

CITOTOXICIDAD NK.

1.- ANTECEDENTES

La citotoxicidad constituye uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario, consistente en la capacidad para interactuar con otras células y destruirlas. Diferentes tipos de leucocitos pueden presentar cierto grado de actividad citotóxica en ensayos *in vitro*, pero se consideran como prototipos de las células especializadas en dicha función a una subpoblación de *linfocitos T* (Tc, CTL) y a las células *Natural Killer* (NK).

La función citotóxica exige el metabolismo activo de la célula a temperatura fisiológica, no implica la síntesis de proteínas y requiere tanto la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) como la integridad del citoesqueleto, inhibiéndose en presencia de agentes farmacológicos como la citocalasina.

Las etapas en las que se desarrolla el proceso son las siguientes:

1. *Adhesión intercelular*. Las células efectoras interactúan a través de diferentes receptoras de superficie con estructuras en la membrana de la diana, denominándose a estos complejos celulares "conjugados". Esta fase es dependiente de Mg^{2+} , no requiere Ca^{2+} en el medio y puede producirse por debajo de la temperatura fisiológica.

2. *Activación de la célula efectora*. La interacción de los receptores de superficie con sus ligandos determina la transducción de señales a la célula que conllevan la generación de segundos mensajeros, la aparición de cambios estructurales y la excitación del contenido de los gránulos de secreción al espacio intercelular, tras la fusión de los mismos con la membrana plasmática. Por otra parte, las mismas señales pueden activar la biosíntesis y secreción de citocinas, particularmente $\text{IFN}\alpha$ y $\text{TNF}\alpha$.

3. *Fase de impacto lítico (lethal hit)*. Viene determinada por la acción de ciertos componentes de la célula efectora sobre la diana, la cual experimenta una serie de complejas interacciones que inician su desestructuración. Tanto esta etapa como la anterior son dependientes de Ca^{2+} y temperatura fisiológica.

4. *Disociación del contacto intercelular*. Permite que la célula efectora inicie potencialmente un nuevo ciclo lítico a la par que prosigue la destrucción de la célula diana.

2.- PROTOCOLO

2.1.- MATERIALES

- Línea celular diana (K562)
- Línea celular efectora
 - Medio RPMI 1640 suplementado al 1 % con antibiótico y glutamina
 - SDS al 2 %
 - PBS
 - Cromo (^{51}Cr)
 - Tubo de citómetro
 - Pipetas Pasteur
 - Micropipetas de diferentes volúmenes
 - Placa de 96 pocillos con fondo en "U"
 - Steeper, agujas y jeringas
 - Aparatos utilizados:
 - Centrífuga
 - Campana de flujo laminar
 - Cámara de Neubauer
 - Estufa de CO_2
 - Contador \square

2.2.- MÉTODO

Hacer paralelamente los tiempos de centrifugación e incubación de las células diana y las efectoras.

Células diana

- Dejar las células *en resting* O/N (2% FCS, sin IL2).
- Ajustar las células a $2 \cdot 10^6$ células/ml.
- Hacer un lavado a 1200 rpm durante 10 minutos RT (24 °C).
- Hacer un segundo lavado en PBS y decantar lo mejor posible el volumen residual (escurrir sobre papel de filtro si es necesario).
- Resuspender en 50 μ l de ^{51}Cr 2 mCr/ml (HBSS) cada 10^6 células.
- Homogeneizar resuspendiendo suavemente y sellar con parafilm.
- Incubar a 37 °C en agitación (baño) durante 80 minutos.
- Añadir 5 ml de medio RPMI (20 % FCS, sin IL2), y centrifugar 5 minutos a 1200 rpm. Hacer este paso 2 veces.
- Añadir 5 ml de medio RPMI (20 % FCS, sin IL2) sellar con parafilm.
- Incubar a 37 °C en agitación (baño) durante 60 minutos.
- Añadir medio RPMI (20 % FCS, sin IL2) hasta 10 ml, y centrifugar 5 minutos a 1200 rpm.
- Resuspender en 2 ml por cada $2 \cdot 10^6$ células.

Células efectoras

- Dejar las células *en resting* O/N.
- Ajustar las células a $5 \cdot 10^6$ células/ml.
- Hacer un lavado a 1200 rpm durante 10 minutos RT (24 °C).
- Resuspender en su medio (20 % FCS, sin IL2) ajustando a $2,5 \cdot 10^6$ céls/ml.

Determinación de la citotoxicidad

- Preparar el diseño de placa. Conviene hacerlo por triplicado.
- Dispensar 5000 células diana/pocillo.
- Poner control positivo y negativo.
- Centrifugar 5 minutos a 700 rpm RT.
- Incubar a 37 °C en estufa al 5 % CO_2 durante 4 horas.
- Centrifugar 5 minutos a 700 rpm RT.
- Recuperar en tubos de contaje 150 μ l/pocillo por sobrenadante.
- Contar en contador \square .
- Calcular el **índice de respuesta relativa**:

$$\text{IRR} = \frac{(\text{X-cpm basal} / \text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{basal}}) \cdot 100}{}$$

2.4.- CONDICIONES DE TRABAJO.

Disponer de dos duquesas para líquido y sólido radiactivo, además de otra para residuo general. Para evitar pérdidas de material radiactivo en el desplazamiento, tapar los tubos con papel de aluminio.

3.- BIBLIOGRAFÍA

- **Inmunología. Bases moleculares y celulares.** José Peña Martínez. Pirámide. 1.994.

4.- PROVEEDORES.

- ^{51}Cr 2 mCr/ml (HBSS)

- **RPMI 1640** , with 25 mM HEPES, without L-glutamine.
Cat nº : 42401-042
Volume : 500 ML
Fabricante: Life Technologies
Distribuidor: Gibco BRL
Delegado de ventas: Javier Martin

Fax (Madrid): 91 710 60 82
Teléfono (Barcelona): 93 478 23 16
Fax (Barcelona): 93 478 26 32

- Foetal calf serum (FCS).

Volume: 500 ml
Code: S-0001a
P.V.P: 12000 + 7% IVA
Fabricante: Harlan. Sera-lab.
Distribuidora: LAB-CLINICS
Delegado de ventas: Paloma Elizaga Guitart
Teléfono: 91 562 42 00
Fax: 91 411 30 30

- L-Glutamina 200 MM 100 ML

Referencia: 17-605 A
P.V.P: 970 + 7% IVA
Fabricante: Boehringer Ingelheim
Distribuidor: Comercial Anger S.L.
Delegado de ventas: Monserrat Aparicio
Teléfono: 91 555 77 00
Fax: 91 556 59 23

- PBS Tablets

Lot. No: 4314 B
Cat. No: 2810305
Presentación: 100 pastillas
Fabricante: INC BIOMedicals Inc.

- Pipetas pasteur de plástico, estériles:

Con volumen de 3 ml: referencia 660292. P.V.P: 5.200 + 7% IVA
Con volumen de 1 ml: referencia 200004. P.V.P: 5.200 + 7% IVA
Fabricante: LC – Labcenter, S.L. (DASLAB)
Distribuidor: Nirco
Delegado de ventas: Antonio Alvarez Hernando
Teléfono: 91 616 42 68
Fax: 91 479 94 50

- Placa de 96 pocillos con fondo en U, estéril con tapa para cultivo, evaporación normal.

Fabricante: COSTAR
Distribuidor: CULTEK, S.L.
Delegado de ventas: Guillermo Martín
Teléfono: 91 729 03 33
Fax: 91 358 17 61

- Duquesas

Referencia: 186636
Presentación: 40 duquesas de 2000 cc tapadas
Fabricante: LC.Labcenter, S.L. (DASLAB)
Distribuidor: NIRCO
Delegado de ventas: antonio Álvarez Hernando
Teléfono: 91616 42 68
Fax: 91 479 94 50