



## **Relació entre el percentatge i número absolut de cèl·lules Natural Killer i de l'expressió dels seus receptors NKG2D i NKp46 i les diferents formes de presentació de la Tuberculosi. Resultats preliminars.**

**Relationship between the percentage and absolute number of Natural Killer cells and the expression of its receptors NKG2D and NKp46 in different forms of presentation of Tuberculosis. Preliminary results.**

**Autor :** Emília Solé Altarriba

**Director del projecte:** Dr Hernando Knobel Freud

**Nom de la institució a la que pertany:** Parc de Salut Mar. Servei de Medicina Interna- Malalties Infeccioses

Departament de Medicina / Universitat Autònoma de Barcelona

Treball de Recerca. 2011-2012. Convocatòria de Setembre

## CERTIFICAT DEL DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

Dr Hernando Knobel Freud, Professor Associat del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

FA CONSTAR,

Que el treball titulat **Relació entre el percentatge i número absolut de cèl.lules Natural Killer i de l'expressió dels seus receptors NKG2D i NKp46 i les diferents formes de presentació de la Tuberculosi**, ha estat realitzat sota la seva direcció pel llicenciat **Emília Solé Altarriba**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2011-2012), a la convocatòria de **setembre**.

Barcelona, 30 d'agost de dos mil dotze.

1. Fitxa tècnica	3
2. Resum	4-5
3. Introducció-Justificació del projecte	6-9
4. Material i mètodes	10-12
5. Resultats	13-14
6. Taules i gràfiques	15-17
7. Discussió	18-22
8. Conclusions	23
9. Agraïments	24
10. Bibliografia	25-27
11. Anex 1	28

**Títol:** Relació entre el percentatge i número absolut de cèl.lules Natural Killer i de l'expressió dels seus receptors NKG2D i NKp46 i les diferents formes de presentació de la Tuberculosis.

**Title:** Relationship between the percentage and absolute number of Natural Killer cells and the expression of its receptors NKG2D and NKp46 in different forms of presentation of Tuberculosis.

**Paraules clau:** *Mycobacterium tuberculosis*, immunitat innata, cèl.lules Natural Killer, receptors de les cèl.lules NK, tuberculosi extrapulmonar, immigració

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, innate immunity, Natural Killer cells, Human Natural Killer receptors, extrapulmonary tuberculosis, immigration.

La tuberculosi (TB) és de localització preferentment pulmonar (TB pulmonar), però, pot afectar qualsevol altre òrgan (TB extrapulmonar).

Les cèl.lules Natural Killer (NK), del sistema immune innat, actuen en la resposta enfront la TB i tenen regulada la seva funció citotòxica a través de la interacció lligand/receptor d'activació o inhibició.

Se sap que la freqüència de la TB extrapulmonar augmenta amb el compromís del sistema immunitari de l'hoste.

L'objectiu d'aquest estudi preliminar ha estat el d'analitzar una possible relació entre el percentatge i número absolut d'NK -i/o en l'expressió dels seus receptors d'activació -NKG2D i NKp46- i el fet de desenvolupar la malaltia pulmonar (TB-P) o extrapulmonar (TB-EP).

L'estudi ha estat realitzat amb un total de 15 pacients amb TB-P, 15 pacients amb TB-EP i 15 controls sans.

S'han trobat valors numèrics més baixos de limfòcits en plasma en el grup de malalts, un augment en el percentatge d'NK en els malalts amb TB-P i uns valors absoluts d'NK disminuïts en els malalts respecte dels sans (més important en els malalts amb TB-EP). L'expressió d' NKG2D va mostrar una tendència a valors més alts en el grup de malalts, sobretot en TB-EP, i l'expressió d'NKp46 va ser menor en els malalts amb TB-P respecte els altres grups. Malgrat aquestes diferències, en cap de les comparacions la diferència fou estadísticament significativa.

Les coincidències amb d'altres estudis i les troballes preliminars del nostre treball obren possibilitats a futures investigacions en el camp de la TB-EP i la reacció immune.

Tuberculosis (TB) is preferably located in the lungs (pulmonary TB) but can also affect any other organ (extrapulmonary TB).

Natural Killer cells (NK) of the innate system are related with the response against TB and their cytotoxic function is regulated through the activation or inhibition of the ligand/receptor interaction. It has been also demonstrated that the extrapulmonary TB incidence increases with the impairment of the immune system of the host.

The goal of this preliminary study has been to analyze the potential relationship between the percentage and absolute number of NK cells – and/or in the expression of their activator receptors NKG2D and NKp46 - and the development of the disease in the pulmonary (P-TB) or extrapulmonary (EP-TB) form.

The study has been carried out in a total of 15 P-TB patients, 15 EP-TB patients and 15 healthy controls.

We have found lower absolute plasma levels of lymphocytes in our patients, an NK percentage increase in P-TB cases and an absolute number decrease of NK in patients vs. healthy controls (being more significant in the EP-TB individuals). The expression of NKG2D showed a trend towards higher levels in the group of patients, more important in EP-TB, and the NKp46 expression was decreased in P-TB patients vs. healthy controls and EP-TB cases. However, none of these differences reached statistically significant levels.

The agreement with other studies and the preliminary findings in our work open the possibility of further investigation in the field of EP-TB and immune reaction.

### 3. INTRODUCCIÓ- JUSTIFICACIÓ DEL PROJECTE

La Tuberculosi (TB), causada pel *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) i descoberta per Robert Koch l'any 1882, és la infecció bacteriana més important del món. Cada any moren més d'un milió i mig de persones i apareixen 8 milions de nous casos (1). La via habitual de transmissió és l'aèria i, generalment, la infecció s'estableix al pulmó. La capacitat d'infecció depèn del nombre de bacils eliminats pel cas índex i de la susceptibilitat de l'hoste. El sistema immunitari de la majoria de les persones infectades és capaç de destruir el bacteri o d'inhibir-ne el creixement i mantenir-lo en estat de latència. En aquest sentit, la OMS estima que un terç de la població mundial estan infectats però que només el 10% desenvoluparan la malaltia al llarg de la seva vida, sent els dos anys següents a la infecció el període de temps amb major risc d'emmalaltir (2).

Hi ha determinades malalties que disminueixen la resistència de l'organisme a desenvolupar la TB, com la silicosis, la diabetis mellitus, les malalties associades a immunodepressió -especialment la infecció VIH-, diferents teràpies immunosupressores, l'edat inferior a 2 anys, la malnutrició, el tabaquisme i l'alcoholisme, entre d'altres (3).

La forma clínica de presentació de la malaltia és molt variable quant a la localització i la gravetat, que dependrà de la virulència del micobacteri i de la immunitat de l'hoste (4).

L'agent causal penetra en l'organisme -quasi de forma exclusiva- per via respiratòria, per la qual cosa la TB es localitza generalment als pulmons (TB pulmonar); però, en una proporció variable (entre el 10% i 20% del total de TB en persones immunocompetents) i, depenent dels factors prèviament descrits, es pot produir una disseminació hematògena, que donarà lloc a la TB en qualsevol altre òrgan (TB extrapulmonar) (5,6). En els països desenvolupats ha augmentat la incidència d'aquesta forma de TB com a conseqüència de l'epidèmia de la SIDA -associat a disminució dels limfòcits T CD4+ (7)- i de la immigració, sobretot de països com l'Àfrica i l'Àsia, circumstància que podria estar relacionada amb un augment de la virulència del micobacteri o amb algun defecte immunitari de l'hoste (8).

La primera barrera defensiva contra la infecció per TB és l'aparell mucociliar (5). Si la *Mt* travessa aquesta barrera, arriba als alvèols pulmonars, on hi ha cèl·lules del sistema immunitari innat: els macròfags alveolars (Ma), els monòcits (Mo), les cèl·lules dendrítiques (CD) i les cèl·lules Natural Killer (NK), entre d'altres. Si el

micobacteri sobreviu i prolifera dintre els Ma i Mo, actuen els mediadors immunitaris, com l'IFN gamma-citoquina molt potent secretada predominantment per les cèl·lules NK i les cèl·lules T- i, a través de senyals induïdes per interleuquina 12 (IL-12) i interleuquina 18 (IL-18), activen els Ma i Mo per tal d'eliminar el bacil (9,10).

En el cas que el bacil tampoc hagi estat eliminat en aquesta fase, s'activen les CD a través de la interacció entre els receptors Toll-like (TLR) i el micobacteri, i migren cap als nòduls limfàtics regionals per continuar amb la resposta immune, secretar més citokines, expressar molècules d'adhesió, atreure més Ma, Mo, NK i cèl·lules polimorfonuclears, així com presentar l'antigen als limfòcits T i activar la resposta immunitària adquirida. La resposta adquirida és cel·lular, del tipus hipersensibilitat retardada i hi participen, sobretot, els limfòcits T CD4+, CD8+ i gamma-delta (11).

És molt important que, durant tot el procés, hi hagi una bona connexió entre els elements del sistema immunitari innat i els de l'adquirit. Si els dos sistemes immunes funcionen correctament, en produir-se la infecció es formarà el granuloma i el bacil s'hi quedarà dintre en estat de latència, situació que -en la majoria de persones infectades- dura tota la vida. Però, quan es produeix una situació d'immunosupressió, el bacil inicia el seu creixement de nou, surt del granuloma i és quan es produirà el pas d'infecció al de malaltia clínica (9).

Les cèl·lules NK constitueixen la tercera estirp de cèl·lules de tipus limfoide. La majoria expressen en la superfície les molècules Fc gamma R-III (CD16) i CD56 que, junt amb altres marcadors, defineixen a aquest grup cel·lular. Les NK, en condicions normals, es poden trobar a la sang, melsa i moll d'òs i, en una proporció molt baixa, als ganglis limfàtics (12).

Participen en la primera línia defensiva enfront infeccions per alguns virus, paràsits i bacteris. També, poden intervenir en la resposta contra determinats tumors i empelts. Les seves principals funcions són la citotòxica i la secretora de nombroses citokines. A més a més, promouen l'activació del sistema mononuclear-fagocític, afavoreixen el desenvolupament d'una resposta Th1 i regulen l'hematopoesi (13).

Per tal que les cèl·lules NK desenvolupin la seva funció, han d'identificar la cèl·lula diana. Per fer-ho, expressen diferents tipus de receptors amb funció de reconeixement de molècules en les cèl·lules diana i, en conseqüència, d'activar la seva maquinària citolítica i/o secretora. L'acció final de les NK dependrà de l'equilibri entre els senyals inhibidors i activadors procedents dels seus receptors de superfície (12).



Entre els receptors destaquen els de citotoxicitat natural, específics de les cèl·lules NK, NKp30, NKp44 i NKp46, i altres com NKG2D, NKG2C, NKG2A, ILT-2, KIRs i DNAM-1; aquests últims s'expressen en les NK però, també, en altres tipus de cèl·lules, com en els limfòcits TCD8, T CD4 i gammadelta (14).

Estudis realitzats sobre les NK i els seus receptors enfront situacions clíniques patològiques mostren que un descens en l'expressió del receptor NKp30 en les NK de sang perifèrica està associat a una disminució de la funció de les NK. Aquest és el cas de la infecció per VIH-1 i de la leucèmia aguda (15,16). També, en el cas d'altres infeccions cròniques, com el VHC i CMV, l'alteració en les funcions de les NK està associada a un control pobre sobre el patogen (17,18).

Quant a la rellevància de les NK en el procés de resistència enfront la infecció tuberculosa, la literatura ens aporta alguns estudis que han evidenciat la seva participació en dita resistència, eliminant Mo i Ma infectats amb el bacil (19), secretant diferents citoquines proinflamàtores, majoritàriament IFN $\gamma$ , i participant en la maduració de les cèl·lules dendrítiques (20). Amb tot, la majoria d'aquests estudis han estat realitzats en el cas de la TB pulmonar, alguns dels quals comentarem.

Els estudis realitzats en sang perifèrica per avaluar canvis en les cèl·lules NK mostren resultats contradictoris. Si un estudi realitzat en malalts amb diagnòstic recent de TB-P mostra una disminució -tant en percentatge com en número absolut- de cèl·lules NK en el grup de donants PPD+ respecte dels malalts i donants PPD- (21), en d'altres, o no es veuen diferències (22), o es veu una disminució del valor absolut d'NK en els malalts amb TB pulmonar respecte els donants PPD+ (23).

Quant al lloc on s'ha produït la malaltia (en aquest cas, el pulmó), hi ha un estudi realitzat amb ratolins que hi mostra un augment en el percentatge de cèl·lules NK quan són infectats amb el micobacteri. Quan inactiven les NK, constaten que aquest fet no incideix en el control del creixement del micobacteri, per la qual cosa conclouen que, si bé les cèl·lules NK participen en el control de la infecció i en el pas de l'estat de latència al de malaltia, la seva funció se solapa amb la d'altres cèl·lules del sistema immune (24).

Sobre la participació dels receptors de superfície, hi ha estudis que posen de manifest que el reconeixement entre les NK i els Ma i Mo infectats amb el bacil es realitza a través dels receptors NKG2D i NKp46 (25,26). També s'han estudiat alguns dels lligands per aquests receptors que hi estan implicats, com és el cas de l'ULBP1 per al receptor NKG2D (26). Un estudi publicat l'any 2009 mostra una disminució dels

receptors NKp30 i NKp46 a l'inici del diagnòstic de TB pulmonar i conclou que aquestes alteracions podrien contribuir en el pas de l'estat de latència al de malaltia (27).

Per altra banda, i com s'ha comentat anteriorment, el fet de presentar una forma extrapulmonar tradueix una alteració més important del sistema immunològic de l'hoste, per la qual cosa és un bon model per estudiar els mecanismes fisiopatològics que intervenen en la defensa enfront el micobacteri.

Però, malgrat aquesta premissa, hi ha pocs estudis sobre malalts amb TB-EP que hagin abordat el tema dels possibles defectes immunitaris, i la majoria d'ells han estat focalitzats a estudiar els limfòcits T, especialment els CD4+, trobant-ne una reducció en sang perifèrica, sobretot en els malalts amb formes més severes de la malaltia (7,28).

Sobre l'actuació de les cèl·lules NK, només hi ha estudis en malalts amb TB pleural, que en mostren una reducció en el líquid pleural respecte sang perifèrica (29) i, respecte dels receptors de superfície, no hi ha res descrit a la literatura.

Donat que hi ha una forta evidència que les cèl·lules NK intervenen de forma important en la resposta immune contra el desenvolupament de la malaltia tuberculosa i, per l'altra, que el fet de presentar la disseminació del bacil fora del pulmó pot ser l'expressió d'algun defecte en el sistema immunitari del malalt, podria ser que alteracions en les NK -o en els seus receptors de superfície- contribuïssin a la presència de formes extra pulmonars de la malaltia, sent un camp inexplorat, tot i la seva possible rellevància.

Així, i partint d'aquesta premissa, l'eix d'aquesta investigació ha estat el de comparar el comportament de les cèl·lules NK i dos dels seus receptors d'activació en persones que han desenvolupat la malaltia en la forma pulmonar i d'altres que ho han fet en l'extrapulmonar i, ambdues, amb controls sans.

1) *Tipus de disseny*: experimental

2) *Població d'estudi*

2.1) *Descripció de la mostra*: 15 malalts amb tuberculosi pulmonar, 15 malalts amb tuberculosi extrapulmonar i 15 controls sans.

2.2) *Criteris d'inclusió*:

- Malalts amb confirmació bacteriològica: presència de tinció Zielh-Neelsen/Auramina o cultiu en medi de Löwenstein en esput o en una altra mostra biològica.
- Malalts amb alta sospita de malaltia:
  - ❖ Per tuberculosi pulmonar: clínica, antecedent epidemiològic, imatge radiològica compatible i bona resposta al tractament específic.
  - ❖ Per tuberculosi extrapulmonar:
    - \*\* Serositis (pleural, peritoneal, pericàrdica): clínica, antecedent epidemiològic, líquid compatible junt amb ADA elevat, prova de tuberculina i/o IGRAS positiu i bona resposta al tractament específic
    - \*\* Afectació de SNC: clínica, antecedent epidemiològic, LCR compatible amb ADA elevat, prova de tuberculina i/o IGRAS positiu i bona resposta al tractament específic.
    - \*\* Ganglionar: clínica, antecedent epidemiològic, prova de tuberculina i/o IGRAS positiu i bona resposta al tractament.
    - \*\* Disseminada: afectació de dos o més òrgans no contigus amb evidència microbiològica o per anatomo-patològica en almenys un d'ells.
- Malalts que portin menys de dues setmanes de tractament en el moment de l'anàlisi.
- Malalts seleccionats amb independència del sexe, raça, país d'origen, antecedents laborals, antecedent de vacunació amb BCG, resultat de la prova de tuberculina o IGRAS

### 2.3) *Criteris d'exclusió:*

- Malalts amb serologia positiva per VIH, VHC o VHB.
- Presència de malalties que debiliten el sistema immunitari: diabetis mellitus, neoplàsia activa, antecedent de transplantament d'òrgan, insuficiència renal crònica, diàlisi, malaltia autoimmunitària, embaràs.
- Malalts en tractament amb fàrmacs immunosupressors. En el cas dels corticoides, que portessin més de sis setmanes de tractament.
- Malalts de més de 65 anys o menys de 15 anys.

2.4) *Procedència de la mostra:* es van incloure en l'estudi malalts que complien els criteris d'inclusió descrits, que estiguessin ingressats a l'Hospital del Mar o visitats a Consultes Externes o a l'Hospital de Dia de Medicina Interna/Infeccioses.

### 3) *Procediment/anàlisi al laboratori*

Es van extreure 20cc de sang fresca en un tub d'EDTA, a la vegada que se'ls hi va realitzar una analítica de sang que inclogués bioquímica, funció hepàtica i hemograma. A tots els donants, prèviament a l'extracció, se'ls va informar de l'estudi i del procediment i es va obtenir, degudament signat, el consentiment informat.

El protocol del processament de les mostres està explicat amb detall a l'anex 1.

Un cop obtingudes les PBMC (cèl·lules mononucleades de sang perifèrica) es va realitzar l'anàlisi del percentatge de les NK (CD3-CD56+) i de l'expressió dels receptors d'activació NKG2D i NKp46 amb la tècnica de citometria de flux. La realització, tant del processament de les mostres com de l'anàlisi posterior, es va realitzar al Laboratori d'Immunologia de la Universitat Pompeu Fabra, localitzat al PRBB (Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona), sota la tutela i col·laboració de l'equip d'Immunologia liderat pel Dr Miguel López-Botet.

### 4) *Anàlisi estadística*

Les dades clíniques i epidemiològiques es varen extreure de la informació registrada en les històries clíniques dels malalts. Totes les dades es van registrar en el programa estadístic SPSS versió 13.0. Per al número absolut de cèl·lules NK es va realitzar el càlcul a partir del seu valor en percentatge i del valor dels limfòcits en sang.

Per a les variables amb distribució normal es va realitzar el càlcul de la mitjana i la desviació estàndard, i -per fer les comparacions entre grups i el càlcul de la p- es va utilitzar la prova paramètrica Anova i el test de Tukey. La variable NKp46 es va

transformar, elevant els corresponents valors al quadrat, per tal que presentés una distribució normal. Per a tot el procés i tractament estadístic es va rebre suport del Servei d'Estadística de l'IMIM. Es va considerar estadísticament significatiu un valor de p de  $<0.05$ .

*Característiques clíniques/demogràfiques*

A la Taula 1 hi ha la descripció de les característiques clíniques i demogràfiques dels pacients i dels controls sans.

La mitjana d'edat en els controls sans, malalts amb TB-P i malalts amb TB-EP fou de 31.8+/-7.34, 42.5+/-15.4 i 36.1+/-14.1, respectivament. Quant al sexe, predominava el sexe masculí en el grup de malalts, sobretot en els que presentaven TB-EP respecte els sans.

Per mostrar l'origen dels donants es van agrupar per continents (Taula 2).

La localització de la malaltia extrapulmonar incloïa el Sistema Nerviós Central (n=2), disseminada (n=5), pleural (n=3), peritoneal (n=3), ganglionar (n=2); tres pacients amb TB-EP tenien, a la vegada, afectació pulmonar.

Entre els malalts amb TB-P, tres van requerir oxigenoteràpia durant l'ingrés. Un d'ells va requerir ingrés a la Unitat de Cures Intensives i suport ventilatori amb VMNI (ventilació mecànica no invasiva).

La mitjana de dies entre l'inici de tractament i la inclusió a l'estudi va ser de 5.8 +/- 5.894 per la TB-P i de 4.33+/-1.95 per la TB-EP.

L'albumina era més baixa en els malalts, tant amb TB-P com amb TB-EP (3.36g/dl+/-0.76 i 3.36g/dl+/-0.46 respectivament), que en els controls sans (4.59g/dl+/-0.24).

Quant a la proteïna C reactiva, la mediana en els malalts amb TB-P i TB-EP, era de 6.95 (IC 95%: 2.65-15.5) i 6.70 (IC 95%: 2.75-9) respectivament.

*Limfòcits en plasma, Cèl·lules NK, CD3-CD56+, en sang perifèrica i els seus receptors d'activació NKp46 i NKG2D*

Els valors més baixos de limfòcits en plasma es varen trobar en el grup de malalts, sent el valor més baix el dels malalts amb TB-P, seguida dels malalts amb TB-EP. En cap de les comparacions entre grups, la diferència fou estadísticament significativa (1469.3+/-580.76, 1482+/-652.536 i 1830+/-684.556 respectivament).

En comparar el percentatge d'NK, es va observar un augment en el grup de malalts amb TB-P (18.7+/-11.9) respecte els TB-EP (16.1+/-8.04) i respecte els sans

(16.1+/-7.53). Aquesta diferència no es va considerar, però, estadísticament significativa.

En realitzar l'anàlisi de les NK en valors absoluts, es va observar un descens en el grup de malalts respecte dels sans, sent els malalts amb TB-EP els que presentaven el valor més baix (TB-EP 216+/-94.7, TB-P 245+/-125, sans 304+/-198). Tot i així, el fet de tenir valors més baixos no es relacionava amb el fet de presentar formes més greus de la malaltia.

Tant els valors d' NK en percentatge i en absolut com els limfòcits en plasma estan representats a la taula 3 i a les gràfiques 1 , 2 i 3.

Posteriorment es va realitzar l'anàlisi del percentatge d'expressió dels receptors NKG2D i NKp46. En el cas de l'NKG2D, es va veure una tendència a presentar valors més alts en el grup de malalts, sobretot els que presentaven TB-EP. En cap de les comparacions, però, fou estadísticament significativa la diferència (sans 90.6+/-9.13, TB-P 92.4+/-6.76, TB-EP 94.2+/-8.34). En el cas de l'NKp46, els malalts amb TB-P tenien menys expressió del receptor que els sans i els malalts amb TB-EP, però, en cap cas, la diferència es podia considerar estadísticament significativa (sans 7825+/-1558, TB-P 6845+/-3028, TB-EP 7282+/-1578 )(Taula 4 i gràfiques 4 i 5).

## 6. TAULES I GRÀFIQUES

	Controls sans n:15	TB-P n: 15	TB-EP n: 15
<b>Edat (anys)</b>	31.8+/-7.34	42.5+/-15.4	36.1+/-14.1
<b>Sexe masculí</b>	7 (46.7%)	11 (73.3%)	14 (93.3%)
<b>Albúmina (g/dl)</b>	4.59+/-0.24	3.36+/-0.76	3.36+/-0.46
<b>PCR(mg/dl)</b>	ND	6.95(2.65-15.5)	6.70(2.75-9)
<b>Dies de tractament</b>	ND	5.8+/-5.894	4.33+/-1.95

**Taula 1.** Característiques clíniques. Es donen els valors de la mitjana i la desviació estàndard per l'edat, albúmina i dies de tractament; per al sexe, es dona la freqüència i el percentatge. Per a la PCR, la mediana i l'IC 95%. PCR: proteïna C reactiva. ND: no disposem.

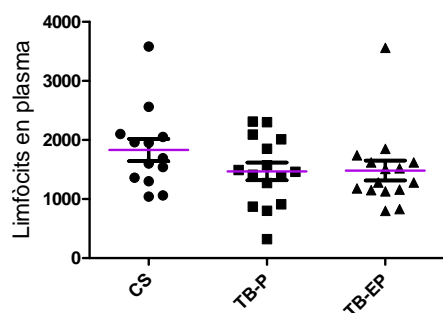
	Controls sans n: 15	TB-P n: 15	TB-EP n: 15
<b>Europa</b>	7(46.7%)	7(46.7%)	2(13.3%)
<b>Àsia</b>	4(26.7%)	3(20%)	9(60%)
<b>Àfrica</b>	1(6.67%)	2(13.3%)	3(20%)
<b>Amèrica del Sud</b>	3(20%)	3(20%)	1(6.67%)

**Taula 2.** Distribució per continents dels malalts, TB-P i TB-EP, i dels controls sans. Es donen els valors en freqüència i percentatge.

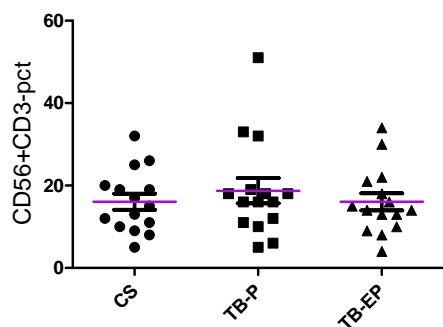


	Controls sans n: 15	TB-P n: 15	TB-EP n: 15	p CS/TB-P	p CS/TB-EP	p TB-P/TB-EP
Limfòcits (μl)	1469.3+/-580.76	1482+/-652.536	1830+/-684.556	0.306	0.331	0.998
CD3-CD56+pct	16.1+/-7.53	18.7+/-11.9	16.1+/-8.04	0.717	1	0.717
CD3-CD56+abs	304+/-198	245+/-125	216+/-94.7	0.524	0.243	0.841

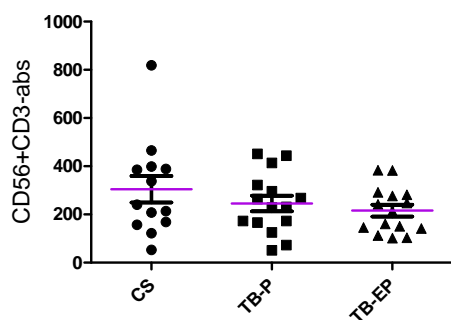
**Taula 3.** Mitjana i desviació estàndard dels limfòcits en plasma, NK en percentatge (CD3-CD56+pct) i NK en valors absoluts (CD3-CD56+abs) amb les p corresponents al realitzar les comparacions entre els diferents grups. CS: controls sans.



**Gràfica 1.** Valor de limfòcits en plasma ens els tres grups. La línia que es mostra en cadascun dels grups és el valor de la mitjana.



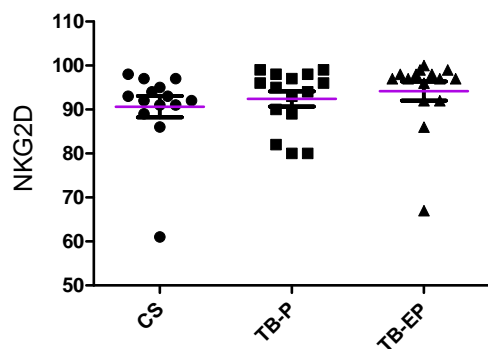
**Gràfica 2.** Valor en percentatge de les NK (CD3-CD56+) ens els tres grups. La línia que es mostra en cadascun dels grups és el valor de la mitjana.



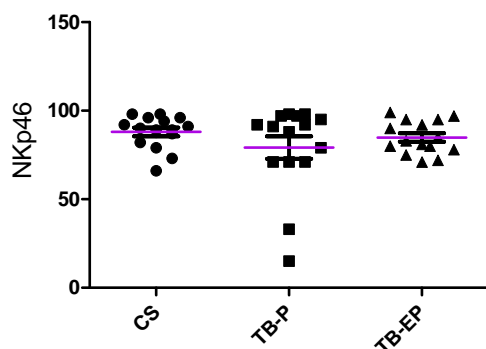
**Gràfica 3.** Valor en números absoluts de les NK (CD3-CD56+) en els tres grups. La línia que es mostra en cadascun dels grups és el valor de la mitjana.

	Controls sans n: 15	TB-P n: 15	TB-EP n: 15	p CS/TB-P n:15	p CS/TB-EP n:15	PTB-P/TB-EP n:15
<b>NKG2D</b>	90.6+/-9.13	92.4+/-6.76	94.2+/-8.34	0.83	0.472	0.817
<b>qnNKp46</b>	7825+/-1558	6845+/-3028	7282+/-1578	0.437	0.773	0.846

**Taula 4.** Percentatge d'expressió dels receptors d'activació de les NK. Per a l'NKG2D: mitjana i desviació estàndard. Per a l'NKp46: mitjana i desviació estàndard, un cop transformada en variable de distribució normal, mitjançant l'elevació al quadrat dels seus valors. CS: controls sans.



**Gràfica 4.** Distribució en l'expressió del receptor d'activació NKG2D en els tres grups. La línia que es mostra en cadascun dels grups és el valor de la mitjana.



**Gràfica 5.** Distribució en l'expressió del receptor d'activació NKp46 en els tres grups. Els valors donats són els reals, prèvia transformació.

El que presentem és el primer estudi en el que s'avalua una part del sistema immunitari innat, comparant controls sans, malalts amb TB-P i malalts amb TB-EP, per tal de poder detectar si el possible defecte immunitari que explicaria la malaltia extrapulmonar -en la qual la resposta immunitària de l'hoste es troba més ultrapassada per la infecció- rau, totalment o parcial, en les cèl·lules NK. Amb aquest estudi pretenem contribuir a aclarir algunes de les incògnites que envolten el fet que hi hagi persones que, infectades pel bacil de Koch, el destrueixen de bell antuvi, d'altres queden infectades pel micobacteri però el mantenen en estat de latència dins d'un granuloma, i, per contra, n'hi ha d'altres que desenvolupen una tuberculosi TB, sigui circumscrita al pulmó o disseminada en altres òrgans (TB-EP).

Tot i que les diferències detectades no han assolit nivell de significació estadística, hem trobat diferències numèriques en el percentatge de cèl·lules NK i en la expressió dels seus receptors que poden, a partir d'aquests resultats preliminars en una mostra molt reduïda, obrir la possibilitat d'aclarir una part de la resposta immune a les diferents formes de presentació de la malaltia tuberculosa.

De fet, hi ha un gran número d'estudis realitzats per conèixer i avaluar quins factors o elements clínics i/o epidemiològics predisposen una persona a la infecció tuberculosa, sobre quines són les funcions i reaccions del sistema immunitari innat i de l'adquirit, quan i per què es produeix el pas d'infecció a malaltia i, fins i tot, encara que molts menys, sobre quin podria ser el defecte en el sistema immune que permetria la disseminació del bacil fora del pulmó.

Quant a la participació, més o menys decisiva, de les cèl·lules NK en la lluita i control de la infecció tuberculosa, la seva funció exacta *in vivo* és un enigma i hi ha pocs estudis al respecte, tot i que està acceptada dita participació gràcies a alguns estudis fets, encara que la majoria girin entorn de la TB-P, constatant una gran carència sobre la TB-EP.

### **a) Observació clínica-epidemiològica**

Segons la literatura, els estudis epidemiològics fets en països industrialitzats mostren que la gent jove, les dones i els malalts originaris de l'Àsia i l'Àfrica tenen més risc de presentar TB-EP (30-32).

Quant als malalts inclosos en el nostre estudi, cal destacar-ne el gran predomini de procedència d'Àsia en el grup de TB-EP, fet que coincideix amb estudis previs realitzats; per exemple, en un estudi recent realitzat a Dinamarca i Groenlàndia -que incloïa 5.684 pacients recollits entre els anys 1992 i 2007 -es destaca que la proporció de malalts amb TB-EP procedents d'Àsia era del 58.5%, en contrast amb els procedents de Dinamarca, que era només d'un 21.4% (33). Probablement aquesta diferència ve donada-a part de per causa de factors immunològics del propi hoste- per factors del micobacteri que, segons l'origen de l'hoste, donarien lloc a soques més o menys virulentes.

## **b) Estudi immunològic**

Hi ha força estudis realitzats amb la finalitat d'avaluar les possibles alteracions immunològiques dels malalts amb TB a partir de la comparació dels diferents subtipus cel·lulars en sang perifèrica. La majoria d'ells, però, s'han focalitzat en estudiar els limfòcits T, sobretot els T CD4+ (34). Per contra, se n'han realitzat pocs respecte de les NK i, a més a més, els que s'han fet han estat sobre malalts amb TB-P.

Tenint en compte aquest buit respecte de la TB-EP, aquesta investigació s'ha centrat en la comparació de malalts de TB-P i TB-EP amb controls sans però, també, i d'aquí la rellevància de l'estudi, entre ells mateixos, sota la hipòtesi que un defecte o mancança en les NK del sistema immunològic innat podrien ser la causa d'una TB més disseminada.

Al respecte, en l'estudi s'han trobat algunes diferències numèriques interessants. Si bé no s'han trobat diferències en el percentatge d'NK entre els tres grups, sí que se n'han trobat en el valor absolut en el grup de malalts i, més considerable encara, en els malalts amb TB-EP, així com, també, en el valor de limfòcits en plasma.

Si revisem el que hi ha descrit a la literatura fins ara, hi trobarem tres estudis realitzats en malalts amb TB-P. En el primer d'ells es van comparar el percentatge i número absolut de diferents subtipus cel·lulars en sang perifèrica en malalts amb TB pulmonar, així com el número absolut de limfòcits en plasma, tant a l'inici de la malaltia com en finalitzar el tractament. Si bé es va trobar una disminució en el percentatge de limfòcits B a l'inici de la malaltia -els quals es recuperaven posteriorment- no es van trobar diferències ni en el percentatge d'NK ni de limfòcits T, limfòcits T CD4, T CD8, T gammadelta ni en la ratio CD4/CD8. Per contra, sí que es va observar una disminució de limfòcits en plasma -que tornaven a valors quasi normals

posteriorment- i una disminució d'NK en valors absoluts, tant a l'inici de la malaltia com al finalitzar el tractament (23).

Focalitzant-ho en les NK, aquests resultats coincideixen amb un estudi posterior on tampoc trobaven diferències en el percentatge d'NK; en aquest cas no es va realitzar el càlcul d'NK en valors absoluts (22). Un estudi posterior, però, mostrava resultats contraris, havent trobat una disminució en el percentatge i número absolut d'NK en sans PPD positius respecte malalts amb TB-P i sans PPD negatius (21).

La nostra investigació té coincidències importants amb el primer estudi citat, quant a valors a l'inici de la malaltia, però no podem establir comparacions en finalitzar el tractament (en l'estudi citat, el número absolut d'NK es mantenia baix, concloent que podria ser un factor predisponent a desenvolupar la malaltia), ja que nosaltres no disposem d'aquesta informació.

De totes maneres, aquells resultats sí que ens poden servir per fer una extrapolació, ja que el fet que en el nostre estudi els malalts extrapulmonars tinguin més baix el número d'NK que els malalts pulmonars i que els controls sans, ens fa albirar que aquesta diferència podria ser un factor predisponent a formes més disseminades de la malaltia, fet que aniria a favor de la nostra hipòtesi de treball i s'aproximaria a les troballes realitzades sobre el risc de desenvolupar més la forma extrapulmonar com més baix valor de limfòcits T CD4+ (7,28), tant en malalts VIH positius com VIH negatius. Tot i així, no podem ser taxatius amb aquesta afirmació que, per altra banda, obre una porta a hipòtesis per a futures investigacions al respecte.

Tanmateix, tot i que en un dels estudis comentats sobre els limfòcits T CD4+ en malalts amb TB-EP es podia observar una relació entre els valors més baixos de limfòcits T CD4+ i les formes més severes de TB (7), en els nostres malalts no hi hem observat aquesta relació.

Quant als receptors, no s'han trobat diferències estadísticament significatives en el percentatge d'expressió dels receptors NKG2D i NKp46, ni comparant malalts i sans ni al comparar els malalts amb TB-P i els malalts amb TB-EP.

Amb tot, s'aprecia una tendència a tenir valors més alts en el percentatge d'expressió del receptor NKG2D en el grup de malalts, sobretot en els que van desenvolupar la TB extrapulmonar, entrant en contradicció amb la hipòtesi de treball quant a que alteracions en l'expressió en alguns dels receptors de les NK predisposarien a presentar formes extrapulmonars de la malaltia. Tampoc coincidiria amb el resultat d'un estudi on no s'observen diferències en l'expressió d'aquest receptor en malalts amb TB-P (27). Podríem pensar que, tot i que com hem dit, la diferència és molt

petita, com més greu és la forma de presentació de la malaltia, més expressió del receptor d'activació per tal d'actuar enfront del micobacteri. De totes maneres, tant perquè només és una tendència, com perquè el tamany de la mostra és baix, no podem treure conclusions clares al respecte.

Quant al receptor NKp46, els nostres resultats no confirmen els obtinguts en el mateix estudi, ja citat prèviament, que mostrava una disminució en l'expressió d'aquest receptor en els malalts amb TB-P respecte els controls sans (27). Ara bé, quan ens fixem en el valor de la mitjana, sí que els malalts amb TB-P tenen un valor més baix, encara que creiem que aquest valor està influenciat per dos pacients amb un resultat obtingut molt baix, el qual, molt probablement, pot ser atribuït a un error de tècnica. En els malalts amb TB-EP no es veuen diferències respecte els sans ni respecte els malalts amb TB-P.

Davant aquestes troballes, pensem que, si bé hi ha estudis que demostren tant la participació de les cèl·lules NK com la dels seus receptors NKG2D i NKp46 en la resposta immunitària enfront la infecció per *Mt* la lisis de macròfags i monòcits infectats pel bacil (19,25,26), el fet de no trobar diferències estadísticament significatives -ni en avaluar la subpoblació cel·lular NK ni els receptors en cap dels dos tipus de malaltia tuberculosa respecte els controls sans, ni entre les dos formes clíniques- fa pensar que, probablement, hi ha molts altres factors, tant per part de l'hoste com del bacil, que determinen que el micobacteri es repliqui, surti del granuloma i provoqui el pas de l'estat de latència al de malaltia, ja sigui localitzada al pulmó o en qualsevol altra part de l'organisme.

Amb tot, la present anàlisi és un estudi preliminar i exploratori i, per tant, té algunes limitacions inherents a aquest fet. El nombre de malalts és molt limitat i, per tant, algunes de les diferències que hi poguessin existir es podrien no haver demostrat per manca de poder estadístic. A més a més, la variabilitat de les tècniques emprades en les anàlisis immunològiques contribueix de forma important a aquest factor, el qual ens podria haver limitat a detectar diferències. També l'heterogeneïtat ètnica i clínica dels nostres malalts podria haver dificultat la detecció d'alteracions, així com el fet que estem avaluant elements del sistema de defensa en sang perifèrica, no en el teixit on es localitza la infecció i la malaltia clínica.

Tanmateix, hi ha elements que, pensem, atribueixen valor al nostre estudi. En primer lloc, explora els mecanismes fisiopatològics d'una malaltia amb molt alt impacte. També es focalitza en aspectes de la resposta immune al micobacteri, fonamentals en l'inici i desenvolupament de la malaltia i en la gravetat de la forma clínica.

Finalment, pensem que serveix per a suggerir hipòtesis que poden ser desenvolupades i explorades amb més profunditat en treballs posteriors sobre aquest tema.

En el present estudi, exploratori i preliminar, hem observat diferències numèriques en les cèl·lules NK i l'expressió dels seus receptors que malgrat no han assolit significació estadística, són la base per a plantejar i desenvolupar hipòtesis sobre la resposta immune innata a la infecció tuberculosa. Fins a on sabem, aquest és el primer treball en analitzar aquestes relacions en malalts amb tuberculosi, tant pulmonar com, específicament, la seva forma més greu, l' extrapulmonar. Això permetria desenvolupar noves estratègies preventives i terapèutiques per frenar la infecció tuberculosa, la reactivació des de l'estat de latència, així com identificar les persones amb risc de presentar formes més severes de Tuberculosi.



A la Dra. Francesca Sánchez per la seva impagable ajuda i consell, així com per facilitar-me l'accés als pacients amb tuberculosi.

A la Sra. Neus Jové, infermera del Programa d'infeccions de l'Hospital del Mar, per la seva extraordinària col·laboració.

Al Dr López Colomé, que amb la combinació dels seus grans coneixements i el seu entusiasme em va despertar l'interès per voler conèixer millor aquesta malaltia.

Al Dr. Miguel López-Botet, pel seu constant i imprescindible consell i guia en la realització dels estudis immunològics, així com en la comprensió dels resultats.

A la Dra. Aura Muntasell per la seva constant i pacient ajuda en la costosa i laboriosa realització dels estudis de laboratori i en l'anàlisi dels resultats, fent extensiu l'agraïment a tot l'equip del laboratori d'Immunologia de l'IMIM.

Al Dr. Joan Vila i a la Judith Penafiel per la realització de l'anàlisi estadística.

A tots els companys que han col·laborat com a controls de l'estudi, i a tots els companys del Servei de Medicina Interna/Malalties Infeccioses, per la seva cooperació, cobrint les meves tasques quan la realització d'aquest treball ho ha requerit, especialment al Dr Xavier Nogués que, des del primer moment, va ajudar-me a encaminar el meu interès per la investigació.

A tots els malalts per la seva fonamental contribució.

Al Parc de Salut Mar per facilitar-me la Beca d'Investigació Joan Vivancos que m'ha permès dedicar temps i esforç al projecte.

Al Dr Hernando Knobel, Cap de la Secció de Malalties Infeccioses, tant per la direcció del treball en si, com per tots els valuosos coneixements sobre les malalties infeccioses que he anat adquirint en el dia a dia treballant al seu costat.

I, molt especialment, al Dr Adolf Díez, Cap del Servei de Medicina Interna-Malalties Infeccioses de l'Hospital del Mar, que m'ha fet de mentor i *mestre*, enriquint de forma determinant aquest estudi cobrint les meves mancances, i que m'ha encoratjat i donat suport en tot moment, demostrant la seva qualitat humana i la seva estima a la investigació científica com a vehicle d'avenç per prevenir les malalties i millorar la vida dels malalts, el nostre objectiu principal, en definitiva.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. WHO, Report- Global Tuberculosis Control, World Health Organization, Geneva, 2008.
2. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Dev Immunol. 2011;2011:405310.
3. Guia i proposta d'organització per a la prevenció i control de la tuberculosi a la Regió Sanitària Barcelona. Versió revisada 1-gener 2008. CatSalut. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut.
4. García JF. Extrapulmonary tuberculosis: situation in the new century. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008 Nov;26(9):537-9.
5. Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review. Invest Clín. 2005 Dec;46(4):391-412.
6. Fanlo P, Tiberio G. Extrapulmonary tuberculosis. An Sist Sanit Navar. 2007;30 Suppl 2:143-62.
7. Davoudi S, Rasoolinegad M, Younesian M, Hajiabdolbaghi M, Soundbakhsh A, Jafari S, et al. CD4+ cells counts in patients with different clinical manifestations of tuberculosis. Braz J Infect Dis. 2008 Dec;12(6):483-6.
8. Roca C, Balanzó X, Fernández-Roure JL, Sauca G, Savall R, Gascon J, Corachán M. Imported diseases in African immigrants in Spain: study of 1.321 patients. Med Clin (Barc). 2002 Nov 9;119(16):616-9.
9. Korbelt DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. Microbes Infect. 2008 Jul;10(9):995-1004.
10. Rausch A, Hessmann M, Hölscher A, Schreiber T, Bulfone-Paus S, Ehlers S, Hölscher C. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8+ T cells. Eur J Immunol. 2006 May;36(5):1156-67.
11. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2009;27:393-422.
12. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. Mol Immunol. 2005 Feb;42(4):501-10.
13. Navarro F, López-Botet M. Receptores de células NK específicos para moléculas HLA de clase I. Revisión. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid, Universidad Pompeu Fabra. Cexs (Barcelona) Vol. 20 / Núm. 1 / Enero-Marzo 2001).
14. Biassoni R. Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. Curr Protoc Immunol. 2009 Feb;Chapter 14:Unit 14.10.
15. De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, Moretta A, Moretta L. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). Eur J Immunol. 2003 Sep;33(9):2410-8.

16. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3661-7.
17. Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, López-Botet M. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3624-31.
18. De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P, Congia S, Mingari MC, Moretta L. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol*. 2007 Feb;37(2):445-55.
19. Denis M. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes. *Cell Immunol*. 1994 Jul;156(2):529-36.
20. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*. 2008 Feb;15(2):226-33.
21. Barcelos W, Sathler-Avelar R, Martins-Filho OA, Carvalho BN, Guimaraes TM, Miranda SS, et al. Natural Killer cell subpopulations in putative resistant individuals and patients with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol*. 2008 Jul;68(1):92-102.
22. Wu YE, Zhang SW, Peng WG, Li KS, LI K, Jiang JK, Lin JH, Cai YM. Changes in lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. *J Int Med Res*. 2009 Nov-Dec;37(6):1742-9.
23. Veenstra H, Baumann R, Carroll NM, Lukey PT, Kidd M, Beyers N, et al. Changes in leucocyte and lymphocyte subsets during tuberculosis treatment; prominence of CD3dimCD56+ natural Killer T cells in fast treatment responders. *Clin Exp Immunol*. 2006 Aug;145(2):252-60.
24. Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach, Raulet DH, A et al. NK Cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6039-45.
25. Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Safi H, Lakey DL, Mandelboim O, et al. The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3451-7.
26. Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, Griffith DE, Klucar P, Safi H, et al. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with and intracellular bacterium. *J Immunol*. 2005 Oct 1;175(7):4611-7.
27. Bozzano F, Costa P, Passalacqua G, Dodi F, Ravera S, Pagano G, et al. Functionally relevant decreases in activatory receptor expression on NK cells are associated with pulmonary tuberculosis *in vivo* and persist after successful treatment. *Int Immunol*. 2009 Jul;21(7):779-91.
28. Antas PR, Ding L, Hackman J, Reeves-Hammock L, Shintani AK, Schiffer J, et al. Decreased CD4+ lymphocytes and innate immune responses in adults with previous extrapulmonary tuberculosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;117(4):916-23.

29. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, et al. Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in Tuberculosis pleurisy. *J Immunol* 2005 Nov 15;175(10):6852-60.
30. Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clin Infect Dis*. 2009 Nov 1;49(9):1350-7.
31. Rock RB, Sutherland WM, Baker C, Williams DN. Extrapulmonary Tuberculosis among Somalis in Minnesota. *Emerg Infect Dis*. 2006 Sep;12(9):1434-6.
32. Yang Z, Kong Y, Wilson F, Foxman B, Fowler AH, Marrs CF, Cave MD, Bates JH. Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2004 Jan 15;38(2):199-205.
33. Zhang X, Andersen AB, Lillebaek T, Kamper-Jorgensen Z, Thomsen VO, Ladefoged K, et al. Effect of sex, age, and race on the clinical presentation of tuberculosis: A 15-year population-based study. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Aug;85(2):285-90.
34. Rodrigues DS, Medeiros EA, Weckx LY, Bonnez W, Salomao R, Kallas EG. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Clin Exp Immunol*. 2002 Apr;128(1):149-54.

**PROTOCOL DE PROCESSAMENT DE LA MOSTRA**

1. Obtenir 20cc de sang total conservada en tub d'EDTA.
2. Separar les PBMC (cèl.lules mononucleades de sang perifèrica) per densitat amb Ficoll (Lymphoprep).
3. Incubar sis milions de PBMC amb 2ml de la solució del bloqueig d'Ig agregada.
4. Afegir els sobrenedants que contenen els diferents anticossos dels receptors a analitzar.
5. Incubar 20 minuts a 4°.
6. Fer dos rentats amb PBS i descartar el sobrenedant. Entre cada rentat, centrifugar a 1800rpm a 4° durant 3 minuts.
7. Incubar amb l'anticòs secundari anti mouse IgG-PE a una dilució 1/50.
8. Incubar 20 minuts a 4°.
9. Fer tres rentats amb PBS i descartar el sobrenedant. Entre cada rentat, centrifugar a 1800rpm a 4° durant 3 minuts.
10. Afegir la resta dels anticossos (CD3-PerCP i CD56-APC).
11. Incubar 20 minuts a 4°.
12. Fer dos rentats amb PBS i descartar el sobrenedant. Entre cada rentat, centrifugar a 1800rpm a 4° durant 3 minuts.
13. Afegir 200 microlitres de PBS i passar la mostra a tubs petits per tal de realitzar l'anàlisi en el citòmetre.

**ANTICOSSOS**

- anti mouse IgG-PE
- anti human CD3-PerCP
- anti human CD56-APC
- anti human NKG2D, Bat221
- anti human NKp46, Bab281