de sangre periférica de donadores hombres árabes de sangre, con similares edades a las de los sujetos del presente estudio. Los rangos de los valores fueron expresados en media y desviación estándar. Para la población árabe la media fue 262 (+/-178) y para los etíopes fue 250 (+/-137). (Tabla 6.6.A) De igual forma, en 1999, Santagostino y colaboradores establece valores normales de linfocitos de sangre periférica en adultos italianos sanos, publicando la media en valores absolutos y relativos de las células asesinas naturales: 278 células/ μ l y 13.15 %. (Tabla 6.6.AB)

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

A.

Media y desviación estándar de:								
	Presente estudio n=95		Etiopes n=142		Árabes n=209		Italianos n=965	
	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS
Células NK (cél/ μ l)	297	161	250	137	262	178	278	N.A

B.

Promedios de:		
	Presente estudio	Italianos
Células NK (cél/ μ l)	14,65	13,15

Tabla 6.6. Comparación de valores normales de linfocitos asesinos naturales del presente estudio con otras publicaciones. A. Valores absolutos de células NK del presente estudio y otras publicaciones. **B.** Comparación de valores relativos de linfocitos NK del presente estudio con los establecidos en la población italiana. (X= media, DS= Desviación Estándar, N.A=valor no determinado).

De igual manera, comparamos los rangos de valores normales obtenidos en el presente proyecto con los publicados por Santagostino y colaboradores en un estudio de la población italiana. Encontrándose diferencias no significativas entre los valores de cada una de las poblaciones. (Tabla 6.7.)

Valores normales de células NK		
	Presente estudio	Italianos
Valores absolutos	118-603	73-654.
Valores relativos	6-27.	4-28.

Tabla 6.7. Valores normales de células Natural Killer de la población de donantes voluntarios del Banco de sangre de Bogotá y de donantes de Bancos de Sangre de Italia. Comparación de los valores absolutos y relativos publicados por el presente estudio y por un estudio de la población italiana.

7. DISCUSIÓN

Las células asesinas naturales (NK) están involucradas principalmente en la respuesta inmune innata.¹⁻²⁻⁵ Estas células representan una tercera clase de linfocitos diferente a los B y a los T.⁶⁻¹¹⁻¹⁷ La mayor diferencia es que estas células no expresan un receptor distribuido de manera clonal que esté sujeto a diversificación somática. Por el contrario, se sabe que emplean varios tipos de receptores estimulatorios específicos para moléculas asociadas con células infectadas, transformadas o estresadas.¹⁷⁻¹⁹⁻⁵⁸ Además, las células NK están reguladas por receptores inhibitorios específicos para moléculas de MHC de clase I.²³⁻³²⁻³⁴⁻³⁵⁻⁵⁵⁻⁵⁶ La diferencia en la especificidad de estas células, junto con su respuesta rápida y carencia de un estado de memoria, son las bases para considerar estas células parte de la respuesta inmune innata.¹⁷⁻¹⁹

Las células asesinas naturales cumplen varios papeles en las respuestas inmunes. Una vez activadas son potentes células citotóxicas capaces de lisar líneas tumorales,²⁰⁻²⁵⁻⁵² células infectadas con patógenos intracelulares¹⁻⁵⁷⁻⁵⁹ y células cubiertas de anticuerpos.¹⁻¹⁷⁻¹⁹⁻²² Cuando están activadas, estas células también producen citoquinas, notablemente las inflamatorias, como IFN γ y TNF α .¹⁷⁻¹⁸⁻³⁰⁻³¹ Estas citoquinas pueden inducir actividad antipatógeno por macrófagos y neutrófilos y también pueden ayudar a regular la respuesta inmune adaptativa.¹⁻¹⁷⁻¹⁹⁻²⁸

Estas células juegan un papel muy importante limitando la expansión de ciertos patógenos intracelulares, en etapas tempranas del ciclo de vida, cuando la respuesta inmune específica no se ha desarrollado.¹⁻¹¹⁻¹⁷ También, en estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha sugerido que participan en la respuesta inmune antitumoral.¹¹⁻¹²⁻⁵⁸ Además, pueden atacar células extrañas, especialmente células linfohematopoyéticas como las de médula ósea, y entonces pueden ejercer una barrera para los trasplantes.²⁵⁻³⁴

Por otro lado, se ha optado por establecer internacionalmente los valores normales de linfocitos y sus subpoblaciones, con el objetivo de obtener una mejor correlación fisiopatológica, evitando usar valores normales establecidos en individuos ajenos a su población.⁴⁸

De esta manera, debido a que estas células son cruciales en el desarrollo de respuestas innatas y en la regulación de las adaptativas; y a que los valores celulares normales en sangre periférica para cada población son datos de vital importancia para la clínica, se propuso en este estudio, establecer los valores normales de células asesinas naturales en donantes voluntarios del Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio en la ciudad de Bogotá, D.C.

Para esto, se recolectaron inicialmente 129 muestras de sangre total anticoagulada de donantes voluntarios, de las cuales 34 fueron descartadas por razones técnicas o por puntos extremos de acuerdo a lo que arrojó el diagrama de caja. De aquí que, la población total fue de 95 individuos 64 de los cuales eran donantes hombres y 31 mujeres, número de individuos estadísticamente representativo para esta clase de estudios.⁴⁴⁻⁴⁶

Las muestras fueron procesadas inmediatamente después de ser recolectadas, con el fin de evitar variaciones en los resultados debidas al tiempo de almacenamiento. Además, con fines de seguridad para el personal del laboratorio, se fijaron con paraformaldehído durante 24h ya que ha sido reportado que este inhibe el virus de inmunodeficiencia humana.

De esta manera, al igual que en otros trabajos de valores de referencia, se utilizaron varios métodos para la validación del recuento linfocitario,⁴⁸⁻⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵³ controlando así los diferentes niveles de variabilidad de los valores absolutos de leucocitos, de los niveles relativos y absolutos de linfocitos y, asimismo, para los de células asesinas naturales (NK) por citometría de flujo.

Para nuestro estudio, los valores absolutos de leucocitos (Total 4400-8450cel/ μ l; mujeres 4888-8688cel/ μ l; hombres 4358-8263cel/ μ l), y los absolutos y relativos de linfocitos (Total 21-43%, 1354-3031cel/ μ l; mujeres 24-40%, 1427-2880cel/ μ l; hombres 21-45%, 1326-3081cel/ μ l) se correlacionaron con los datos reportados en otras poblaciones,⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹ como también con los previamente establecidos para nuestra población de estudio.⁴⁸⁻⁷¹⁻⁷²⁻⁷³

Varios trabajos de valores normales de diversos tipos celulares y de metabolitos humanos, reportados previamente, han mostrado los datos por intervalos de confianza o por medio de percentiles,⁴⁸⁻⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵⁴ atribuyendo a cada procedimiento su utilidad y especificidad dependiendo a la correlación de los datos con la realidad. En el caso de nuestro trabajo, los valores normales de células CD3-/CD16+CD56 para la totalidad de la población y para los grupos estratificados por género y edad, se establecieron a través de los

cálculos de percentiles, como el mejor cálculo de medida de localización que divide la distribución de los datos en partes iguales y permite la clasificación del valor de CD3-/CD16+CD56 de un individuo dentro de la población manejada.⁴⁴⁻⁴⁶ Es así como, la determinación del valor inferior y superior de las células NK de los individuos evaluados fueron obtenidos por los percentiles P5 y P95, de tal manera que, el P95 indicó que el 95% de los individuos evaluados tenían un valor inferior a él.

El porcentaje de la distribución del percentil P50 observado en la totalidad de la población, en hombres y mujeres fue proporcional a pesar de los diferentes tamaños de las muestras de cada grupo de individuos comparado.

Publicaciones internacionales de valores normales de linfocitos expresan valores de CD3-/CD16+CD56 similares a los obtenidos en este trabajo. Aunque aquellos resultados estén influenciados por diferentes factores biológicos como la raza y los hábitos alimenticios, los valores normales de linfocitos asesinos no demuestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

Así, Abdula Al Qouzi et al expresan que el número de los linfocitos y sus subpoblaciones se encuentran influenciados por las características genéticas y ambientales propias de cada población. Sin embargo, bajo las grandes diferencias ambientales y genéticas atribuidas a la población latinoamericana, los valores normales de linfocitos NK tienen un comportamiento similar a los de publicaciones de poblaciones africanas, asiáticas y europeas.⁴⁹

Por otro lado, en este estudio hemos demostrado que los valores normales de los linfocitos NK en hombres son mayores que los presentados en las mujeres,

comportamiento que es similar para varias pruebas de laboratorio. De igual manera, se comprobó que entre el rango de edad de 18-56 años no existe ninguna diferencia marcada de los valores normales para éstas células, lo que contrasta con lo reportado anteriormente por Brittenden et al.,¹¹ quienes concluyeron que las células NK presentaban un aumento en el número y en la citotoxicidad en individuos mayores de 80 años debido a la maduración del linaje.¹¹

En tal caso, la importancia de establecer los valores normales de células asesinas naturales radica en otorgar diagnósticos y pronósticos clínicos precisos acerca de la fisiopatología de un individuo. Por ejemplo, la presencia de células NK con baja citotoxicidad se relaciona con una elevada expresión de CD56 y disminución de CD16.¹ De igual forma, el establecimiento de valores normales llega a ser útil en el control de rechazos de trasplantes de médula ósea, donde un aumento moderado del número de células NK indica la presencia de un proceso de rechazo,¹⁻¹¹ aportando de esta manera en el esclarecimiento del estudio de la relación celular Receptor-Donante.¹¹⁻¹²⁻²⁷⁻³²

8. CONCLUSIONES

- Los valores absolutos y relativos de leucocitos y de linfocitos no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon los tres métodos utilizados, validando de esta manera los resultados obtenidos.
- Los valores normales de linfocitos asesinos naturales establecidos cuando se consideran los datos de la población total, están comprendidos entre 6% que equivale a 118cél/ μ l y 28% a 603cél/ μ l. El valor de leucocitos corresponde a 4400 1cél/ μ l y a 8450 1cél/ μ l; el valor relativo de linfocitos se encuentra entre 21% a 43% y el valor absoluto a 1354 1cél/ μ l a 3031cél/ μ l.
- Cuando la población se estratificó por género, se obtuvo que en las mujeres los valores de células CD3(-)/CD16CD56(+) se encuentran entre 5% que equivale a 102cél/ μ l y 24% que corresponde a 542cél/ μ l. El recuento de leucocitos se encuentra entre 4888 cél/ μ l y 8688 cél/ μ l; los valores de linfocitos entre 24% que equivale a 1427 cél/ μ l y 40% que corresponde a 2880 cél/ μ l.
- En los hombres, los valores de las células CD3(-)/CD16CD56(+) se encuentran entre 6% que equivale a 128cél/ μ l y 29% que corresponde a

619cél/ μ l. El recuento de leucocitos se encuentra entre 4358cél/ μ l y 8688cél/ μ l; los valores de linfocitos entre 21% que equivale a 1326cél/ μ l y 45% que corresponde a 3081cél/ μ l.

- Cuando se compararon los valores absolutos y relativos de células NK en la población de hombres con la de mujeres, se encontró una diferencia estadísticamente significativa, lo que está de acuerdo con lo que ha sido descrito en la literatura.
- Cuando la población se estratificó por edad, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de 18-34 y 35-56 años.
- Los rangos de valores normales de células NK son considerablemente similares a los establecidos en los estudios realizados en otros países, por lo cual se puede emplear como patrón para determinaciones en individuos Colombianos comprendidos entre las edades de 18 a 56 años.
- Los valores absolutos y relativos de linfocitos NK pueden ser adoptados para correlacionarse con una población de individuos que cumpla las características de la población manejadas por el presente estudio de investigación.

9. PERSPECTIVAS

- La evaluación de este tipo celular por citometría de flujo utilizando una metodología directamente cuantitativa como TruCount complementaría en gran medida este estudio, ya que se disminuirían los errores implícitos en la cuantificación indirecta .
- Para la continuidad de este trabajo podríamos sugerir el establecimiento de valores normales de las células NKT, para otorgar diagnósticos y pronósticos clínicos relacionados con enfermedades autoinmunes.
- El presente estudio es de gran ayuda para el diagnóstico de pacientes con desordenes celulares entre los 18 a 56 años. Sin embargo, es necesario estandarizar otros valores normales dentro de nuestra población para otras edades ya que las enfermedades linfoproliferativas o a fines se exhiben también en niños, y adultos de edad avanzada.
- Para un buen aporte clínico se hace necesario el estudio y correlación fisiopatológica de esta población linfocitaria en el personal medico; llegando a convertir este ensayo en una prueba de rutina en vista de la

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

utilidad clínica para el diagnóstico de un caso y por consiguiente un oportuno y óptimo tratamiento.

ANEXO N°1

INFORME DE CONSENTIMIENTO

Fecha _____

Yo _____ (o la del representante),
identificado con la cédula de ciudadanía No. _____ de
_____ declaro que he sido informado de los siguientes aspectos
concernientes al estudio **“ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE
LINFOCITOS ASESINOS NATURALES (NK) EN UNA POBLACIÓN ADULTA
DE BOGOTÁ”** en el que participaré voluntariamente como sujeto:

1. Se me tomará una muestra de 3 ml de sangre completa no anticoagulada. Esta muestra no será utilizada para ningún otro estudio sin mi consentimiento.
2. Los resultados de esta investigación no tienen un valor clínico y no podrán ser divulgados a mi nombre sin una autorización escrita de mi parte.
3. Los resultados obtenidos del estudio serán utilizados solo por la Pontificia Universidad Javeriana y como datos para difusión en un medio estrictamente académico, conservando el anonimato.
4. Los investigadores no obtendrán ningún beneficio económico de este proyecto sin mi consentimiento.
5. Que se me ha informado y estoy de acuerdo con los demás parámetros registrados en Artículo 15 de la resolución No. 008430 de 1993 (4 de Octubre de 1993) del Ministerio de Salud de la República de Colombia.

Yo _____, como sujeto del estudio me comprometo a que toda la información que brinde será ajustada a la verdad.

Declaro que estoy de acuerdo con lo anterior y que participo voluntariamente y no he sido sometido a ninguna intervención que coaccione física o moralmente esta decisión.

Firma

Testigo 1

c.c.

c.c.

ANEXO N°2

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN E INCLUSIÓN

DATOS DEL DONANTE:

Apellidos y nombres completos, edad, sexo, lugar y fecha de nacimiento, ocupación, tipo y n° de documento, dirección, teléfono, tipo de donación (autotransfusión, solidaria, dirigida), LA NEGACIÓN DEL DONANTE A APORTAR ESTOS DATOS FUE MOTIVO DE EXCLUSIÓN.

- Los donantes menores de edad según la ley vigente pueden ser aceptados solamente en caso de que hayan obtenido por escrito el consentimiento para donar sangre, como exige la legislación .(el banco de sangre en mención cumple esta regla a cabalidad, sin embargo, para el estudio las personas menores de edad fueron EXCLUIDAS).
- Los donantes de la tercera edad pueden ser aceptados si los médicos del banco de sangre lo estiman oportuno. De hecho, muchos bancos de sangre admiten donantes mayores sin objeciones. (en el tiempo que se realizó el estudio, fueron muy pocos los casos de personas de tercera edad, por lo tanto nosotros tomamos el límite de edad en 60 AÑOS).

CUESTIONARIO:

*¿ha donado sangre alguna vez? El volumen de sangre extraída en un intervalo de 8 semanas no debe ser superior a los 500ml, por lo tanto las personas que donaron durante ese tiempo fueron EXCLUIDAS.

*¿Se siente en buen estado de salud?, ¿ha sido declarado alguna vez como no apto para donar sangre o ha tenido problemas al donar sangre?

Dependiendo del motivo del rechazo anterior fue causa o no de criterio de EXCLUSIÓN.

*¿Ha tenido fiebre en los últimos 8 días?, ¿Ha estado en los últimos 6 meses en zonas de malaria? ¿Ha sido vacunado en el último años?.

*¿Ha sufrido los últimos 6 meses algún accidente intervención quirúrgica o ha estado como paciente en un hospital? Si la respuesta es sí, serán RECHAZADOS, como mínimo hasta 6 meses después de lo ocurrido.

*¿Ha tenido enfermedades del hígado?, ¿ha tenido enfermedades del corazón, pulmones, dolor de pecho, dificultad respiratoria, enfermedades de la piel o cáncer?

Una enfermedad coronaria o una dolencia cardiaca, que hayan dejado secuela son causas de RECHAZO. Cualquier enfermedad pulmonar activa son causas de RECHAZO, en cambio, el hecho de haber padecido tuberculosis anteriormente, si ésta ha sido debidamente tratada y ya no es una enfermedad activa, no es motivo para descalificar a un donante. Las enfermedades hepáticas activas, ya sea inflamatoria o degenerativas son causas de RECHAZO.

*¿Se ha inyectado drogas alucinógenas y/o estimulantes? ¿ha tomado medicamentos o se ha aplicado inyecciones en el ultimo mes? Por lo general los

medicamentos que toma el donante no afectan en mucho. Normalmente cuando son rechazados no se hace por el medicamento si no por la enfermedad. Las personas que toman drogas estimulante regularmente no lo dicen por lo tanto es necesario observar muy bien físicamente el donante, en cualquier tipo de duda como por ejemplo se presentó con tos, náuseas, mareos, dolores de la menstruación o excesivo nerviosismo; se avisa al médico o es rechazado.

*¿Ha perdido peso recientemente sin razón alguna? Una pérdida de peso sin causa justa se considera excesiva a partir de 4.5 Kg y puede ser indicio de alguna enfermedad seria que aún no ha sido diagnosticada.

Las personas que hayan padecido de cualquier clase de cáncer excepto el cáncer de cuello uterino, o cáncer menor de piel, fueron RECHAZADAS.

La tendencia anormal a las hemorragias por un tipo de corte, por extracción de alguna pieza dentaria, puede ser causa de RECHAZO y debe ser evaluada por médicos del banco de sangre.

Aunque a la sangre de los donantes se le realizan las pruebas pertinentes para enfermedades infecciosas, es necesario preguntar en el cuestionario ¿si ha tenido alguna vez enfermedades venéreas y si ha estado en contacto con enfermos de SIDA?.

DATOS DEL ESTUDIO DEL DONANTE:

INCLUSIÓN:

- Aquellos donante que su hematocrito es mayor de 45%
- Aquellos donantes que su peso es mayor a 51Kg
- Aquellos donantes menores de 60 años
- Donantes negativos para alguna prueba de enfermedades infecciosas

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

ANEXO N°3 FORMATO DE CUESTIONARIO



**BANCO DE SANGRE
ENCUESTA PARA DONANTES**

No. Bolsa

FECHA		
D	M	A

DATOS DEL DONANTE			
APELLIDOS Y NOMBRES COMPLETOS	EDAD	SEXO	HISTORIA CLINICA
LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO	OCUPACIÓN	TIPO Y No. DE DOCUMENTO	
DIRECCIÓN	TELÉFONO CASA	TELÉFONO OFICINA	
TIPO DE DONACIÓN <input type="checkbox"/> Autotransfusión <input type="checkbox"/> Solidaria <input type="checkbox"/> Dirigida	NOMBRE DEL PACIENTE PARA QUIEN ESTÁ DONANDO		
CUESTIONARIO			
<p>Estimado donante por favor conteste con exactitud todas las preguntas marcando con una X en la casilla correspondiente. Las preguntas que no entienda, puede resolverlas con la enfermera.</p>			
	SI	NO	
1. ¿Ha donado sangre alguna vez? ¿Cuándo? _____ ¿Dónde? _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16. ¿Ha perdido peso recientemente sin razón alguna?
2. ¿Se siente en buen estado de salud?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	17. ¿Ha tenido en las últimas 3 semanas contacto con enfermos afectados de alguna enfermedad contagiosa (Sarampión, Rubéola, Paperas)?
3. ¿Ha sido declarado alguna vez como no apto para donar sangre o ha tenido problemas al donar sangre? ¿Cuál? _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	18. ¿Ha sufrido de sudor durante la noche o hinchazón de los Gargajos Linfáticos, Manchas en la boca, Tos persistente o Diarrea en los últimos 6 meses?
4. ¿Ha tenido fiebre en los últimos 8 días?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	19. ¿Realizará usted algún trabajo después de la donación? ¿Cuál? _____
5. ¿Ha estado en los últimos 8 meses en zonas de Malaria?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	20. ¿Ha sufrido enfermedades graves?
6. ¿Ha sido vacunado en el último año? ¿Cuál vacuna? _____ ¿Cuándo? _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	21. ¿Ha tenido alguna enfermedad del corazón, pulmones o sangre, dolor de pecho, dificultad respiratoria, enfermedades de la piel o Cáncer?
7. ¿Ha sufrido los últimos 6 meses algún accidente, intervención quirúrgica o ha estado como paciente en un hospital?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	22. ¿Ha tomado medicamentos o se ha aplicado inyecciones en el último mes? ¿Cuáles? _____
8. ¿Ha tenido Ictericia, Enfermedades del Hígado, Hepatitis o Análisis de Sangre Positivo para Hepatitis?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	23. ¿Ha tenido extracción de dientes o cirugía en la encía, en los últimos 3 días?
9. ¿Se ha inyectado drogas alucinógenas y/o estimulantes?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	24. ¿Ha tenido enfermedades venéreas?
10. ¿Ha estado en contacto con enfermos de SIDA, Ictericia, Hepatitis o sometido a Diálisis en los últimos 6 meses a un año?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SÓLO PARA MUJERES
11. ¿Ha recibido transfusiones de sangre o sus componentes en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	25. ¿Ha estado embarazada, ha tenido hijos en los últimos 6 meses, o se encuentra en período de lactancia?
12. ¿Se ha hecho tatuajes o acupuntura en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	26. ¿Es común el sangrado abundante en sus menstruaciones?
13. ¿Ha tenido Malaria alguna vez?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	27. ¿Fecha de la última menstruación? _____
14. ¿Ha tomado medicamentos contra el Paludismo o Malaria en los últimos 3 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
15. ¿Ha tenido alguna vez Convulsiones, Ataques Eptépicos, Desmayos y/o Mareos frecuentes?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

VER RESPALDO

FORM 01/98

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*

28. ¿Aceptaría Ud. ser llamado para una nueva donación en caso de emergencia? SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	APTO PARA DONAR		
Haga constar con mi firma que he contestado honestamente a todas las preguntas que se me han hecho, que he recibido toda la información necesaria y entiendo que esta información es importante para evitar que mi sangre produzca alguna infección a quien la recibe. Autorizo al Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio a utilizar mi sangre y sus componentes como juzgue conveniente, así como analizarla para HbsAG, Core, anticuerpos contra Eritrocitos, T.Palidum, VIH 1-2, HVC, T. Cruzii y otras pruebas que en determinado momento sean necesarias para garantizar la seguridad del receptor.	<table border="1" style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center; padding: 5px;">SÍ</td> <td style="width: 50%; text-align: center; padding: 5px;">NO</td> </tr> </table>	SÍ	NO
SÍ	NO		
FIRMA DEL DONANTE _____	C.C. No. _____		

ESPACIO RESERVADO PARA EL BANCO DE SANGRE						
PESO	PULSO	PRESIÓN ARTERIAL	TEMPERATURA	BRAZO		
				<input type="checkbox"/> Satisfactorio <input type="checkbox"/> Insatisfactorio		
% HEMATOCRITO	Hb	APARIENCIA GENERAL	INGESTA	FLEBOTOMIA	¿PRESENTÓ REACCIÓN ADVERSA?	
			<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
TPO		MEDIDA	CLASE DE BOLSA		No. LOTE	
CANTIDAD EXTRAÍDA		DURACIÓN DE LA DONACIÓN		RESPONSABLE		
		Hr. Inicio	Hr. Fin			
COMPONENTES PROCESADOS						
<input type="checkbox"/> Sangre Total <input type="checkbox"/> Glóbulos Rojos <input type="checkbox"/> Plaquetas <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/> Crioprecipitados <input type="checkbox"/> Otros, ¿Cuál? _____						

RESULTADO DE LAS PRUEBAS						
HIV	HBsAG	HVC	CHAGAS	GRUPO SANGUINEO	Rh	SFLS
ANTICORE OTRAS				RASTREO DE ANTICUERPOS		
FIRMA BACTERIÓLOGA			FECHA	FIRMA BACTERIÓLOGA		
			D M A			
¿SANGRE APTA PARA TRANSFUNDIR?						
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO Motivo: _____						
¿SANGRE APTA PARA TERCEROS?						
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO Motivo: _____						
OBSERVACIONES:						

BIBLIOGRAFÍA

1. SEAMAN, William E. Natural killer cells and natural killer T cells. En: Arthritis & rheumatism. Vol. 43, No. 6, (june, 2000); p. 1204-1217.
2. MAKINO, Yasuhiko et al. Development of V α 14⁺ NK T cells in the early stages of embryogenesis. En: Immunology. Vol. 93, (june, 1996); p. 6516-6520.
3. DANG, Y. et al. Natural killer 1.1⁺ $\alpha\beta$ T cells in the periimplantation uterus. En: Immunology. Vol. 101. (2000); p. 484-491.
4. KANE, Kimberly et al. Determination of natural killer cell function by flow cytometry. En: Clinical and diagnostic laboratory immunology. Vol. 3. No. 3. (may, 1996); p. 295-300.
5. ARCK, Petra, DIETL Johannes y CLARK David. From the decidual cell internet: trophoblast-recognizing T cells. En: Biology of reproduction. Vol. 60. No. 2. (1999); p. 227-233.
6. ITO, Katsura et al. Involvement of decidual V α 14 NKT cells in abortion. En: Immunology: proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. Vol. 97. No. 2. (january, 2000); p 740-744.
7. DAVIS, Daniel et al. The human natural killer cell immune synapse. En: Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. Vol. 96. No. 26. (december, 1999); p.15062-15067.
8. BENNET, I, y PERUSSIA, B. Definition of natural killer NKR-P1A⁺/CD56/CD16⁺ Functionally immature Human NK cell subset that differentiates in vitro in presence of interleukin 12. En: J.Exp.Med. Vol. 184. (1996); p. 1845-1856.
9. SHINOARA, K. y WAKASUGI, H. Functional and phenotypical characteristics of hepatic NK-like T cells in NK 1.1-positive and negative mouse strains. En: The journal of immunology: American association of immunologist. Vol. 29. (1999); p. 1871-1878
10. LACHAPPELLE, Marie-hélène et al. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion: altered profile and pregnancy outcome. En: The journal of immunology. american association of immunologist. Vol. 22. No. 1767. (february, 1996); p. 4027-4034.
11. BRITTENDEN, Julie. Natural killer Cells and Cancer. En: Cancer. Vol. 77. No. 7. (april, 1996); p. 1226-1243.
12. CEBECI, Irfan et al. Analisis of peripheral blood leukocytes in patients with cyclosporine A-induced gingival hiperplasia. En: The journal of periodontology. Vol. 69. No. 12. (december, 1998); p.1435-1439.
13. SALGADO, Helí et al. Guía de estudio y manejo del paciente sospechoso de presentar alteraciones en la respuesta inmune celular

- específica. En: Revista de la asociación colombiana de alergía, asma e inmunología. Vol. 9. No. 1. (2000); p. 9-13.
14. GOETZMAN Elizabeth. Flow Cytometry: Basic Concepts and Clinical Applications in immunodiagnosics. En: Clinical Laboratory Science. Vol. 16. No. 3 (may/june,1993); p. 177-182.
 15. BOGH, lisa y DULING, Teresa. Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories. En: Clinical laboratory science. Vol. 6. No. 3. (may/june, 1993); p. 167-173.
 16. EKONG, T et al. Technical influences on immuphenotyping by flow citometry: the effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. En: The journal of immunologic Methods. Vol: 164. (1993); p: 263-273.
 17. ABBAS Abul, a; lictman, a; Puber, J. Inmunología celular y molecular, 3 ed. España: Interamerican 1999.
 18. FEHNIGER Todd A. and Caligiuri Michael A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. En: Blood vol. 97 N.1 (1 january 2001); p.14-29.
 19. ROITT Ivan, Brostoff Jonathan, David male. Inmunología: Fundamentos. fith edition Mosby london philadelphia st Louis Sydney Tokyo 1998.
 20. DERBY Eric, et al. Three-color Flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell mediated cytotoxicity. En: Immunology letters. vol 78 (may 2000); p. 35-39.
 21. KENNETH, J. Warrington, et al. CD4+, CD28-T Cells in Rheumatoid Arthritis Patients Combine Features of the Innate and Adaptive Immune Systems. En: Arthritis y rheumatism. Vol: 44 (2001); p: 13-20.
 22. MANDELBOIM Ofer and et al. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. En: Proc. Nattl. Acad. Sci. Vol 96 (1999); p: 5640-5644.
 23. LANIER Lewis L. NK Cell Receptors. En: Annu.Rev. Immunol.Vol 16 (1998); p.359-383.
 24. VASQUEZ Luis, Romero Marisol, León Raiza, Contreras Marisela. Introducción a la bioestadística y a la epidemiología. Mc Graw Hill Interamericana. Caracas. 1998. p25-40.
 25. VITALE Massimo and Semenzato Gianpietro. Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. En: Blood vol.102. N.5 (1 septiembre 2003);p. 197-1805.
 26. YOKOYAMA, Wayne M. The mother-child union: the case of missing-self and protection of the fetus. En: Proceeding national academy of sciences of the United States of American. Vol 94 (june 1997); p: 5998-6000.
 27. LANIER, Lewis. Natural killer cells fertile with receptors for HLA-G?. En: Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. Vol. 96. (may, 1999); p. 5343-5345.
 28. FERLAZZO Guido, Tsang Ming L. et al. Human Dendric Cells Activate Resting Natural Killer (NK) cells and Are Recognized via the NKp30

- Receptor by Activated NK Cells. En: J. Exp. Med. V.195 N. 3, (february 4 2002); p.343-351.
29. ARDAVIN Carlos, Martinez Gloria, Martín Pilar y et al. Origin and differentiation of dendritic cells. En: TRENDS in immunology. Vol 22.N.12 (December 2001); p:691-700.
 30. WALKER, Christoph and CHECKEL, James. Et al. IL-5 Production by NK Cells Contributes to Eosinophil infiltration in a Mouse Model of Allergic Inflammation. En: The Journal of Immunology. Vol.191. (1998);p.1962-1969.
 31. THIBODEAUX Deborah and et al. Autocrine Regulation of IL-12 Receptor Expression IS Independent of Secondary INF- γ Secretion and not Restricted to T and NK cells. En: The journal of Immunology. Vol. 163 (1999); p:5257-5264.
 32. LJUNGGREN Hans-Gustaf and Karre Klas, In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. En: Immunology today. Vol 11,N. 7 (1990); p: 237-244.
 33. THYSS A, Caldani C, Bourcier. Comparison of NK activity during the first and second halves of the menstrual cycle in women. En: Br J. Cancer. vol 50,(1984);. pag127-128.
 34. MELLQVIST Ulf-Henrik, Hansson Markus et al. Natural Killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. En: Blood, Vol 96 N. 5.(1 September 2000); p: 1961-168.
 35. MING-Yih Wu, et al. Increase in the expresión of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. En: American Society for reproductive medicine. Vol 74 N.6 (Decembre 2000); p: 1187-1191.
 36. BRUCE Alberts, Johnson Alexander, Lewis Julian. Molecular Biology of the cell. 2002 4ed, Garland Science Taylor y Francis Group.
 37. DEAN Phillip, Flow Cytometry Intrumentation, Current Protocols en cytometry 1999.
 38. GONZALEZ John Mario, Peña Olga Mercedes. Análisis de la tipificación de Leucemias por citometría de flujo en Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, noviembre,2000.
 39. RILEY Roger, Ross William and Perfetto Steve. Setting up a flow cytometry laboratory. En: Basic princeples in clinical flow cytometric.
 40. COLIGAN, John et al. Flow cytometry instrumentation En: Current protocos in immunology. New York. John Wiley & Sons, 1991.
 41. PIRRUCCELLO Samuel. Reagents for Flow Cytometric monoclonal antibodies and hematopoietic cell antigens. Cap 3. McCoy J.Philip cap 2 Basic princeples in clinical flow cytometric.
 42. BECTON Dickinson. Simultest CD3/CD16+CD56 (leu-4/11c+19) reagent. November (1993).
 43. NIÑO Hipolito, Barrera luis. Garantía de calidad en el laboratorio clínico. 1 ed. 1993. Panamericana. Bogotá.
 44. SCHEER. Douglas W. Evaluación de métodos y estadística. Cap3. SASSE, Edward A. Valores de referencia. Cap4.

45. RUIZ, Álvaro, GÓMEZ, Carlos y LONDOÑO, Darío. Investigación clínica: Epidemiología clínica aplicada. Primera edición. CEJA Centro editorial javeriano. Bogotá. 2001
46. MILTON J. Susan. Estadística para biología y ciencias de la salud: Inferencia sobre la media. 2da edición. Madrid: Mc Graw Hill. 1994. p. 165-209.
47. KAZMIER Leonard J. Estadística aplicada a la administración y a la economía. 3ra edición. Mc Graw Hill. 1999. p. 51-53.
48. GONZALEZ John Mario y col. Determinación de valores de linfocitos TCD3+, CD3+/CD4 y CD3+/ CD8+ por citometría de flujo en adultos donantes de sangre del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. En: acta médica colombiana. Vol. 26, N 6 (Noviembre-Diciembre 2001); p.280-285.
49. AL QOUZI Abdulla and et al. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Saudi men. En: Clinical and diagnostic laboratory immunology. Vol 9 N.2. (Mar 2002); p: 279-281.
50. SANTAGOSTINO Alberto and et al. An Italian national multicenter study for the definition of a reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. En: Haematologica. Vol 84 (1999); p: 499-504.
51. KASSU Afework and et al. Distribution of lymphocyte subsets in healthy human immunodeficiency virus negative adult ethiopians from two geographic locales. En: Clinical and diagnostic laboratory immunology. Vol 8 N.6 (Nov 2001); p: 1171-1176.
52. SATISH K. Et al. Decreased non-MHC-restricted (CD56+) killer cell cytotoxicity after spaceflight. En: J. Appl Physiol. Vol 91(june 19 2001); p.1814-1818.
53. LAHTI Ari and et al. Impact of subgroup prevalences on partitioning of gaussian- distributed reference values. En: Clinical chemistry. Vol 48 N. 11. (2002); p: 1987-1998.
54. CORTES Blanco A y colaboradores. Valores de referencia de hormonas tiroideas y tirotropina y tiroglobulina en niños sanos Zaragozanos. En: Anales Españoles de Pediatría. Vol51 N. 4 (1999); p: 361-368.
55. VOSE, B.M et al. Lectin-binding characteristics of human natural cells. En: Immunology. Vol. 46, N 619 (1982); p.619-626.
56. PONTE. Marco, et al. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: Decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol:96. (May 1999);p: 5674-5679.
57. ACHDOUT. Hagit, et al. Enhanced recognition of human NK receptors after influenza virus infection. En: The journal of immunology. Vol. 171 (2003);p. 915-923.
58. DIEFENBACH. Andreas and RAULET. David H. Natural killer cells: stress out, turn on, tune in. En: Current Biology. Vol. 9 N.22 (1999); p.851-853.

59. GANSERT. Jennifer, et al. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. En: The journal of immunology. Vol. 170 (2003);p. 3154-3161.
60. PRINCE. Harry E, et al. Influence of racial Background on the Healthy Blood Donors. En: Diagnostic Immunology. Vol 3 (1985);p.33-37.
61. REICHERT. T, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. En: Clinical Immunopathology. Vol 60 (1991);p: 190-208.
62. KIMURA Shinya et al. Nephrotic syndrome with crescent formation and massive IgA depositions following allogeneic bone marrow transplantation for natural killer cell leukemia/ lymphoma. En: Blood. Vol 101 N. 10. (15 may 2003); p.4219-4221.
63. BORREGO. Francisco, et al. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes. En: The journal of immunology. Vol 169 (2002);p. 6102-6111.
64. KENNA. Tony, et al. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. En: The journal of immunology. Vol. 171. (2003);p.1775-1779.
65. LANIER II, PHILLIPS JH y WARNER NL. Subpopulations of human natural killer cells defined by colorimetry of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. En: The journal of immunology. Vol. 131. (1983); p.1789-1796.
66. ROBERTSON, MJ y RITZ J. Biology and Clinical colorimetric of human natural killer cells. En: Blood. Vol. 76 (1990); p.2421-2439.
67. AUDESIRK, Teresa, Biología La vida en la Tierra, 4 ed, Prentice may. Hispanoamericana, S:A:México 1996 p. 650
68. ED HARLOW, David Lane. Antibodies a laboratory manual. 2da Edición. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988;p:1-6.
69. CHANG L, G.A, et al. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. En: J. Immunol. Methods Vol. 16 N. 6(1993);p.45-54.
70. SATO. Naoko, et al. Functional characterization of NK1.1+ Ly-6C+ cells. En: Immunology letters. Vol 54 (1996); p. 5-9.
71. Disponible en Internet:
www.encolombia.com/medicina/alergia/alergia9300-inmunodef1.htm
72. Disponible en Internet:
www.perfilesytrazas.com.co/perfiles/inmunológico.htm
73. Disponible en Internet:
www.medicentro.com.co/laboratorio.htm

*Establecimiento de valores normales de linfocitos asesinos naturales (NK)
en una población adulta de Bogotá*