

Implementación de un sistema *in vitro* para la evaluación fenotípica y funcional de la interacción de Células Dendríticas con Células NK¹

Parra-González Adriana Carolina, Fiorentino-Gómez Susana, Parra-López Carlos Alberto

1. Estudiante de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia. e-mail a_parra@javeriana.edu.co
2. Profesor titular II, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia. Grupo de Inmunobiología. Unidad de Investigación en Ciencias Biomédicas.
3. Profesor titular, Facultad de Medicina, Departamento de microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. Grupo de investigación: Inmunología y medicina Traslacional.

Resumen

La interacción entre Células Dendríticas (DCs) y NKs juega un papel importante en la inducción de inmunidad. El diseño de un sistema *in vitro* que permita analizar factores que influyen la calidad de la interacción cooperativa entre estas dos células lo consideramos importante. En este trabajo utilizando muestras de sangre se comparó *ex vivo* el porcentaje e inmunofenotipo de monocitos, NKs totales y de diferentes subpoblaciones de NKs definidas de acuerdo con la expresión diferencial de los marcadores CD56 y CD16, tanto en Sangre Total como en PBMCs entre individuos Jóvenes y Adultos Mayores de 60 años. Los análisis *ex vivo* evidenciaron alteraciones en la representatividad de subpoblaciones de NKs evidenciada en Sangre Total que no fueron claramente detectadas cuando se utilizaron PBMCs. De otra parte, un sistema de cultivo *in vitro* de DCs cocultivadas con NKs fue implementado con el fin de evaluar la influencia de la edad y la interacción célula-célula en la mutua activación de estas dos células. Estos cocultivos permitieron evidenciar una capacidad de DCs maduras e inmaduras de inducir la activación de células NKs autólogas y la capacidad de NKs activadas por agonistas de TLRs de potenciar tanto la maduración de DCs maduras como la maduración de DCs inmaduras autólogas. De manera interesante los resultados de los cocultivos de NKs con DCs mostraron (i) que las funciones anotadas son dependientes de la interacción célula-célula; (ii) una capacidad disminuida de las NKs de Adultos Mayores activadas, con respecto a las de individuos Jóvenes, para inducir la maduración de DCs inmaduras autólogas y (iii) una deficiencia de DC maduras de Adultos Mayores para inducir la activación de NKs autólogas. En conjunto los resultados sugieren la validez del sistema de cocultivos implementados para analizar factores asociados al envejecimiento y a la interacción célula-célula que modulan la interacción de NKs y DCs.

Palabras clave:

NK, DCs, Envejecimiento, Contacto célula-célula, inmunosenescencia.

Abreviaturas:

DC: Células dendríticas.

NK: Células asesinas naturales.

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.

TLRs: Receptores tipo Toll.

APC: Célula profesionales presentadoras de antígenos.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

pDC: Células dendríticas plasmacitoides.

DCm: Células dendríticas mieloides.

mDC: Células dendríticas maduras.

iDC: Células dendríticas inmaduras.

Ag: Antígeno.

ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

CTL: Linfocitos T citotóxicos.

iNK: NKs inactivas (estimuladas solo con IL2).

aNK: NKs activadas (estimuladas con IL2 + agonistas de TLR).

CC: Contacto célula – célula.

TW: Transwell.

MFI: Intensidad media de fluorescencia.

HLA-E: Molécula de histocompatibilidad del antígeno leucocitario E.

Introducción

El sistema inmune se compone de un conjunto de células y moléculas que cumplen la importante función de reconocer y destruir cualquier forma de agente dañino (químico o infeccioso) y así proteger al hospedero de la infección por patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos (Chaplin, 2010). Las respuestas inmunitarias se dividen en respuestas innatas y adaptativas; el sistema inmunológico innato es el primero en responder a infecciones y enfermedades, constituyendo la primera línea de defensa al proporcionar una protección rápida pero inespecífica (Ventura, Casciaro, Gangemi, & Buquicchio, 2017). Al interior de los componentes celulares del sistema inmunológico innato se encuentran los neutrófilos, granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC) y de Langerhans y células asesinas naturales (NK). Las respuestas inmunes adaptativas complementan la respuesta innata ya que son altamente específicas y duraderas mediadas por Linfocitos B y T (Degli-Esposti & Smyth, 2005).

Hace algunos años, se creía que la eficacia del brazo innato era independiente del brazo adaptativo, sin embargo, existe cada vez más evidencia que soporta la idea de que estos dos sistemas trabajan en estrecha colaboración y las interacciones múltiples entre las células inmunes son cruciales para el inicio y amplificación de respuestas inmunes protectoras a los agentes infecciosos y el cáncer (Degli-Esposti & Smyth, 2005). Desde 1990 el sistema inmune innato ha sido reconocido cada vez más por su importante papel en la inmunidad, no solo en la inmunidad innata sino por su importante rol en la modulación de la inmunidad adaptativa (Nikolich-Zugich, 2018), es por ello, que este trabajo se enfocó en el estudio de dos células: DCs y NKs, representativas de la inmunidad innata. Las DCs se consideran centinelas del sistema inmune, ya que al ser reconocidas como célula profesionales presentadoras de antígenos (APC) son importantes para la inducción de respuestas inmunes primarias y sus funciones permiten enlazar la inmunidad innata y la adaptativa, ya que al expresar altos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y moléculas coestimuladoras tienen la capacidad de reconocer patógenos, procesarlos y migrar a órganos linfoides secundarios donde pueden estimular células T vírgenes mediante la presentación de antígenos (Hespele & Moser, 2012). Según su linaje, las DCs se pueden clasificar en diferentes tipos, incluidas las plasmacitoides (pDC) y mieloides (DCm) (Romagnani et al., 2005). Las pDC son importantes en la primera línea de defensa del huésped contra patógenos invasores, principalmente los virus, ya que tienen la cualidad de producir interferón tipo I y III (IFN-I / III) (Solana et al., 2012b). El segundo tipo de DC, DCm, se caracterizan por ser las células presentadoras de antígeno más importantes para los linfocitos T y también tienen la capacidad de producir IL-12, IL-15 e IL-18 para inducir respuestas de células Th1. Además de inducir estas respuestas, las DC son cruciales para los procesos de tolerancia central y periférica, controlando así la autorreactividad y la autoinmunidad (Solana et al., 2012b).

Por su parte, las células asesinas naturales (NK) son componentes clave de la inmunidad innata no solo por su capacidad de lisar una gran variedad de células infectadas por virus, bacterias y otros patógenos, así como células tumorales, de manera espontánea en ausencia de reconocimiento específico de Ag, sino también en la regulación

de la respuesta inmune al producir citocinas y quimiocinas que pueden activar otros componentes celulares de inmunidad innata y adaptativa (Camous, Pera, Solana, & Larbi, 2012). Las NKs comprenden varias subpoblaciones con diferente fenotipo y función, clasificadas según la expresión de marcadores de superficie CD56 y CD16. La mayoría de las NK de sangre periférica tienen un fenotipo CD56 *dim* y CD16 *bright* (subconjunto maduro y citotóxico con una menor capacidad de secreción de citoquinas). También existe el subconjunto inmaduro (CD56 *bright* CD16 *dim*) que expresa un mayor número de receptores de citocinas y quimiocinas (capacidad citotóxica más débil) (Morice, 2007). De igual manera, las NK CD57 + (altamente maduras) muestran una mayor capacidad de respuesta a las células blanco pero una menor respuesta a citocinas (Lopez-Vergès et al., 2010). La citotoxicidad mediada por estas células puede darse de diferentes formas, una de ellas es la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), este mecanismo depende del receptor Fc de baja afinidad de inmunoglobulinas de tipo G (RFcγ o CD16), el cual reconoce la fracción Fc de los anticuerpos que se encuentran unidos a la célula blanco lo que les permite activarse e inducir su lisis. También, luego del contacto con la célula blanco, las NK tienen la capacidad de secretar componentes citotóxicos (perforina o granzimas), o pueden inducir apoptosis gracias a la interacción de la proteína FasL (CD95L) y Fas (CD95) expresada en la célula blanco (Chester, Fritsch, & Kohrt, 2015). Asimismo, el reconocimiento de las células diana puede darse por el equilibrio entre las vías de señalización inhibidora y activadora. Los receptores inhibidores más importantes (KIR, CD94 / NKG2) interactúan con las principales moléculas de MHC que se expresan en casi todas las células nucleadas, lo cual evita la lisis mediada por células NK de células sanas (MHC-clase I +) (Moretta et al., 2006). Se han identificado varios receptores de activación que reconocen diferentes ligandos sobreexpresados en células tumorales o células infectadas por virus, algunos de estos son los receptores de citotoxicidad natural (NCR: NKp46, NKp30, NKp44) y otros son el NK2G2D y el DNAM-1 (Solana et al., 2012b).

Estudios han demostrado que la interacción cooperativa entre las DC y las NK desempeña un papel clave en la activación de la respuesta inmune contra patógenos (Moretta et al., 2006), ya que esta relación puede regular tanto la calidad como la intensidad de la respuesta inmune adaptativa posterior, contribuyendo por ejemplo al desarrollo de células Th1 y linfocitos T citotóxicos (CTL), ambos esenciales para una respuesta inmune antitumoral y antiviral efectiva (Ferlazzo & Morandi, 2014).

En este contexto, para entender más sobre el sistema inmune, es clave estudiar la interacción que existe entre las células NK y las DC. Por ejemplo, sería interesante evaluar si las células NK también juegan un papel directo en favorecer la presentación cruzada de antígenos por parte de las células dendríticas, por lo que, gracias a la capacidad de las NK para lisar células infectadas por virus o células tumorales, esto podría contribuir a la absorción y presentación cruzada de estos antígenos (Mahmood et al., 2015). Dada la importancia de la interacción de estas dos células, es necesario evaluar que sucede con estas células durante el envejecimiento fisiológico que se acompaña de notorias alteraciones en la función inmunológica tanto en el brazo innato como en el adaptativo, fenómeno denominado inmunosenescencia (Le Garff-Tavernier et al., 2010). Por lo que ya existen reportes sobre las alteraciones del envejecimiento en el fenotipo y función de varias células del sistema inmune que contribuyen

en parte al aumento de la incidencia de las infecciones en los adultos mayores (Le Garff-Tavernier et al., 2010), los efectos negativos sobre la activación recíproca de DC - NK resulta ser un tema valioso por explorar (Grolleau-Julius, Abernathy, Harning, & Yung, 2009).

Por lo anterior, en este estudio se propuso implementar un sistema *in vitro* para llevar a cabo un análisis fenotípico y funcional de células NK y DC de donantes jóvenes y adultos mayores, por medio de la caracterización de los receptores de superficie celular de ambas células, lo cual sería un indicador útil de su capacidad funcional y así poder examinar cómo las diferencias en el fenotipo de estas células en la población de edad avanzada pueden llegar a incidir en el envejecimiento saludable. Asimismo, poder comparar células de donantes de diferentes edades permitió tener una visión más profunda de estos cambios con la edad y este tipo de estudios pueden proporcionar nuevas modalidades terapéuticas para las disfunciones inmunes asociadas a la edad (Agrawal, Agrawal, Tay, & Gupta, 2008). Adicionalmente, otro de los aspectos que se tuvieron en cuenta en este estudio fue el efecto del contacto célula – célula, lo cual podría llegar a influenciar la cooperatividad de estas dos células (Gayoso et al., 2011). Finalmente, indagar más sobre la respuesta inmune de estas dos células, permitirá entender con mucho más detalle cómo la inmunidad antitumoral se puede ver afectada con el envejecimiento, provocando que la incidencia de cáncer aumente con la edad y este tipo de investigaciones también ayudarían a explorar nuevas posibilidades para el tratamiento de individuos adultos mayores con cáncer (Tarazona et al., 2017).

Materiales y métodos

Sujetos de estudio y muestras

Los estudios se realizaron en dos poblaciones de sujetos, Jóvenes y Adultos Mayores. Se obtuvieron unidades de sangre total de seis jóvenes (de 21 a 36 años) y seis adultos mayores (de más de 60 años) que fueron donadas para el estudio por el banco de sangre del Instituto de Ciencias del Distrito, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS).

Individuo	Genero	Edad (años)
JOVEN 1	Masculino	29
JOVEN 2	Masculino	27
JOVEN 3	Masculino	36
JOVEN 4	Masculino	21
JOVEN 5	Masculino	33
JOVEN 6	Masculino	30
A_MAYOR 1	Masculino	60
A_MAYOR 2	Femenino	64
A_MAYOR 3	Femenino	60
A_MAYOR 4	Femenino	61
A_MAYOR 5	Masculino	60
A_MAYOR 6	Femenino	63

Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo fueron: anti-CD56-FITC, -CD16-PerCP-Cy5.5, -CD3-Pacific Blue, -NKp30- PE-Cy7, -CD57-APC, -NKG2D-PE, -DNAM-1-BV786, -CD69-APC-Cy7, -TIM3-PE, -CTLA4-BV786, -LAG3-BV605, -CD80-PE, -CD80-APC, -CD14-APC, CD11c-PE, CD11c-APC, -CD83-PE Cy5, -CD209-FITC, Aqua-BV510 (BioLegend). Las células NK fueron purificadas con el estuche comercial *EasySep™ Human CD56 Positive Selection Kit II* (STEMCELL) y para los monocitos se utilizó el coctel de enriquecimiento *RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail* (STEMCELL). Para la lisis de glóbulos rojos para el *ex vivo* de Sangre total se utilizó la solución de lisis BD FACS™. Las muestras fueron leídas utilizando un equipo FACS Aria III de la Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Medicina, para la compensación se utilizaron BD™ CompBeads. Los datos de citometría de flujo se exportaron en formato FCS v3 y se analizaron utilizando el software FlowJo (TreeStar Inc.). Para el análisis estadístico y la construcción de los gráficos se utilizó el software Prism v6 (Graph Pad).

Aislamiento y enriquecimiento celular

Las unidades de sangre que se encontraban en las bolsas cuádruples se depositaron en diferentes tubos Falcon de 50mL, se tomaron 500uL de sangre de cada individuo y se repartieron en tubos de citometría para la evaluación *ex vivo* a partir de Sangre total de NKs y monocitos; se tiñeron las células con los tres paneles de anticuerpos (2 de NKs y 1 de monocitos), luego del tiempo de incubación, se lisaron los glóbulos rojos utilizando y siguiendo el protocolo de la solución de lisis BD FACS™. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (STEMCELL), se realizó el conteo y se repartieron células en tubos de citometría para el *ex vivo* a partir de PBMCs de NKs y monocitos. Los monocitos se enriquecieron utilizando el coctel de enriquecimiento *RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail* (STEMCELL). Las células NK se purificaron de muestras de PBMCs mediante selección positiva utilizando el estuche comercial *EasySep™ Human CD56 Positive Selection Kit II* (STEMCELL) y se crio-conservaron en RPMI-1640 + 40% de suero de ternero fetal (FCS) + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Análisis fenotípico (*ex vivo* NKs y monocitos)

El inmunofenotipo de las NK se llevó a cabo mediante inmunotinción y citometría de flujo multicolor mediante el Sistema FACS Aria III. Para la tinción de Sangre total, los 100uL de sangre destinados para cada panel de anticuerpos se tiñeron de la siguiente forma: para **NKs**, **panel 1** – CD56-FITC, CD16-PerCP-Cy5.5, CD3-Pacific Blue, NKp30-PE-Cy7, CD57-APC, CD69-APC-Cy7, TIM3-PE, CTLA4-BV786, LAG3-BV605, Aqua-BV510 (BioLegend); **panel 2** –CD56-FITC, CD16-PerCP-Cy5.5, CD3-Pacific Blue, NKp30-PE-Cy7, CD57-APC, CD69-APC-Cy7, NKG2D-PE, DNAM-1-BV786, Aqua-BV510 (BioLegend); para **monocitos**, -CD14-APC, CD16-PerCP-Cy5.5, CD80-PE, Aqua-BV510 (BioLegend). Luego del tiempo de incubación se agregó la solución de lisis de glóbulos rojos utilizando la solución de lisis BD FACS™ y se continuo con la lectura. Para la tinción de PBMCs se tiñeron las células con los mismos paneles de NKs y monocitos. Para cada panel y célula se incluyeron células sin teñir (Blanco).

Generación de células dendríticas

Las células dendríticas derivadas de monocitos maduros (moDC) se generaron a partir de monocitos enriquecidos, como se describió anteriormente. Los monocitos se cultivaron en placas de 24 (3 pozos) y 48 pocillos (5 pozos) (Costar, Cambridge, MA) a 8×10^5 células / pocillo en medio AIM-V con Antibiótico-Antimicótico (1x) y se les añadió dos dosis de IL-4 (1000 U / mL) y GM-CSF (800 U / mL) al primer y al tercer día de cultivo. Al quinto día las iDCs se maduraron utilizando un coctel de maduración que contenía LPS (1000ng/mL) (Piccioli, Sbrana, Melandri, & Valiante, 2002) + IFN γ (100 U / mL, R&D Systems) durante 48h. El fenotipo maduro se evaluó mediante citometría de flujo cuantificando los niveles de expresión de CD80.

Cultivo de células NK y estimulación mediada por TLRs

Al tercer y al quinto día del protocolo, se descongelaron las células NK purificadas y se resuspendieron a 2×10^5 células / pocillo en medio AIM-V con Antibiótico-Antimicótico (1x) y se sembraron en ocho pozos (3° día) y dos pozos (5° día) de placas de 96 pocillos fondo plano suplementado con 500 U/ml de IL-2 humano recombinante (rh) (Tarazona, Campos, Pera, Sanchez-Correa, & Solana, 2015). Según la condición de cultivo algunas NKs además de ser cultivadas en presencia de IL2, se estimularon con tres combinaciones de estímulos diferentes: (i) IL2 + Poly IC (50ug/mL) (Sivori et al., 2004); (ii) IL2 + CpG (5ug/mL) (Sivori et al., 2004); (iii) IL2 + Poly IC (50ug/mL) + CpG (5ug/mL). Todos los estímulos fueron por 48h. Luego de 48 horas, solo las NKs de las condiciones para evaluar la activación mediante la medición de la expresión de CD69 inducido solo por IL2 y agonistas de TLR se recolectaron y se tiñeron con los dos paneles de NKs mencionados anteriormente para análisis por citometría de flujo; antes de recolectar las células se colectaron 150uL del sobrenadante y se congelaron para la cuantificación futura de citoquinas por CBA y/o ELISA. Las otras NKs se recolectaron y se utilizaron para los cocultivos con DCs.

Cocultivos NKs – DCs

Los detalles específicos de los diferentes experimentos se describen en las leyendas de las figuras al transcurso del artículo. En general, al quinto día del protocolo, antes de colectar las NKs que habían sido estimuladas por 48h con IL2 y agonistas de TLR, se eliminó el medio en el que estaban y se les agregó 200uL de nuevo medio; a las iDCs también se les eliminó el medio que contenía GM-CSF e IL4 mediante lavado con medio RPMI 1640. Luego, las NKs y las DCs se cocultivaron en una proporción 1: 5 (1.6×10^5 NKs : 8×10^5 DCs). Las NKs que fueron cultivadas solo con IL2 se señalan en el documento como NKs inactivas (**iNK**), y a las que se estimularon con Poly IC y CpG como NKs activadas (**aNK**). En el plato de 48 pozos se llevaron a cabo los cocultivos de contacto célula – célula (CC) y en los de 24 los cultivos del sistema Transwell (TW). Los cocultivos del protocolo que se llevaron a cabo al quinto día fueron los siguientes: (i) iDC – iNK (CC); (ii) iDC – aNK (CC) (iii) iDC – iNK (TW) y (iv) iDC – aNK (TW). En los cultivos en Transwell las NKs fueron colocadas en el Transwell y las DCs cultivadas adheridas al pozo. Como controles en el plato de 48 pozos se tenían unas iDCs y unas iDCs que fueron maduras con el coctel de maduración como se mencionó anteriormente. Asimismo, en el plato de 48 y en el de 24 pozos se maduraron con el coctel unas iDCs que se destinaron para los cocultivos: (v) mDC – iNK (CC) y (vi) mDC – iNK (TW). Simultáneamente se descongelaron NKs purificadas y se resuspendieron 2×10^5 células / pocillo en medio AIM-V con Antibiótico-Antimicótico (1x) y se sembraron en dos de los pozos de la placa de 96 pocillos fondo plano suplementado con 500 U/ml de IL-2 humano recombinante.

Luego de 48h, al día séptimo del protocolo se llevaron a cabo los cocultivos de los dos pozos con las iNKs del plato de 96, las cuales se cultivaron con las mDCs: (v) mDC – iNK (CC) y (vi) mDC – iNK (TW). En cuanto a los otros cocultivos, se recolectaron y congelaron los sobrenadantes para medir en un futuro la producción de IFN- γ

usando un kit ELISA y cuantificar otras citoquinas por CBA. Posteriormente, se colectaron las células y se tiñeron con los dos paneles de anticuerpos contra marcadores de NKs y de DCs y se leyeron en el equipo FACS Aria III.

Al día decimo del protocolo, se recolectaron y congelaron los sobrenadantes de los cultivos mDC – iNK (CC) y mDC – iNK (TW), se colectaron las células y se tiñeron para la citometría de flujo multicolor.

Citometría de flujo

Se utilizaron dos estrategias de citometría de flujo para evaluar la expresión de la superficie de las células DC y NKs. Para la primera estrategia de análisis de NKs, se utilizaron mAb anti-CD3, anti-CD16 y anti-CD56 para definir las células NK. Las NKs de cada condición se tiñeron con dos paneles: **NKs, panel 1** – CD56-FITC, CD16-PerCP-Cy5.5, CD3-Pacific Blue, NKp30-PE-Cy7, CD57-APC, CD69-APC-Cy7, TIM3-PE, CTLA4-BV786, LAG3-BV605, Aqua-BV510 (BioLegend); **panel 2** –CD56-FITC, CD16-PerCP-Cy5.5, CD3-Pacific Blue, NKp30-PE-Cy7, CD57-APC, CD69-APC-Cy7, NKG2D-PE, DNAM-1-BV786, Aqua-BV510 (BioLegend). Para la segunda estrategia de análisis de DCs, se utilizó mAb anti-CD11c para definir las DCs. Estas células se tiñeron con un panel: CD11c-PE o APC, CD80-PE o APC, Aqua-BV510 (BioLegend).

Análisis estadístico

Dado que la mayoría de las lecturas no presentaron una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas. La mayoría de los datos se analizaron por un ANOVA de dos vías para comparar: el porcentaje total y de subpoblaciones de NKs y monocitos de Jóvenes y Adultos Mayores entre los dos tipos de muestra *ex vivo* (Sangre y PBMCs); la expresión de los diferentes marcadores de NKs de las subpoblaciones entre los grupos de edad (Jóvenes y Adultos Mayores); la expresión de CD69 de las NKs cultivadas con los diferentes estímulos entre los grupos de edad; la expresión de CD69 de las diferentes condiciones de cultivo (NK-DC) entre los grupos de edad; la expresión de CD80 de iDC y mDC entre los grupos de edad; expresión de CD80 de las diferentes condiciones de cultivo entre los grupos de edad. La prueba t de Student (análisis pareado) se realizó para comparar el porcentaje de iDCs Aqua+ de Jóvenes y Adultos Mayores entre las tres condiciones evaluadas. Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 6.0 (software GraphPad, La Jolla, CA), y los resultados de las diferencias establecidas son expresados con una significancia estadística: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

Resultados

Para evaluar las subpoblaciones de células NK es recomendable el análisis *ex vivo* en Sangre Total.

El análisis de subpoblaciones de leucocitos muy frecuentemente utiliza PBMCs como fuente enriquecida de estas células, sin embargo, es posible que este método de separación pueda afectar la representatividad de subpoblaciones de leucocitos en este tipo de muestra. Para el análisis de subpoblaciones de NKs, en este trabajo se analizaron *ex vivo* en muestras de Sangre y PBMCs, de cuatro Jóvenes (JOVEN) y seis Adultos Mayores (A_MAYOR), variaciones en los porcentajes de poblaciones de NKs definidas como R1-R5 de acuerdo con la expresión relativa de los marcadores CD56 y CD16 como sigue: R1: NK totales, R2: CD56- CD16+, R3: CD56 *dim* CD16+, R4: CD56 *bright* CD16+, R5: CD56 *bright* CD16-. Estos resultados se compararon con los de NKs purificadas mediante selección de células CD56+ cultivadas en IL2 por 48h luego de su crio-preservación. La **Figura 1** muestra la estrategia de análisis utilizada por Tarazona y colaboradores (Tarazona et al., 2015) para el estudio por citometría de flujo de células NK en tres tipos de muestras Sangre total (A), PBMCs (B) y NKs purificadas crio-preservadas y pre-estimuladas con IL2 (C), respectivamente.

El análisis evidencia que en general la representatividad de linfocitos en la muestra de Sangre total (Figura 1A) fue menor comparada con la observada en la muestra de PBMCs (Figura 1B) o de NKs purificadas (Figura 1C). Por su parte, el análisis de linfocitos CD3- (fracción enriquecida en NKs) en las tres muestras demostró que estas células tuvieron la menor representatividad en PBMCs. El estudio de las cinco poblaciones de NKs (R1-R5) en NKs purificadas mostro, según lo esperado, un enriquecimiento de NKs (R1) y una disminución en la población CD56- CD16- (Linfocitos B). Este análisis permitió establecer que el rendimiento del kit de purificación utilizado no fue del 100% ya que las preparaciones tuvieron una proporción importante de linfocitos CD3+ y en las células CD3-, se detectaron células CD56- (que hacen parte de R2) las cuales no debían estar presentes debido a que el kit utilizado selecciona positivamente células CD56+.

Luego de definir por citometría de flujo las cinco poblaciones, se analizó si había variaciones en los porcentajes de NKs entre los dos tipos de muestra *ex vivo* y si esta variación de las subpoblaciones cambiaba con la edad. La **Tabla 1** registra los porcentajes de las subpoblaciones comprendidas de R1 a R5 de NKs de cuatro Jóvenes y seis Adultos Mayores. Al comparar los dos tipos de análisis *ex vivo* se observó, que: (i) con excepción del Adulto Mayor 2 (A_MAYOR 2), los porcentajes de la población R1 evaluada fueron mayores en Sangre que en PBMCs; (ii) que en todos los individuos el mayor porcentaje de R1 estaba presente en las NKs purificadas y pre-estimuladas con IL2 y (iii) que las células CD56 *dim* CD16+ (R3) fue la subpoblación más predominante en los tres tipos de análisis y en todos los individuos. El análisis de las muestras de Sangre, mostro que las subpoblaciones R4 y R5 eran las menos frecuentes en los Jóvenes mientras que en el Adulto Mayor 2, 5 y 6 la R2 y la R5 eran las menos predominantes. En cuanto a las PBMCs se detectó que en el JOVEN 1, la R2 y R5 eran las menos frecuentes mientras que en el JOVEN 2, R4 y R5 fueron menos frecuentes manteniendo la tendencia observada en Sangre. A diferencia de lo observado en Sangre, en PBMCs, la tendencia fue uniforme en los cuatro Adultos Mayores, siendo

R4 y R5 las subpoblaciones menos predominantes. Teniendo en cuenta lo mencionado en relación con las células CD56- CD16+ (R2) en NKs purificadas, en los dos Jóvenes la R5 fue la menos frecuente al igual que en los Adultos Mayores a excepción del A_MAYOR 2 (Tabla 1). Con base en estos resultados se evaluó si existían diferencias entre Jóvenes y Adultos Mayores en la frecuencia de las NKs totales y de las cuatro subpoblaciones en los dos tipos de muestras analizadas *ex vivo* (Figura 2 y Figura suplementaria 1).

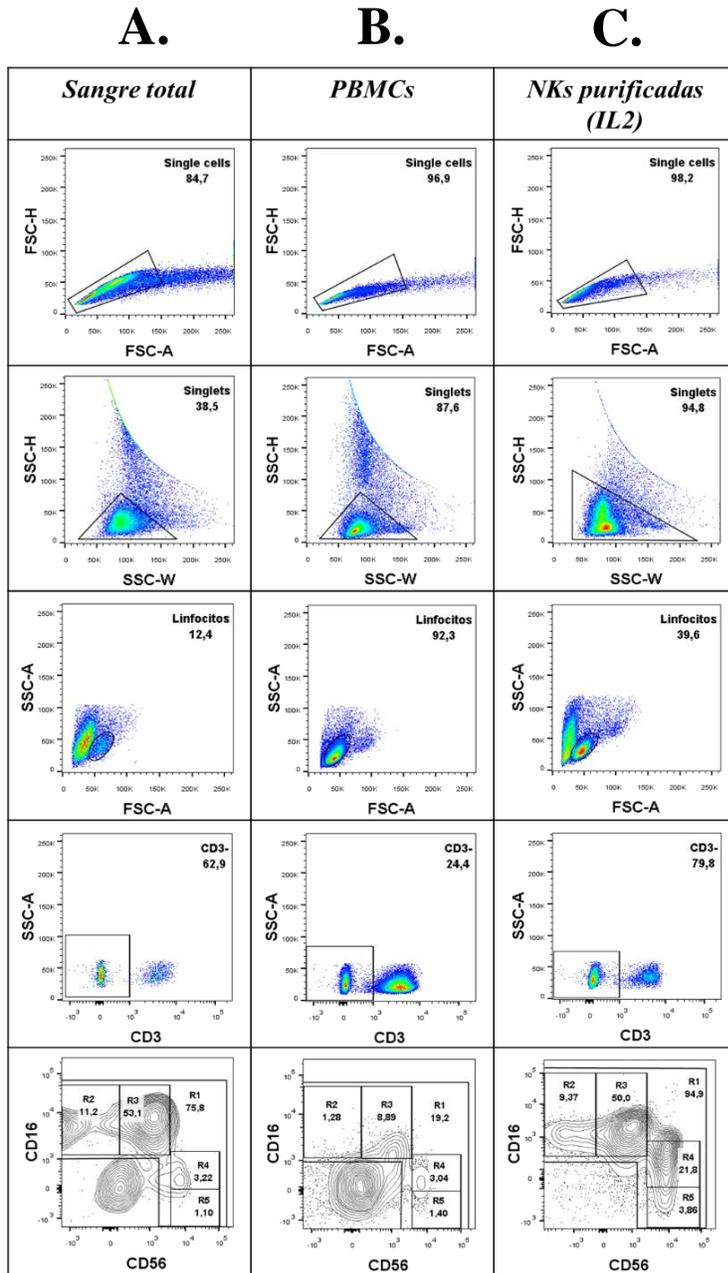


Figura 1. Estrategia de análisis por citometría de flujo y comparación del análisis *ex vivo* de células NK. Análisis entre sangre total (A), PBMCs (B) y NKs purificadas mediante selección positiva de células CD56+ cultivadas en IL2 por 48h luego de su crio-preservación del JOVEN 1 (C). Se seleccionaron los linfocitos de acuerdo con los parámetros SSC y FSC, luego se seleccionan los linfocitos CD3- seguido del análisis de la expresión de CD56 y CD16. En el panel inferior se definen las regiones R1 a R5 así: células NK totales, CD16+ CD56-, CD56 *dim* CD16+, CD56 *bright* CD16 + y CD56 *bright* CD16-respectivamente; estas regiones fueron delimitadas teniendo en cuenta el blanco de cada individuo.

Tabla 1. Porcentaje de subpoblaciones de NKs**						
Individuo	Ex vivo	R1 NKs totales	R2 CD56- CD16+	R3 CD56 dim CD16+	R4 CD56 bright CD16+	R5 CD56 bright CD16-
JOVEN 1	Sangre	70,7	10,4	50,4	3,1	0,9
	PBMCs	15,2	1,0	6,7	2,3	1,1
	NKs (IL2)	89,4	7,7*	47,2	21,4	3,5
JOVEN 2	Sangre	58,5	4,9	48,0	1,7	0,5
	PBMCs	31,1	2,6	25,1	1,0	0,3
	NKs (IL2)	83,7	1,4*	62,6	2,9	2,5
JOVEN 3	Sangre	65,5	7,2	52,0	0,3	0,5
	PBMCs	ND	ND	ND	ND	ND
	NKs (IL2)	ND	ND	ND	ND	ND
JOVEN 4	Sangre	73,0	9,4	61,2	0,5	0,1
	PBMCs	ND	ND	ND	ND	ND
	NKs (IL2)	ND	ND	ND	ND	ND
A_MAYOR 1	Sangre	67,0	13,1	45,8	1,3	0,6
	PBMCs	8,7	0,9	1,9	0,9	0,7
	NKs (IL2)	77,3	11,2*	45,2	7,1	2,3
A_MAYOR 2	Sangre	24,2	0,6	18,1	0,7	0,1
	PBMCs	39,8	6,9	30,1	1,0	0,1
	NKs (IL2)	67,5	2,1*	49,7	1,6	2,1
A_MAYOR 3	Sangre	52,1	10,6	37,3	1,3	0,5
	PBMCs	ND	ND	ND	ND	ND
	NKs (IL2)	86,6	5,3*	52,8	8,5	2,1
A_MAYOR 4	Sangre	66,8	7,7	54,1	1,1	0,2
	PBMCs	ND	ND	ND	ND	ND
	NKs (IL2)	79,7	8,5*	36,9	12,4	3,0
A_MAYOR 5	Sangre	42,4	0,2	27,5	0,7	0,4
	PBMCs	30,5	1,5	14,7	1,2	0,5
	NKs (IL2)	ND	ND	ND	ND	ND
A_MAYOR 6	Sangre	43,3	0,1	31,6	0,9	0,2
	PBMCs	37,5	2,3	22,8	1,5	0,8
	NKs (IL2)	ND	ND	ND	ND	ND

(*). Debido a que estos valores derivan de NKs purificadas con el kit *EasySep™ Human CD56 Positive Selección Kit II*, los valores de la población R2 (CD56- CD16+) obedecen a un limitado rendimiento del kit. (**). Cada valor de la tabla corresponde al promedio de dos replicas por individuo y tipo de análisis *ex vivo*. **ND**: No determinado.

No se encontraron diferencias significativas entre Jóvenes y Adultos Mayores en el porcentaje de NKs detectadas *ex vivo* en sangre y PBMCs, sin embargo, en los jóvenes el porcentaje de NKs fue mayor en Sangre que en PBMCs (**Figura 2A**), no obstante, esta diferencia pudo deberse a que en PBMCs solo se analizaron dos individuos (**Figura 2A**). En Sangre (**Figura 2B**), el porcentaje CD56 dim CD16+ (R3) fue mayor en Jóvenes que en adultos mayores; no se observaron diferencias asociadas a la edad en las demás subpoblaciones y tanto los Jóvenes como Adultos mostraron diferencias significativas entre sus respectivas subpoblaciones. En PBMCs (**Figura 2C**), no se detectaron diferencias entre Jóvenes y Adultos en las subpoblaciones, aunque los Adultos evidenciaron aumento de R3 con respecto a las demás subpoblaciones pero estas diferencias fueron menos marcadas a las observadas en Sangre.

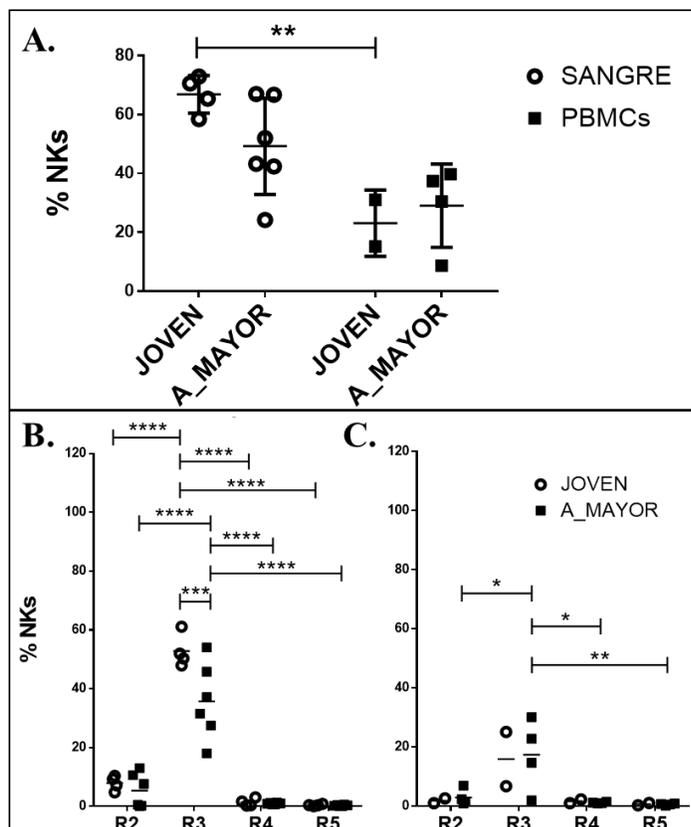


Figura 2. Detección *ex vivo* en Sangre total y PBMCs de NKs en Jóvenes (JOVEN) y Adultos Mayores (A_MAYOR). NKs totales (R1) (A) y las cuatro subpoblaciones (R2-R5) analizadas en Sangre (B) y PBMCs (C). Las regiones R2 a R5 representan respectivamente: CD16+ CD56-, CD56 *dim* CD16+, CD56 *bright* CD16+ y CD56 *bright* CD16-. En Sangre se analizaron las NKs de cuatro Jóvenes (n=4, círculos vacíos) y adultos Mayores n=6, cuadrados), en PBMCs se analizaron dos Jóvenes (n=4, círculos) y Adultos Mayores (n=2, cuadrados). Los valores de *p* se refieren a la comparación entre jóvenes y adultos mayores * *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, ****P* < 0,001.

Se detectaron algunas diferencias entre Jóvenes y Adultos Mayores en el inmuno-fenotipo de células NKs.

Para evaluar el inmunofenotipo se monitoreó la expresión en superficie de los receptores Nkp30, NKG2D, DNAM-1, CD69 NK (activadores), TIM-3, CTLA4, LAG-3 (inhibidores) y CD57 (senescencia) en NKs de los dos grupos de individuos. El análisis se hizo midiendo el porcentaje de células positivas (**Tabla 2**) y el nivel de expresión relativa (MFI) (**Tabla 3**) de cada marcador en NKs de Jóvenes y Adultos a nivel de NKs totales (R1) y de cada subpoblación (R2-R5) tanto en Sangre como en PBMCs (**Tabla 2**).

En términos de porcentaje de expresión de CD57, un marcador útil para la diferenciación terminal de células NK, fue mayor en la población total de NKs (R1) y en R2 y R3 en los Jóvenes comparado con los Adultos Mayores tanto en Sangre como en PBMCs (valores resaltados en negrilla en **Tabla 2**), al analizar el MFI se observan ciertas variaciones en los resultados que mostraron que en NKs (R1) y en R4 de los Adultos, la expresión de este marcador fue mayor (**Tabla 3**). El análisis estadístico del porcentaje de expresión positiva de CD57 en Sangre no mostró diferencias entre Jóvenes y Adultos pero si un incremento significativo en la subpoblación CD56- CD16+ (R2) con respecto a la CD56 *bright* CD16+ (R4) y a CD56 *bright* CD16- (R5) (*P* < 0,01) en los Jóvenes y en PBMCs

no se identificaron estas diferencias. En términos del MFI no se detectaron diferencias significativas entre Jóvenes y Adultos pero la expresión de CD57 en R2 ($P < 0,01$) en Sangre (MFI en **Tabla 3**) al igual que a lo observado a nivel de porcentaje (**Tabla 2**) fue mayor con respecto a las demás subpoblaciones solo en jóvenes ($P < 0,05$).

Tabla 2. Porcentaje de expresión de distintos marcadores de NKs en las poblaciones R1-R5

Marcador	Individuo	Sangre					PBMCs				
		R1 Total	R2 CD56-CD16+	R3 CD56 dim CD16+	R4 CD56 bright CD16+	R5 CD56 bright CD16-	R1 Total	R2 CD56-CD16+	R3 CD56 dim CD16+	R4 CD56 bright CD16+	R5 CD56 bright CD16-
CD57	JOVEN	31,2	56,0	27,8	0,0	0,0	23,7	50,2	27,2	0,0	0,2
	A_MAYOR	16,5	26,5	16,3	0,2	1,2	20,8	22,2	17,0	6,2	7,0
NKp30	JOVEN	3,7	0,2	4,2	7,3	3,1	5,1	4,5	6,0	2,0	0,6
	A_MAYOR	23,5	9,5	24,6	26,1	30,3	25,0	7,6	27,2	37,5	35,3
DNAM-1	JOVEN	59,6	48,6	60,4	56,7	46,5	61,9	54,3	69,7	37,0	41,0
	A_MAYOR	79,9	53,7	83,7	82,8	77,8	66,2	45,2	69,5	77,5	80,6
NKG2D	JOVEN	59,2	43,0	58,2	71,1	70,2	57,8	37,2	58,3	79,5	71,6
	A_MAYOR	40,1	15,8	41,4	66,2	69,3	44,2	12,0	39,1	70,6	75,0
Tim3	JOVEN	40,1	16,5	45,0	35,8	14,3	67,3	46,8	74,4	52,4	47,3
	A_MAYOR	56,4	31,3	62,0	37,8	38,1	62,9	35,0	67,4	60,4	54,9
Lag3	JOVEN	1,4	0,9	1,3	0,0	1,8	2,2	1,9	3,1	1,0	0,0
	A_MAYOR	1,5	1,5	1,1	7,1	0,0	3,4	1,8	3,1	1,8	0,3
CTLA4	JOVEN	9,8	9,1	10,7	4,2	1,8	9,2	12,2	12,8	3,6	1,5
	A_MAYOR	13,0	18,6	13,4	2,5	0,0	11,1	12,3	20,2	5,6	3,3
CD69	JOVEN	6,0	8,9	5,2	0,3	0,0	4,4	5,7	5,0	0,7	0,2
	A_MAYOR	6,9	3,4	6,4	2,3	2,1	4,5	2,7	4,9	4,2	4,2

(*) Cada valor corresponde al promedio de dos replicas por individuo y tipo de análisis *ex vivo*.

En cuanto a los receptores de activación, el porcentaje y el MFI de la expresión de NKp30 fue mayor en los Adultos en los dos tipos de análisis *ex vivo*, sin embargo, estadísticamente no hubo diferencias significativas ya que los valores de los Adultos 5 y 6 (A_MAYOR 5 y A_MAYOR 6) comparados con los demás individuos fueron muy elevados (**Tablas 2 y 3**). El DNAM-1 en general también se expresó en mayor proporción y MFI en los Adultos en todas las poblaciones, pero en PBMCs las CD56- CD16+ y las CD56 *dim* CD16+ (R2 y R3 respectivamente) la frecuencia de expresión incremento en los Jóvenes (**Tabla 2**), analizado el MFI su aumento en jóvenes solo se observó en R2 (**Tabla 3**). El análisis estadístico del MFI en Sangre, evidenció diferencias significativas entre Jóvenes y Adultos en la subpoblación CD56 *bright* CD16- (R5) ($P < 0,01$), siendo mayor en los adultos, y entre las subpoblaciones, en los Adultos se encontraron diferencias entre R2 y la R5 ($P < 0,05$), en PBMCs no se encontraron estas diferencias ni en términos de porcentaje ni de MFI.

La proporción de células NK de los Jóvenes que expresaron el receptor activador NKG2D fue mayor en todas las poblaciones en los dos tipos de muestra *ex vivo*, con excepción de la subpoblación CD56 *bright* CD16- (R5) en la cual la expresión de este receptor incremento en los Adultos, pero no se identificaron diferencias significativas entre Jóvenes y Adultos. En Sangre, los Adultos mostraron una disminución significativa de la subpoblación R2 con respecto a las R4 y R5 ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente); esta diferencia también se detectó en PBMCs en que además, la expresión de NKG2D en R3 estuvo disminuida con respecto a la R5 ($P < 0,05$) (**Tabla 2**). Al analizar el MFI la expresión de este marcador entre poblaciones fue muy similar (**Tabla 3**).

Tabla 3. MFI de expresión de distintos marcadores de NKs en las poblaciones R1-R5 (*)											
Marcador	Individuo	Sangre total					PBMCs				
		R1 Total	R2 CD56-CD16+	R3 CD56 dim CD16+	R4 CD56 bright CD16+	R5 CD56 bright CD16-	R1 Total	R2 CD56-CD16+	R3 CD56 dim CD16+	R4 CD56 bright CD16+	R5 CD56 bright CD16-
CD57	JOVEN	344,1	6417,4	223,0	5,8	-39,2	140,3	3484,5	248,5	36,3	3,8
	A_MAYOR	521,1	3268,2	375,7	17,2	-59,9	229,5	1793,0	217,0	75,7	-28,4
NKp30	JOVEN	261,8	115,6	289,3	426,5	396,0	309,3	141,8	339,3	323,5	282,5
	A_MAYOR	754,4	221,5	768,4	1030,3	1331,3	532,4	166,7	603,6	1178,3	1181,4
DNAM-1	JOVEN	1341,3	1037,7	1352,5	1271,5	601,5	1453,0	1100,5	1709,0	900,5	813,5
	A_MAYOR	2692,2	1275,3	2817,2	2697,7	3707,2	2965,8	740,9	3201,0	3067,0	3329,3
NKG2D	JOVEN	1282,0	1157,5	1210,5	1582,3	1405,0	1077,5	740,0	1079,0	1806,5	1738,5
	A_MAYOR	902,8	297,3	959,7	1690,8	1918,4	815,8	226,2	765,3	1657,3	1915,5
Tim3	JOVEN	832,3	584,0	1121,8	835,5	399,6	1562,5	917,0	1759,5	1049,5	852,0
	A_MAYOR	1284,0	795,7	1411,3	906,8	999,8	1679,5	442,0	1708,3	1302,8	1330,3
Lag3	JOVEN	44,9	84,2	39,5	21,2	-127,5	77,7	47,6	93,0	75,4	24,4
	A_MAYOR	40,5	31,0	46,6	20,9	-82,5	107,7	57,2	176,7	97,1	18,0
CTLA4	JOVEN	279,5	289,0	293,8	-34,9	-118,3	307,5	377,5	361,0	110,1	12,2
	A_MAYOR	357,8	429,8	375,5	3,0	-160,5	345,5	330,5	533,0	180,8	117,6
CD69	JOVEN	187,7	185,9	185,9	-28,4	95,6	124,4	140,5	149,3	37,6	49,4
	A_MAYOR	98,7	49,5	96,5	74,2	16,6	123,7	92,0	136,6	103,7	80,6

(*) Cada valor corresponde al promedio de dos replicas por individuo y tipo de análisis *ex vivo*.

En cuanto a la expresión de LAG-3, el porcentaje y el MFI de su expresión vario mucho no solo entre las diferentes poblaciones en Jóvenes y Adultos sino también entre Sangre y PBMCs. La expresión de TIM-3 y CTLA4, en general, fue mayor en Adultos con excepción de algunas poblaciones en que se observó incrementada su expresión en Jóvenes tanto en Sangre como en PBMCs (**Tabla 2**). En Sangre de los Adultos, el MFI de CTLA4 evidenció diferencias significativas de su expresión a la baja en R5 con respecto a R1, R2 y R3 ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,05$ respectivamente). A nivel del porcentaje de expresión de TIM3 en el Adulto se observó una disminución significativa de la subpoblación R2 con respecto a R3 en PBMCs ($P < 0,05$). Por último, para evaluar *ex vivo* la proporción de células NK activadas entre los dos grupos de individuos, se analizó la expresión de CD69. A nivel de la población total de NKs se observó que el porcentaje de expresión de este marcador era mayor en Adultos

tanto en Sangre como PBMCs, lo cual probablemente se atribuye a que en las dos subpoblaciones CD56 *bright* (R4 y R5) la frecuencia de este marcador se mantuvo elevada en los Adultos (**Tabla 2**), sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas.

CD69 es útil para evaluar el grado de activación de células NK estimuladas *in vitro*.

En la siguiente sección de resultados se pretendió evaluar en el sistema de cultivo *in-vitro* el fenotipo de activación de NKs cultivadas en IL2 sometidas a diferentes estímulos (con o sin agonistas de TLR3: Poly IC y TLR9: CpG). La activación de las células NK se determinó por el porcentaje de células que expresaban CD69 y se hizo la comparación entre jóvenes y adultos luego de 48h en cuatro condiciones de cultivo: solo IL2, IL2 + Poly IC, IL2 + CpG e IL2 + Poly IC+ CpG. Debido a que estos análisis se hicieron en NKs purificadas por selección positiva de células CD56+ presentes en PBMCs crio-preservedas, para esta sección y los próximos experimentos se modificó la estrategia de análisis por citometría de flujo, seleccionando y analizando únicamente las células CD3-CD56+ (**Figura 3**).

Luego de definir las poblaciones de NKs a analizar se prosiguió a graficar los valores del MFI y del porcentaje de expresión positiva de CD69 con el fin de analizar la activación de las NKs cultivadas por 48h con los diferentes estímulos y así poder identificar posibles diferencias entre Jóvenes y Adultos, y cuál de las combinaciones de estímulos inducía una mayor activación de estas células (**Figura 4**). Por lo anterior, se decidió aplicar la misma estrategia de análisis a la línea base (Sangre y PBMCs) mostrada en la figura 3 y así establecer los valores del estado basal de activación de NKs antes de ser expuestas a algún tipo de estímulo.

No se identificaron en cada estímulo diferencias estadísticamente significativas entre las NKs de los Adultos Mayores y los Jóvenes, pero al analizar el grado de activación de las NKs de Adultos y Jóvenes por separado, se observó que mientras el Adulto Mayor el CD69 aumentó luego de las 48h con tres estímulos (IL2 + Poly IC; IL2 + CpG; IL2 + Poly IC + CpG), en el Joven solo aumentó con IL2 + Poly IC. En cuanto al MFI se observó que las NKs del Joven se activaron únicamente con la combinación de IL2 + Poly IC ya que mostraron un incremento significativo de CD69 con respecto a la línea base (Sangre total $P<0.01$ y PBMCs $P<0.05$) y con las NKs estimuladas solo con IL2 ($P<0.05$). También los Adultos Mayores mostraron una activación significativamente mayor con respecto a la línea base de la expresión de CD69 en NKs estimuladas con la combinación IL2 + Poly IC en Sangre total ($P<0.001$) y PBMCs ($P<0.01$) pero se comportaron similar a los Jóvenes al comparar estas NKs con las solo estimuladas con IL2 ($P<0.05$). Además, estas NKs también se activaron con la combinación de IL2 + Poly IC + CpG que dieron diferencias significativas con respecto a Sangre total ($P<0.01$) y PBMCs ($P<0.05$) (**Figura 4A**).

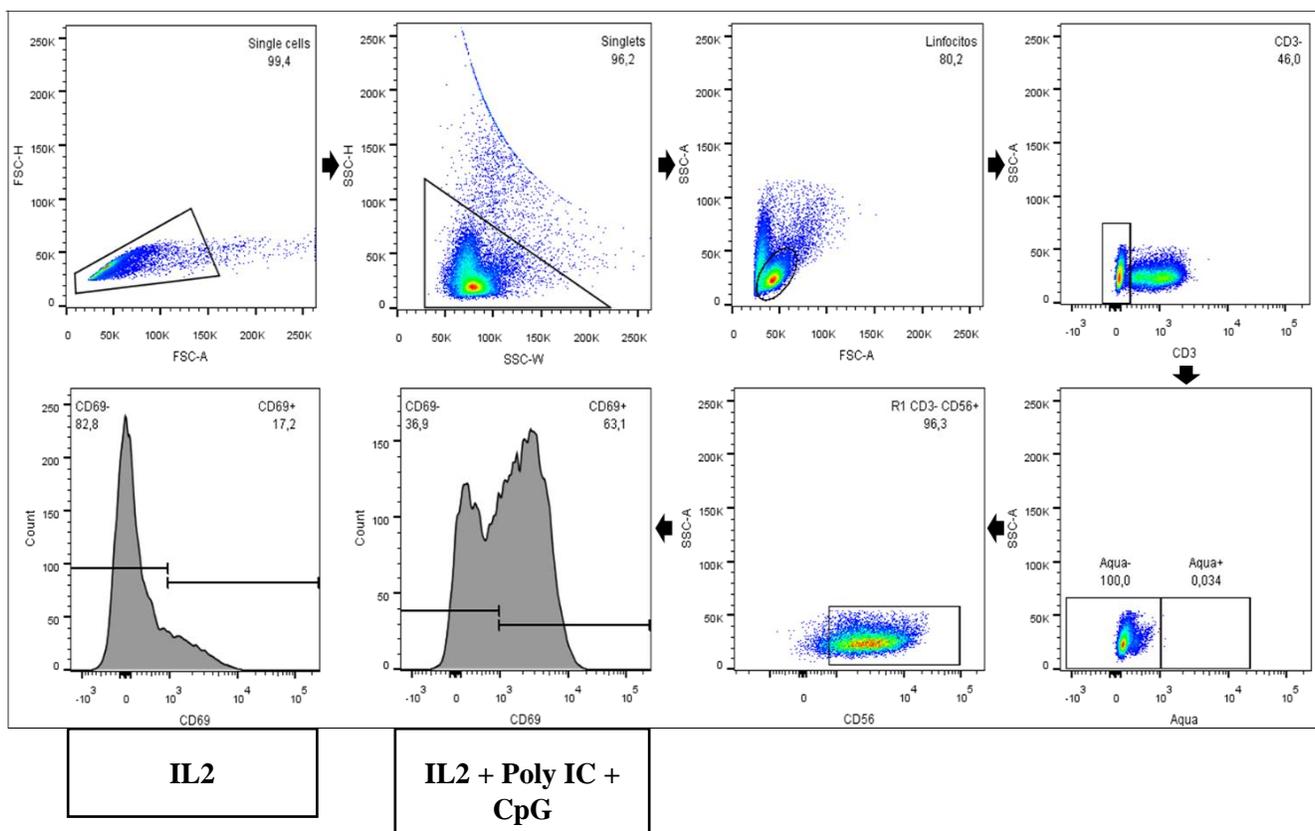


Figura 3. Estrategia de análisis por citometría de flujo de células NK purificadas. Células CD3- CD56+ fueron purificadas a partir de PBMCs crio-preservadas mediante selección positiva de células CD56+, luego de cultivadas en IL2 y estimuladas *in vitro* por 48h. Se muestra como ejemplo el análisis de del ADULTO MAYOR 5. Los linfocitos se seleccionaron de acuerdo con los parámetros SSC y FSC, luego se seleccionan los linfocitos negativos para CD3, luego las células viables Aqua negativas y se hizo el análisis en la población de expresión CD56 positivas, teniendo cuenta el blanco de cada individuo. Finalmente se analizó en histogramas la expresión de CD69, se incluyó el histograma de cuando fueron estimuladas solo con IL2 (izquierda) y se compara con el histograma luego del cultivo en IL2 y estimuladas con la combinación Poly IC y CpG (derecha).

Al analizar el porcentaje de expresión positiva del CD69, las NKs de los Jóvenes en respuesta al estímulo de IL2 + Poly IC se comportaron similar a lo observado por MFI con una significancia estadística mayor (Sangre total ($P < 0.001$) PBMCs ($P < 0.01$) solo con IL2 ($P < 0.05$). Además, estas NKs se estimularon con IL2 + CpG pero solo se vio diferencia significativa con respecto a las NKs de Sangre total ($P < 0.05$). Al igual que el MFI, en los Adultos a nivel de porcentaje se evidenció aumento de células CD69+ por los estímulos IL2 + Poly IC y por la combinación de IL2 + Poly IC + CpG al aumentar significativamente con respecto a ambas líneas base (Sangre – IL2 + Poly IC $P < 0.0001$, Sangre – IL2 + Poly IC + CpG $P < 0.001$, PBMCs – IL2 + Poly IC $P < 0.001$ y PBMCs – IL2 + Poly IC + CpG $P < 0.001$). Finalmente, y al igual que en los Jóvenes, las NKs de los adultos mayores mostraron un porcentaje significativamente mayor de células CD69+ con respecto a la línea base en respuesta al estímulo con IL2 + CpG, (Sangre $P < 0.01$ y PBMCs $P < 0.01$) (Figura 4B).

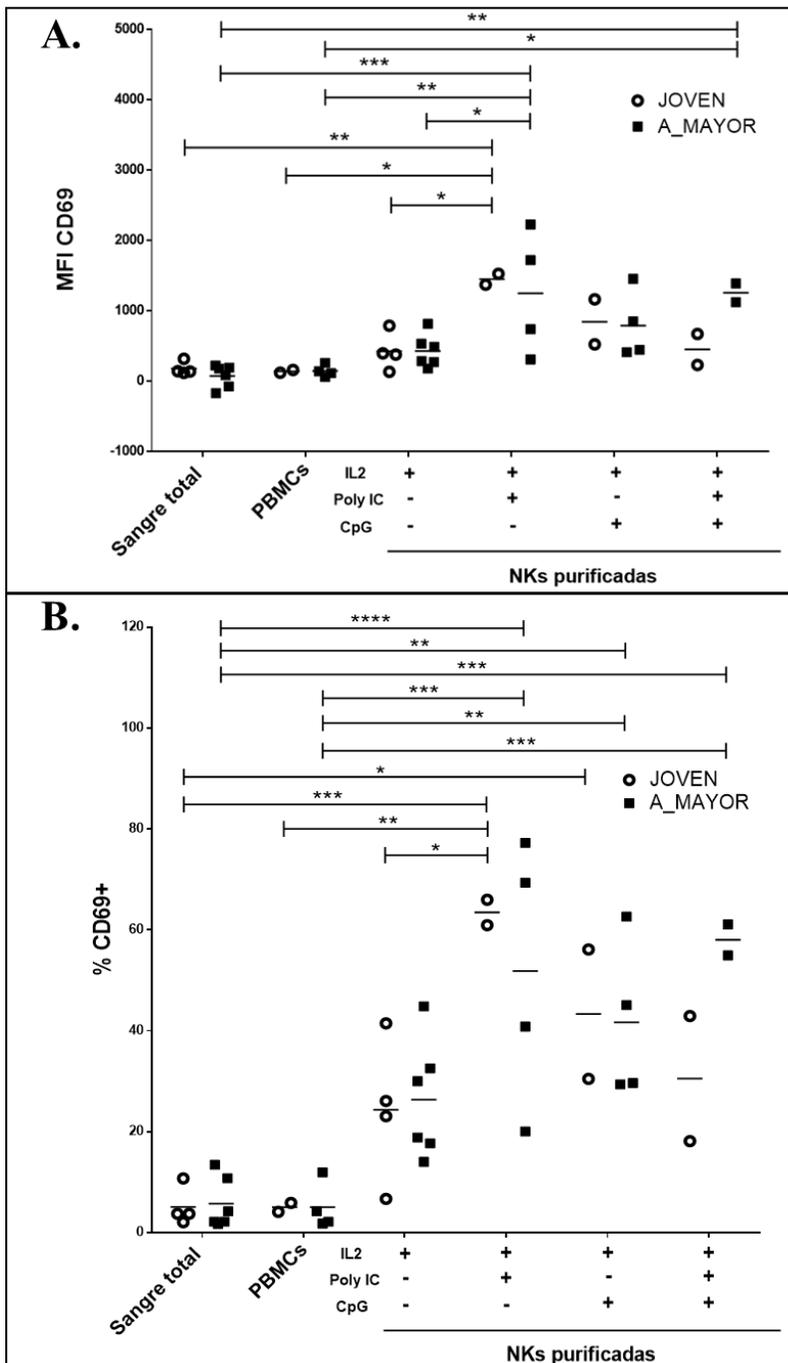


Figura 4. Evaluación de la activación *in vitro* de células NKs purificadas. Activación medida por la expresión de CD69 de NKs purificadas de Jóvenes (círculos vacíos) y Adultos Mayores (cuadrados) luego de ser cultivadas *in vitro* por 48h con cuatro combinaciones de estímulos: solo IL2, IL2 + Poly IC, IL2 + CpG e IL2 + Poly IC+ CpG y de Sangre total y PBMCs del *ex vivo* que no recibieron ningún tipo de estímulo (línea base). El IL2 fue utilizado a una concentración de 500U, el Poly IC a 50ug/mL y el CpG a 5ug/mL. Se presenta el análisis con los valores de la Intensidad media de fluorescencia (MFI) (A) y porcentaje de la expresión positiva de este marcador (%CD69+) (B). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

El análisis de subpoblaciones de monocitos evidencia diferencias entre Jóvenes y Adultos Mayores

Debido a que las células dendríticas a ser utilizadas en el estudio se obtienen a partir de monocitos de sangre periférica, se consideró importante realizar el análisis de subpoblaciones de monocitos en los dos tipos de muestra *ex vivo* (Sangre y PBMCs) siguiendo la estrategia de análisis por citometría de flujo ilustrada en la **Figura suplementaria 2**. Se analizó el porcentaje total de monocitos y de las tres subpoblaciones (monocitos clásicos

CD14++ CD16-, intermedios CD14++ CD16+ y los no clásicos CD14+ CD16++) a partir de las dos muestras *ex vivo* Sangre y PBMCs, de Jóvenes y Adultos Mayores registrados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Subpoblaciones de monocitos (%)					
Individuo	Muestra	Totales	Q1 CD14+ CD16++	Q2 CD14++ CD16+	Q3 CD14++ CD16-
JOVEN 1	Sangre	3,89	5,09	0,8	33
	PBMCs	3,47	7,62	3,13	29,2
JOVEN 2	Sangre	11,8	7,14	6,91	50,3
	PBMCs	11,8	13,1	2,87	49,4
JOVEN 3	Sangre	10,6	4,94	0,55	34,6
	PBMCs	ND	ND	ND	ND
JOVEN 4	Sangre	1,04	8,56	0,31	38,2
	PBMCs	ND	ND	ND	ND
A_MAYOR 1	Sangre	16	7,28	2,63	52,2
	PBMCs	11,5	6,15	8,76	79,7
A_MAYOR 2	Sangre	5,92	6,12	1,5	50,8
	PBMCs	8,63	8,56	1,5	59,9
A_MAYOR 3	Sangre	9,55	3,74	2,52	85,1
	PBMCs	ND	ND	ND	ND
A_MAYOR 4	Sangre	9,64	5,84	1,16	66,8
	PBMCs	ND	ND	ND	ND
A_MAYOR 5	Sangre	16,9	7,58	9,05	59,1
	PBMCs	11,1	5,07	11,3	70,5
A_MAYOR 6	Sangre	25,2	4,95	5,7	65,3
	PBMCs	1,13	9,74	12	65,5

ND: No determinado.

Al analizar los porcentajes de cada individuo, se observó que en general los monocitos totales en Sangre de todos los individuos en los dos grupos estaban en mayor proporción a excepción del Adulto Mayor 2 (A_MAYOR 2) y el Joven 2 (JOVEN 2) (**Tabla 4**). En cuanto a las subpoblaciones de monocitos se encontró que como se describe en la literatura, la subpoblación más numerosa (80% al 90% del total de los monocitos circulantes) fueron los monocitos clásicos (Q3: CD14++ CD16-) tanto en Jóvenes como en Adultos Mayores (Sampath, Moideen, Ranganathan, & Bethunaickan, 2018). En los Jóvenes se registró que los monocitos intermedios fueron los de menor frecuencia (Q2: CD14++ CD16+) y la subpoblación de monocitos no clásicos (Q1: CD14+ CD16++) registró valores intermedios (**Tabla 4**). Y en los Adultos la proporción de estas subpoblaciones varió más, ya que en cuatro de los Adultos (A_MAYOR 1 al 4) se registró un incremento de la subpoblación de los no clásicos (Q1: CD14+ CD16++) generalmente considerados proinflamatorios (Sampath et al., 2018) y en los otros dos Adultos (A_MAYOR 5 y 6) los intermedios (Q2: CD14++ CD16+) registraron valores más altos (**Tabla 4**). Para evaluar si estas diferencias entre Jóvenes, Adultos y subpoblaciones eran estadísticamente significativas, se graficaron

estos valores haciendo un análisis del porcentaje total de monocitos y de las tres subpoblaciones, comparando el tipo de muestra *ex vivo* y la edad (Figura 5).

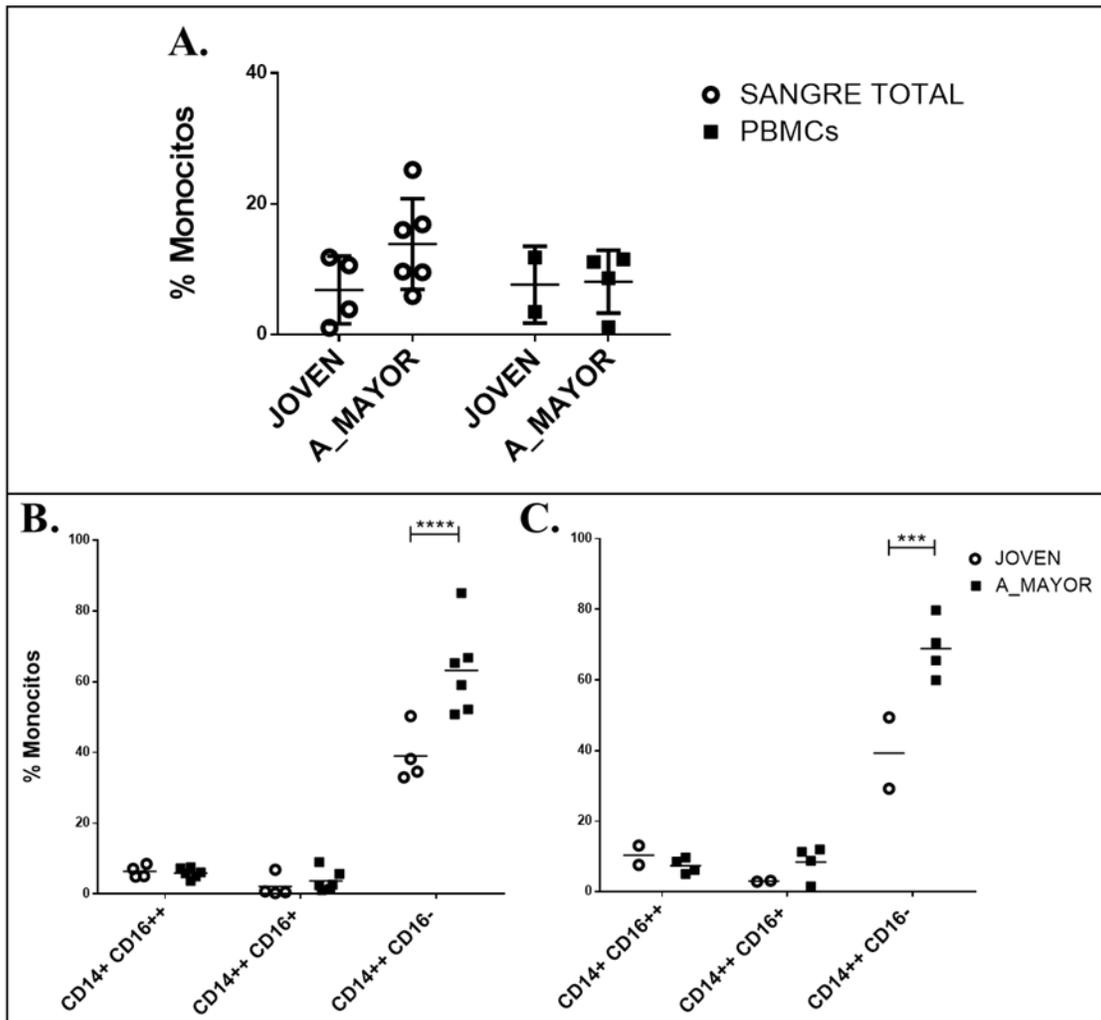


Figura 5. Comparación de la proporción *ex vivo* de monocitos y subpoblaciones de monocitos entre jóvenes y adultos mayores. Porcentajes de monocitos en Jóvenes (JOVEN) y Adultos Mayores (A_MAYOR) en los dos tipos de muestras *ex vivo*: Sangre total y PBMCs. Frecuencia de (A) Monocitos totales y (B) de las tres subpoblaciones analizadas en Sangre y (C) en PBMCs. En Sangre se analizaron los monocitos Jóvenes (n=4, círculos vacíos) y Adultos Mayores (n=6, cuadrados), en PBMCs se analizaron Jóvenes (n=2, círculos) y Adultos Mayores (n=4, cuadrados). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

No se encontraron diferencias significativas del porcentaje total de monocitos entre Jóvenes y Adultos Mayores, ni entre los dos tipos de muestra *ex vivo* (Figura 5A). En Sangre solo se identificaron diferencias significativas en los monocitos clásicos CD14++ CD16-, demostrando que la frecuencia de esta subpoblación en Adultos fue mayor al compararla con los Jóvenes (Figura 5B). En PBMCs (Figura 5C), se observó el mismo resultado, pero con una menor significancia estadística, lo cual quizás se pueda atribuir a la diferencia en el número de individuos analizado entre Jóvenes (n=2) y Adultos (n=4) (Figura 5C). Lo anterior concluye que a diferencia del análisis *ex vivo* realizado en NKs (Figura 2), en los estudios de monocitos se comportaron de manera similar las frecuencias de las diferentes poblaciones al comparar Sangre y PBMCs.

Las células dendríticas inmaduras de Adultos Mayores responden más activamente al coctel de maduración.

En la siguiente sección se evaluó en un sistema de cultivo *in-vitro*, el fenotipo de maduración de dendríticas inmaduras sometidas a un estímulo proinflamatorio (LPS e IFN gamma) por 48h, y se comparó la capacidad de maduración inducida por el coctel de dendríticas inmaduras entre DCs de Jóvenes y de Adultos Mayores.

La capacidad de maduración de estas dendríticas se hizo teniendo en cuenta la expresión de CD80 (**Figura 6**) ya que cuando las dendríticas se encuentran en un estadio inmaduro (iDC) estas expresan un numero bajo de moléculas como CD40, CD54, CD80, CD86, CD54/ICAM-1, CD58/IFA-3 y CD83, y al momento de inducir su maduración por diferentes tipos de estímulo inflamatorio, en nuestro caso LPS e IFN-gamma, se puede evaluar el grado de diferenciación a células dendríticas maduras (mDC) midiendo el incremento de la expresión de estas moléculas (Cella et al., 1999). Luego de evaluar la expresión de diferentes marcadores en respuesta al estímulo de maduración (CD80, **CD83**, y **CD209 datos no mostrados**), en este protocolo se decidió monitorear la expresión del CD80 como marcador de maduración.

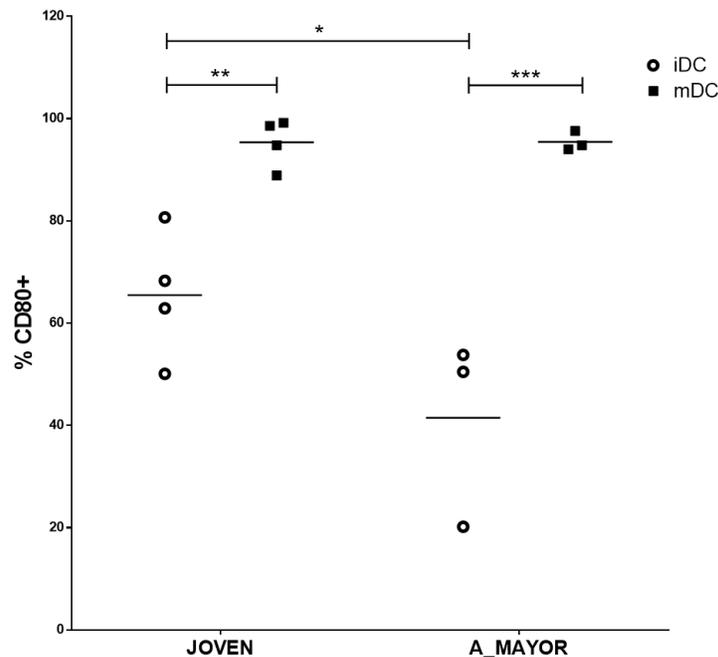


Figura 6. Evaluación de la expresión positiva de CD80 como marcador de maduración de DCs. Capacidad de maduración de dendríticas inmaduras de cuatro Jóvenes (JOVEN 1, 2, 5 y 6) y tres Adultos Mayores (A_MAYOR 1, 5 y 6) inducida por el coctel de maduración (LPS (1000ng/mL) + IFN gamma (100U/mL)). Las dendríticas inmaduras (iDC) se representan con círculos vacíos y las maduras (mDC) con cuadrados. Las dendríticas inmaduras se generaron a partir de monocitos purificados cultivados en GMCSF e IL4 por 5d (dos dosis cada 48h). Los valores de p se refieren a la comparación entre jóvenes y adultos mayores. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Al comparar los Jóvenes con los Adultos Mayores solo se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de expresión de CD80 de las dendríticas inmaduras (iDCs) (**Figura 6**), reflejando que las dendríticas de los Adultos expresan menos esta molécula de coestimulación en su estadio inmaduro. En cuanto al porcentaje de dendríticas

maduras (mDC) obtenidas luego de la maduración, no se observaron diferencias significativas asociadas a la edad. Por su parte las dendríticas tanto de Jóvenes como de los Adultos Mayores respondieron como era de esperarse al coctel de maduración, sin embargo, debido a la expresión más baja de CD80 por parte de las dendríticas inmaduras de los Adultos Mayores, el delta de expresión de CD80 entre iDCs vs. mDCs fue estadísticamente mayor en los Adultos Mayores.

El contacto célula-célula de DCs y NKs es importante para la mutua activación de estas dos células.

Luego de realizar el análisis fenotípico y funcional de las NKs estimuladas con IL2 y agonistas de TLR y evaluar la respuesta a la maduración de las iDCs al coctel de maduración (LPS e IFN-gamma), se implementó un sistema de cultivo *in vitro* con el fin de evaluar algunas hipótesis acerca de la cooperatividad funcional de estas dos células cuando interactúan en cocultivo. Se ha descrito que la interacción de NKs y DCs es importante para su desempeño funcional, por ende, este grupo de experimentos se llevaron a cabo para observar la influencia del cocultivo de ambas células en la activación de las NKs y maduración de DCs. Asimismo, el sistema de cultivo *in vitro* se utilizó para evaluar dos aspectos que probablemente puedan influenciar en esta interacción: la edad debido a aspectos de la inmuno-senescencia y la importancia del contacto célula-célula.

En esta sección se consideraron las NKs cultivadas solo con IL2 como NKs inactivas (**iNK**), y a las estimuladas con Poly IC y CpG como NKs activadas (**aNK**). En total se implementaron seis condiciones de cultivo diferentes de manera directa o separada por un sistema Transwell: (i) iDC – iNK; (ii) iDC – aNK y (iii) mDC – iNK las tres en cultivo directo manteniendo el contacto célula – célula (descrito en adelante con CC) y los mismos tres cultivos (iv) iDC – iNK, (v) iDC – aNK y (vi) mDC – iNK cultivadas separadas en un sistema Transwell (TW).

NK activada (aNK) o inactiva (iNK) pueden estimular tanto dendríticas maduras (mDCs) como dendríticas inmaduras (iDCs).

Antes de evaluar el efecto de aNK o iNK en las dos condiciones (CC o TW), se compararon solo dos de estas formas de cultivo con el fin de comprobar en primer lugar la hipótesis de que una NK cultivada en IL2 y activada con agonistas de TLR por 48h (aNK) luego de ser cocultivada con iDCs, tendría la capacidad de inducir la maduración de esta dendrítica evaluada su maduración por la expresión de CD80. Como control en esta comparación se midió el nivel de expresión de CD80 en las dendríticas inmaduras y las maduras con el coctel de maduración (LPS e IFN gamma) (**Figura 7**).

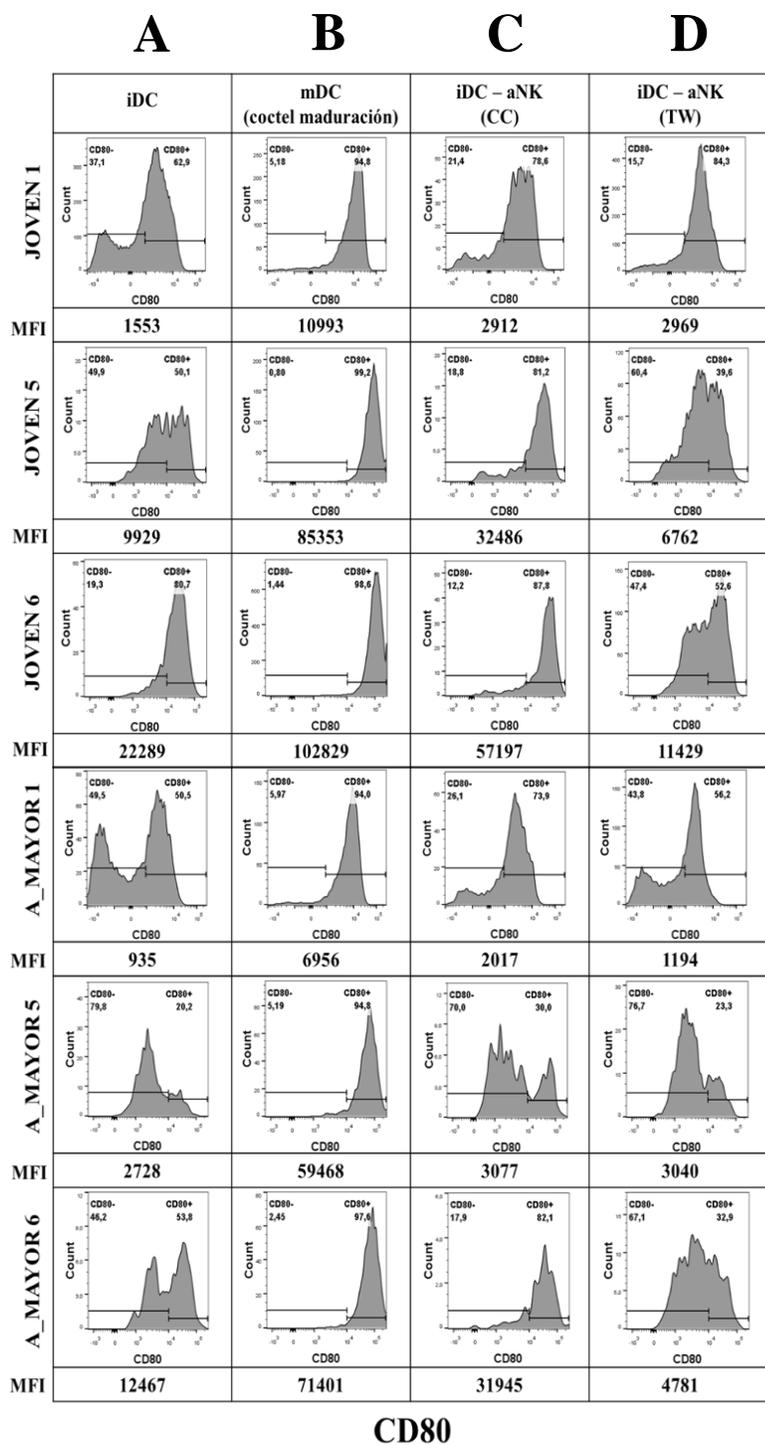
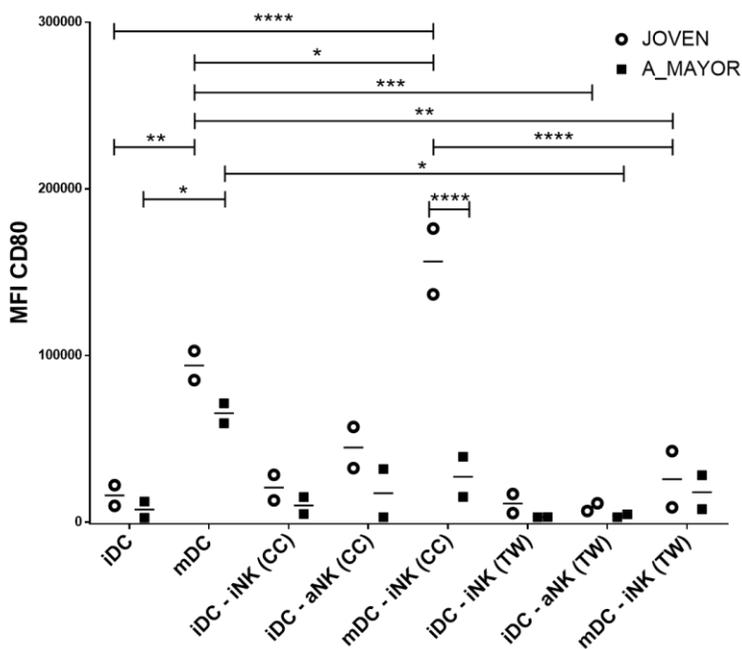


Figura 7. Maduración de DCs (mDCs) alcanzado por iDCs cultivadas con NKs activadas (aNK) Histogramas en que se compara el grado de expresión de CD80 en cuatro cultivos del sistema *in-vitro* implementado, medido con el fin de evaluar la maduración de dendritas inmaduras (iDC) en términos del MFI y porcentaje de expresión positiva de CD80, inducida por el cultivo con NKs activadas (aNK). Los cultivos comparados de izquierda a derecha son: (A) dendríticas inmaduras (iDC), (B) dendríticas maduras con el coctel de maduración (mDC), (C) dendríticas inmaduras cultivadas directamente con NKs activadas (iDC - aNK en contacto célula – célula CC) y (D) dendríticas inmaduras cultivadas con NKs activadas pero separadas por Transwell (iDC – aNK TW). Se evaluaron los cultivos de tres Jóvenes (JOVEN 1, 5 y 6) y tres Adultos Mayores (A_MAYOR 1, 5 y 6). Mientras las NKs del JOVEN 1 y el A_MAYOR 1, fueron activadas con IL2 + Poly IC, las NKs de los otros dos jóvenes y adultos mayores fueron activadas con IL2 + POLY IC + CpG. El nivel de expresión de CD80 se

determinó a partir del nivel de expresión de este marcador en los controles (iDC vs. mDC maduras utilizando el coctel de maduración).

Al comparar la columna de las dendríticas inmaduras en los tres Jóvenes y los tres Adultos Mayores (**Figura 7A**) se observó un incremento en el porcentaje y el MFI de la expresión positiva de CD80 cuando se cocultivaron con las iDC – aNK (CC) (**Figura 7C**), lo cual sugiere que al estar en contacto célula – célula, NKs previamente activadas tienen la capacidad de inducir la maduración de dendríticas inmaduras (iDCs); en términos de MFI, este incremento fue más pronunciado en dos de los Jóvenes (JOVEN 5 (iDC 9929 – iDC-aNK CC 32486) y JOVEN 6 (iDC 22289 – iDC-aNK CC 57197) y en uno de los Adultos Mayores (A_MAYOR 6 (iDC 12467 – iDC-aNK CC 31945)); además con este resultado se evidenció una respuesta de las iDCs al coctel de maduración en términos de aumento del MFI y del porcentaje de DCs CD80+ (**Figura 7B**). En general el resultado del cultivo en Transwell (**Figura 7D**) permitió comprobar que el contacto célula - célula (CC) es importante para la maduración observada en iDCs por parte de aNKs. En general en los cultivos TW (**Figura 7D**) el MFI y el porcentaje de CD80 en DCs disminuyó a excepción del JOVEN 1; en los Jóvenes 5, 6 y en el Adulto Mayor 6 esta disminución fue notoria cuando se comparó con la condición en la que se encontraban en contacto (CC en **Figura 7C**). Al comparar los valores del MFI y el porcentaje de CD80 detectados en este cuarto cultivo (**Figura 7D**) con los valores en las



dendríticas maduras luego del CC con aNK (**Figura 7C**) en general estos fueron menores, demostrando que la maduración observada en los cultivos del panel 7C (CC) no se alcanzó debido a que las iDCs no estuvieron en contacto directo con las aNKs.

Con el fin de analizar las observaciones de la figura 7, se prosiguió a graficar el MFI del CD80 encontrado en los ocho cultivos con el fin de determinar si las diferencias vistas a nivel de histogramas eran significativas. En este análisis solo se incluyeron los Jóvenes 5 y 6 y los Adultos Mayores 5 y 6 (**Figura 8**).

Figura 8. Grado de maduración de DCs inducido por NKs. Intensidad media de fluorescencia (MFI) del CD80 de los ocho cultivos para observar el efecto de las NKs inactivadas (iNK) o activadas (aNK) sobre las dendríticas inmaduras (iDC) o maduras (mDC), comparando las dendríticas de los Jóvenes (círculos vacíos) y de los Adultos Mayores (cuadrados). Se graficaron los valores de dos Jóvenes (JOVEN 5 y 6) y dos Adultos Mayores (A_MAYOR 5 y 6). Las barras horizontales representan la mediana. Los valores de *p* se refieren a la comparación entre jóvenes y adultos mayores y los dos tipos de análisis *ex vivo*. * *P* <0,05, ** *P* <0,01, ****P* <0,001.

Las mismas comparaciones hechas en la **Figura 7** fueron hechas entre Jóvenes y Adultos Mayores, si bien se compararon solo dos individuos en cada grupo los resultados del análisis presentados en la **Figura 8** muestran que

las aNK de los Jóvenes cultivadas directamente con las dendríticas inmaduras (iDC-aNK CC) inducen la maduración de estas dendríticas; lo anterior se infiere del hecho de que no hubo diferencia significativa entre el MFI del CD80 de las respectivas mDCs con respecto al detectado en las iDCs cocultivadas con aNK, esta maduración fue mayor en los jóvenes que en los adultos mayores. Como se mostró en la **Figura 7**, los dos jóvenes (5 y 6) y solo uno de los adultos mayores evaluados (A_MAYOR 6) en el cultivo 7C mostraron un incremento notorio en el MFI de CD80 al compararlos con las iDCs (cultivo 7A). También se comprobó una vez más que las iDCs de Jóvenes y Adultos Mayores respondieron bien al coctel de maduración ya que iDCs de ambos individuos mostraron diferencias significativas al compararlo con las dendríticas maduras (Jóvenes mDC-iDC y Adultos mayores mDC-iDC (**Figura 8**). Asimismo, al evaluar el efecto en la maduración de iDCs del cultivo Transwell iDC-aNK (TW), en los Jóvenes el efecto fue más notorio ya que el MFI de las dendríticas de este cultivo disminuyó significativamente con respecto al MFI de dendríticas maduras. Este resultado fue similar en los Adultos Mayores, aunque la diferencia fue menor con respecto a las mDC. Lo anterior demostró una vez más la importancia del contacto célula - célula para la maduración de iDCs por parte de aNKs (**Figura 8**).

Los resultados en esta gráfica también evidenciaron que las NKs así estén inactivas (iNK) pueden incluso incrementar el MFI de CD80 en mDCs maduras con el coctel de maduración. De manera interesante los resultados muestran que este efecto favorable de iNKs sobre mDCs es dependiente del contacto célula – célula y es afectado por la edad de los individuos. Lo anterior se observó al comparar el cultivo de las mDC-iNK (CC) con las dendríticas maduras (mDC), ya que el MFI disminuyó significativamente en la condición mDC-iNK (TW). Como se mencionó anteriormente, la capacidad de estas iNKs cocultivadas con las mDC de incrementar su MFI de CD80 también se afectó por la edad, ya que este efecto solo se observó en los Jóvenes y se identificó una diferencia significativa al comparar el MFI de las dendríticas maduras de los Jóvenes con las de los Adultos Mayores del cultivo mDC-iNK CC (**Figura 8**).

mDCs tienen la capacidad de estimular NKs inactivas (iNK).

Dados los antecedentes de cooperación entre estas dos células, otra hipótesis contemplada en este trabajo es que mDCs tienen la capacidad de activar células NKs inactivas (iNK). Al igual que en la **Figura 7**, esto se analizó primero a nivel de histogramas y luego se graficó con el fin de establecer si existen diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. Para evaluar esta segunda hipótesis, se hizo la comparación de cuatro cultivos presentados en la **Figura 9** a saber (i) iNK (solo pre-estimuladas con IL2) y (ii) aNK (cultivadas en IL2 y activadas con agonistas de TLR) como controles; (iii) mDCs – iNK (CC) y (iv) mDC – iNK (TW) y se evaluó en estos cultivos el grado de la activación de estas NKs en términos del MFI y porcentaje de expresión positiva de CD69 (**Figura 9**).

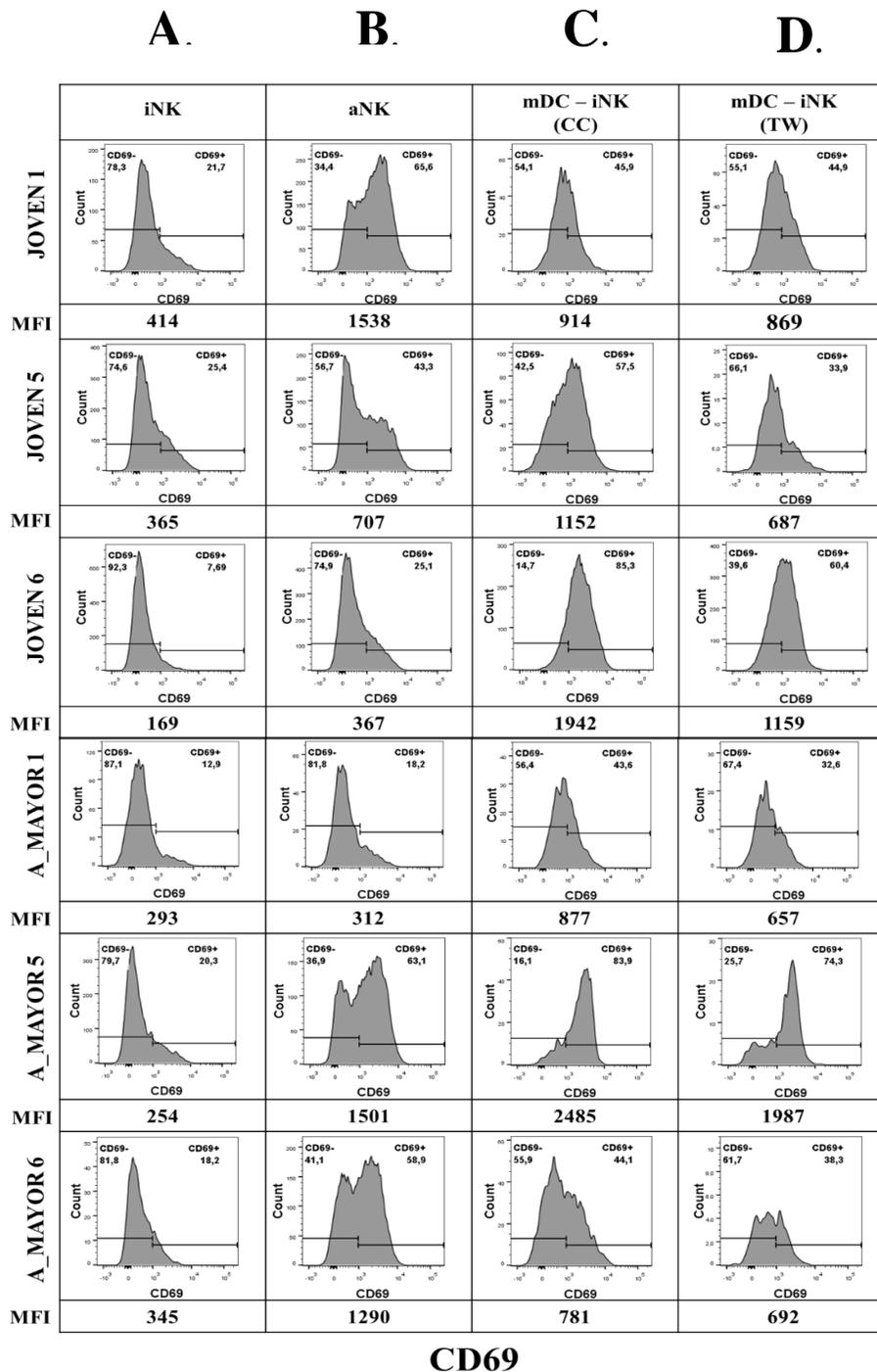


Figura 9. Grado de activación de NKs inducido por DCs. Histogramas de la comparación de cuatro cultivos del sistema *in-vitro* implementado para la evaluación de la activación de iNKs en términos del MFI y porcentaje de expresión positiva de CD69, inducida por el cultivo con DCs maduras con el coctel de maduración (mDC). Los cultivos comparados de izquierda a derecha son: (A) NKs inactivas (iNK), (B) NKs activadas con IL2 y agonistas de TLR (aNK), (C) dendríticas maduras cultivadas directamente con NKs inactivas (mDC - iNK en contacto célula – célula CC) y (D) dendríticas maduras cultivadas con NKs inactivas pero separadas por Transwell (mDC – iNK TW). Se evaluaron los cultivos de Jóvenes (n=3: JOVEN 1, 5 y 6) y Adultos Mayores (A_MAYOR n=3 1, 5 y 6). Las aNK del JOVEN 1 y el A_MAYOR 1 utilizadas como control positivo de activación de NKs fueron activadas con la combinación IL2 + Poly IC y las NKs de los otros dos jóvenes y adultos mayores

fueron activadas con IL2 + POLY IC + CpG. El punto en el que se empezaron a considerar positivas para la expresión de CD69 se determinó a partir de los controles (iNK y aNK).

Luego de analizar los resultados, se observó que en los tres Jóvenes y los tres Adultos Mayores las NKs que estaban inactivas se activaron al ser cultivadas directamente con las dendríticas maduras, esto se evidenció por el aumento tanto del MFI como del incremento del porcentaje de células con expresión positiva de CD69 en las NKs del cultivo mDC-iNK (CC) (**Figura 9C**) con respecto al porcentaje y el MFI del CD69 de las iNKs (**Figura 9A**), en esta ocasión en 2/3 Jóvenes (excepto el JOVEN 1) y 2/3 Adultos Mayores (excepto A_MAYOR 6) los MFI y porcentajes de NKs de los cultivos del panel **Figura 9C** superaron el nivel de activación que se había obtenido en NKs estimuladas con IL2 + diferentes agonistas de TLR (aNK) (**Figura 9B**). La activación inducida por mDCs fue dependiente del contacto célula - célula, ya que al comparar los valores del MFI y porcentaje del CD69 de iNKs cultivadas directamente con las mDC (**Figura 9C**) con las iNKs cultivadas en Transwell (**Figura 9D**), se observó que el nivel de activación de estas NKs disminuyó en todos los individuos.

Finalmente, para determinar si las observaciones de la **Figura 9** eran significativas, se graficaron los resultados de los ocho cultivos. Las comparaciones hechas en estos ocho cultivos solo se hicieron en dos de los jóvenes (JOVEN 5 y 6) y dos de los Adultos Mayores (A_MAYOR 5 y 6) y se llevó a cabo con el porcentaje de expresión positiva del marcador CD69 en células NK (**Figura 10**).

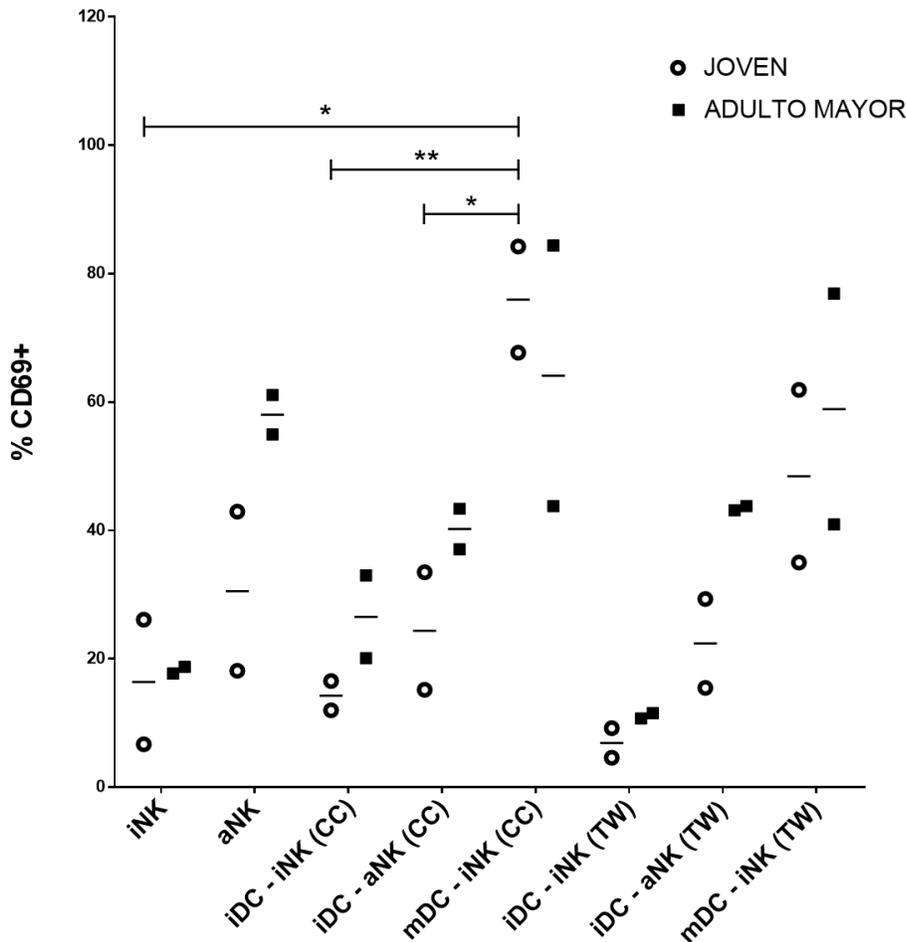


Figura 10. Grado de activación de NKs inducido por DCs. Medición del porcentaje de expresión del CD69 en ocho cultivos con el fin de observar el efecto de las Dendríticas maduras (mDC) o inmaduras (iDC) sobre la activación de NKs inactivas (iNK) o activas (aNK), tanto de Jóvenes (círculos vacíos) como de Adultos Mayores (cuadrados). Se graficaron los valores de dos Jóvenes (JOVEN 5 y 6) y dos Adultos Mayores (A_MAYOR 5 y 6). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Al analizar los cultivos comparados en la **Figura 10**, se observó que las NKs de los Jóvenes que se encontraban inactivas cuando se cultivaron directamente con las dendríticas maduras previamente con el coctel de maduración estas indujeron un grado de activación de estas NKs ya que como se identifica en la **Figura 10**, las NKs de este cultivo mostraban diferencias significativas al compararlas con las iNK, no presentaron diferencias con respecto a las aNKs estimuladas previamente con IL2 + Poly IC + CpG, pero se observa que el grado de activación de estas NKs de los dos Jóvenes superaban este control positivo. El efecto del Transwell no fue tan notorio como en el caso de las dendríticas (**Figura 8**) ya que no se observó ninguna diferencia significativa con estos cultivos (mDC – iNK TW). En los Jóvenes al comparar la activación de las iNKs cocultivadas con las mDCs con las iNKs que fueron cultivadas con unas dendríticas inmaduras (iDC – iNK CC) se detectó que estas NKs no lograron activarse ya que existía una disminución significativa en el porcentaje de expresión de CD69 de estas NKs. Al analizar lo que sucede con los Adultos Mayores se observó que estas NKs se comportaron un poco diferentes a las de los Jóvenes, a pesar de que no se identificaron diferencias significativas entre los cultivos, solo las NKs del cultivo mDC-iNK (CC) de uno de los Adultos Mayores (A_MAYOR 5) lograron mostrar un grado de activación, ya que llegan a superar las aNK, y esto también sucedió en el A_MAYOR 1 como se observó en la **Figura 9**. Un aspecto en común con los Jóvenes fue que el Transwell no influyó significativamente en la activación de las NKs como si sucedía en la maduración de las dendríticas inmaduras (**Figura 7 y 8**).

Finalmente, otro de los factores que podían ocurrir en estos cultivos y una hipótesis que se podría evaluar con el sistema *in vitro* implementado es que es posible evidenciar en los cocultivos la capacidad de células aNK de inducir la muerte de iDCs, aunque esto se evaluó no fue posible evidenciarlo claramente con los experimentos realizados. Sin embargo, se observó que en los Adultos Mayores, las aNKs inducían un ligero incremento en el porcentaje de células Aqua positivas en iDCs que habían sido cocultivadas con aNKs previamente activadas, lo cual podría indicar que las aNKs de los adultos mayores poseen un nivel de reactividad mayor sobre las dendríticas inmaduras (**Figura suplementaria 3C y 4**). Sumado a este resultado, se evaluó el grado de maduración por MFI y porcentaje de expresión positiva de CD80 de estas dendríticas en el cocultivo (iDC – aNK CC) este análisis reveló que tanto en Adultos Mayores como en Jóvenes se observó la tendencia de que el grado de maduración (medido por el grado de expresión de CD80) en las dendríticas no viables (células Aqua positivas) tuvo una tendencia a ser menor que en las células viables (Aqua negativas) (**Figuras suplementarias 3 a 5**).

Discusión

Diversas investigaciones de los últimos años han documentado la importancia de las interacciones célula-célula inmunes como un pilar fundamental de la inmunidad. Las interacciones de células del sistema inmune innato con células del sistema adaptativo son una muestra de ello (Degli-Esposti & Smyth, 2005). Las células del sistema inmune innato han sido cada vez más reconocidas por su importancia en la inmunidad general como primera línea de defensa ante los agentes infecciosos y el cáncer. El presente trabajo se centró en la implementación de un sistema *in-vitro* que permita estudiar aspectos fenotípicos y funcionales de dos importantes células del sistema inmune innato: DCs y células NKs. Una vez realizados algunos análisis para su detección en distintos tipos de muestra, se implementó un sistema *in vitro* de cocultivo que permite evaluar algunos aspectos funcionales en estas dos células probablemente importantes para la generación de inmunidad (Lion, Smits, Berneman, & Van Tendeloo, 2012).

Para el análisis fenotípico de células NK y monocitos (células precursoras de DCs de origen mieloide), con frecuencia se han utilizado células mononucleares de sangre periférica crio preservadas (PBMC) y menos frecuentemente sangre total (Fogel, Yokoyama, & French, 2013). Con el uso de muestras crio preservadas se ha informado que la manipulación y la descongelación de células pueden alterar el fenotipo (poblaciones celulares) y la función celular (Tai et al., 2018). Por el contrario, el uso de Sangre total permite garantizar resultados biológicamente más reales producto del análisis *ex vivo* de células que no han sufrido ningún tipo de manipulación. En este trabajo se analizaron células NK y monocitos en muestras de Sangre total y PBMCs recién purificados, se comparó el rendimiento de células totales, y en el caso de NKs, la expresión de diversos receptores característicos de subpoblaciones de NKs. El uso de Sangre total resultó ser útil para estudiar simultáneamente las NKs y los monocitos; la rapidez del procesamiento y el bajo volumen de muestra (200µL por muestra) son dos importantes ventajas, sin embargo la presencia de granulocitos y otros elementos de la sangre (detritos de eritrocitos y plaquetas) dificultaron en algunos individuos la identificación de linfocitos y monocitos delimitados con el uso de los parámetros SSC y FSC. En contraste, el uso de PBMCs facilitó la delimitación de estas células. Para el análisis de las células de interés es de gran importancia disponer de un panel de anticuerpos necesarios para precisar las células de interés. Marcadores como CD14, CD16, CD3 y CD56 permitieron corroborar que las poblaciones seleccionadas por SSC y FSC eran las correctas. En próximos experimentos para el análisis de las NKs es recomendable el uso de anti-CD19 con el fin de verificar que en las células seleccionadas como CD3- CD16- CD56- en su mayoría correspondan a Linfocitos B.

Para analizar y comparar las proporciones de células totales y subpoblaciones de NKs además de Sangre y PBMCs se estudiaron NKs purificadas y crio-preservadas lo que permitió visualizar variaciones atribuibles al proceso de purificación y crio-preservación de NKs y el efecto de su cultivo en presencia de IL2. Para tener un análisis más cercano es recomendable hacer estos estudios partiendo de NKs recién purificadas no crio-preservadas y comprarlas con las NKs descongeladas. Como se observó en la **Figura 1 y suplementaria 1**, la distribución de las subpoblaciones de NKs fue altamente variable entre Sangre y PBMCs en la mayoría de los individuos. En el caso

de PBMCs en algunos individuos se observó la ausencia de algunas poblaciones de NKs lo cual puede ser atribuido al aislamiento por Ficoll o al limitado título de anticuerpos o número de células necesarias para su identificación, lo cual puede ser resuelto con la titulación previa de estos dos parámetros. Para analizar las distintas subpoblaciones de NKs es deseable utilizar un kit de purificación de estas células, sin embargo, es necesario tener registro del análisis *ex vivo* lo cual permite establecer la línea base. Nosotros utilizamos un estuche comercial para la selección positiva de células CD56+, sin embargo, esto impide en las células purificadas el análisis de las células CD56- CD16+ (R2) una población importante por sus funciones efectoras citotóxicas. De otra parte, los resultados nos permiten concluir que el rendimiento del kit no fue del 100% ya que en células purificadas se identificó una población CD3+ y una subpoblación de NKs CD56- CD16+ en varios individuos (**Figura 1**). Entre Jóvenes y Adultos Mayores solo se detectó un incremento significativo en Sangre pero no en PBMCs de la subpoblación de NKs CD56 *dim* CD16+ en los Jóvenes (**Figura 2**), una subpoblación que se caracteriza por ser la más abundantes en sangre periférica (~90%), considerada como el subconjunto maduro y citotóxico natural por su alta expresión de CD16, alta densidad y expresión constitutiva de gránulos citolíticos, con una menor capacidad de secreción de citoquinas en comparación con las células CD56 *bright* (Freud & Caligiuri, 2006). En los Adultos Mayores la subpoblación CD56 *dim* CD16+ se encontró significativamente incrementada comparada con las otras subpoblaciones, lo cual es acorde con lo descrito en la literatura en relación con la expansión de las células CD56 *dim* y disminución de las CD56 *bright* (Campos et al., 2015), asociado a la edad.

El análisis de monocitos en los Adultos Mayores (1-4) reveló una tendencia al incremento de la subpoblación de los monocitos no clásicos (CD14+ CD16++) considerados proinflamatorios por su alta producción de TNF α en respuesta a estímulos TLR2 y TLR4 (Nyugen, Agrawal, Gollapudi, & Gupta, 2010) (Verschoor et al., 2014) (**Tabla 4**) (**Figura 5**). El aumento de monocitos clásicos en el adulto mayor con respecto a los jóvenes (**Figura 5**) debe ser tenido en cuenta en los protocolos de inmunoterapia en que se utilizan monocitos de sangre periférica para la obtención de DCs con fines de inmunoterapia. Dada su abundancia se recomienda que se evalúe la respuesta de esta subpoblación a las citoquinas GM-CSF e IL-4 y a los cocteles de maduración utilizados para derivar y madurar DCs a partir de monocitos de sangre que van a ser utilizadas en vacunas terapéuticas contra el cáncer.

Para el estudio de las NKs también se incluyeron varios receptores de activación importantes para el reconocimiento de diferentes ligandos sobreexpresados en células tumorales o células infectadas por virus (células deficientes en HLA). En cuanto a los receptores de citotoxicidad natural (NCR), Nkp30 en general se expresó en mayor proporción en las cuatro subpoblaciones de los Adultos Mayores pero no mostró diferencias significativas con respecto a los Jóvenes; otro de los receptores de superficie que desempeña una función crucial en la lisis de células tumorales como melanoma, al ser específico para las proteínas de unión MICA / B o UL16 inducibles por estrés (ULBP) es el NKG2D (Lakshmikanth et al., 2009) (Raulet, 2003), según la literatura en los Adultos Mayores la expresión de este receptor se conserva (Almeida-Oliveira et al., 2011). Los resultados de nuestro estudio no evidenciaron diferencias significativas de expresión de este marcador entre Jóvenes y Adultos Mayores; al analizar

los resultados registrados en las **Tablas 2 y 3**, las diferencias significativas entre subpoblaciones de NKs se encontraron en Adultos Mayores en que la expresión de NKG2D en la subpoblación CD56- CD16+ disminuyó significativamente lo cual está acorde con lo descrito en la literatura en que se describe que esta subpoblación de NKs (CD56-CD16+) expresa altos niveles de receptores inhibitorios y un bajo nivel de NCR o NKG2D en comparación con las células CD56+ CD16+. Consideramos importante estudiar la representatividad de esta subpoblación en Adultos Mayores porque ya que esta se ha descrito como una subpoblación de células disfuncionales con baja capacidad de replicación y citotóxica caracterizada por una reducida producción de citocinas y además porque ha sido asociada a la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) (Gonzalez et al., 2009)

Otro de los receptores incluidos en el análisis fenotípico de este estudio fue el DNAM-1 un receptor que puede ser inducido por estrés celular con capacidad de favorecer la eliminación de células de melanoma (Lakshmikanth et al., 2009), ya que este tumor expresa CD155 (un ligando de DNAM-1) (Bevelacqua et al., 2012). A pesar de que en algunos artículos se ha reportado que la expresión de este receptor disminuye en los Adultos Mayores (Solana et al., 2012a), en nuestro estudio se encontró que la expresión de este receptor incremento significativamente en la subpoblación CD56 *bright* CD16- de Adultos Mayores comparado con los Jóvenes y su expresión fue menor en la subpoblación CD56- CD16+ (**Tabla 2 y 3**).

Además de los receptores activadores se incluyeron receptores inhibitorios que son puntos de control inmunitarios como CTLA4, TIM3 y LAG3 que participan en la inducción de tolerancia y el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria (Anderson, Joller, & Kuchroo, 2016). A pesar de que las subpoblaciones de NKs de los Adultos Mayores expresaran una mayor proporción de TIM3, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los Jóvenes, se decidió tener en cuenta este receptor por lo que juega un papel clave en la inhibición de respuestas como la Th1 y es regulador de la expresión de citoquinas como TNF e IFN gamma; también se ha asociado con el agotamiento de células T, supresión de las respuestas inmunes innatas, y cuya desregulación se ha relacionado con enfermedades autoinmunes (Das, Zhu, & Kuchroo, 2017), por lo anterior, es de gran importancia incluir este marcador en este tipo de análisis con el fin de evaluar cómo se encuentran las NKs de Adultos Mayores y Jóvenes en termino de agotamiento. LAG3 y CTLA4 fueron marcadores los cuales variaron considerablemente en los dos tipos de análisis *ex vivo* (**Tabla 2 y 3**). Consideramos interesante incluir en futuros estudios otros receptores inhibidores como KIR y CD94 que le permiten a las NKs discriminar células normales que expresan altos niveles de MHC-clase I+ (Moretta et al., 2006). La inclusión de estos marcadores en la tinción de NKs luego de los cocultivo con DCs quizás permitan establecer una mejor correlación entre células NKs activadas y su capacidad citotóxica frente a DCs.

Con el fin de evaluar la senescencia y el grado de maduración de las subpoblaciones de NKs en Adultos Mayores y Jóvenes, en este estudio se incluyó el CD57 y lo encontrado se relacionó en parte con lo documentado en la literatura en la cual se describe que este se expresa predominantemente en la superficie de subpoblaciones CD56

dim considerado el fenotipo maduro y estas células CD57+ poseen una mayor capacidad citotóxica, una mayor sensibilidad a la estimulación a través de CD16, pero producen niveles más bajos de IFN gamma, tienen una menor respuesta a las citocinas y una menor capacidad para proliferar en comparación con las subpoblaciones CD57- (Manser & Uhrberg, 2016)(Solana et al., 2012a)(Hazeldine, Hampson, & Lord, 2012)(Lopez-Vergès et al., 2010). En este estudio se encontró que tanto en los Adultos Mayores como en los Jóvenes este marcador se expresaba en mayor medida en las subpoblaciones CD56- CD16+ y CD56 *dim* CD16+ (**Tabla 2 y 3**). Finalmente, para detectar la activación de las células NK se incluyó el marcador CD69 ya que se ha descrito que es una proteína que se expresa poco después de la activación en los linfocitos T y células asesinas naturales (NK) (Le Garff-Tavernier et al., 2010). No se encontraron diferencias significativas entre Jóvenes y Adultos Mayores y estos valores se tuvieron en cuenta como línea base para los próximos experimentos en los que las NKs se iban a someter a diversos estímulos (**Tabla 2 y 3**).

El uso de agonistas de TLR permitió evaluar la expresión de CD69 como marcador de activación temprana de NKs. Los resultados demostraron que las células NK son capaces de responder a diversos estímulos que actúan sobre diferentes TLR, en este estudio el TLR3 (Poly IC) y TLR9 (CpG), ya que al estimular las NKs tanto de Jóvenes como de Adultos Mayores por 48h con combinaciones de estos estímulos fue posible inducir su activación evaluada a través de la expresión de CD69. Se observó que las NKs de los Jóvenes se estimularon de forma más controlada, ya que al evaluar la estadística se identificó que se logró la activación de estas células al ser estimuladas específicamente con IL2 y Poly IC, también se identificó una pequeña activación inducida por la combinación IL2 y CpG pero no fue tan significativa como con el Poly IC (**Figura 4**). En el caso de los Adultos Mayores, estas NKs presentaron una mayor reactividad frente a todas las combinaciones de estímulos, ya que se evidenció una activación significativa al evaluar las tres combinaciones de estímulos, por ende, en este estudio no se identificaron alteración a nivel de la activación de las NKs de Adultos Mayores mediadas por TLRs (**Figura 4**).

Los receptores tipo Toll (TLR) hacen parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y también son cruciales en la inducción de la maduración de las DC y permiten constituir un vínculo funcional importante entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Liu, 2001). A partir de este principio, en este sistema *in-vitro* se indujo la maduración de iDCs mediante la estimulación con una citoquina (interferones tipo II: IFN gamma) y un agonista de TLR (LPS). En nuestros ensayos perseguimos evaluar la influencia de la edad en la capacidad de maduración de iDCs ante los estímulos, ya que estudios han reportado alteraciones en las DC durante el envejecimiento asociados con la función de TLRs, la disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras y deficiencia en la producción de IL-12 (Della Bella et al., 2007). Este efecto se visualizó teniendo en cuenta el porcentaje de expresión positiva de la molécula coestimuladora CD80 que es regulada al alza en mDCs. Entre Jóvenes y Adultos Mayores solo se observó una reducción significativa en la proporción de expresión positiva de CD80 de las iDCs de los Adultos Mayores, esto podría sugerir que estas dendríticas tenían una deficiencia mayor de expresión de moléculas coestimuladoras comparadas con las de los Jóvenes (**Figura 6**). Sin embargo, al evaluar las dendríticas maduras se encontró que tanto las de los Adultos como las de los Jóvenes respondieron

correctamente al estímulo del coctel de maduración ya que no se identificaron diferencias significativas entre las mDC asociadas a la edad y en ambos hubo un incremento significativo en la expresión de CD80 al compararlas con sus iDCs (**Figura 6**).

En este estudio, para entender más sobre el sistema inmune innato fue importante estudiar la interacción que existe entre las NK y las DC, ya que esta interacción cooperativa desempeña un papel clave en el desarrollo de respuestas inmunes eficientes contra patógenos y de respuestas antitumorales efectivas (Ferlazzo & Morandi, 2014). El análisis se llevó a cabo partiendo de las hipótesis de que una NK activada podía llegar a estimular una dendrítica inmadura o madura y de forma contraria se buscaba demostrar si una dendrítica madurada con el coctel podía llegar a estimular y activar una NK inactiva.

Además del uso del coctel para madurar las dendríticas inmaduras de los Jóvenes y Adultos Mayores, al querer conocer más sobre la interacción entre dendríticas y NKs, se exploró la posibilidad de inducir ahora esta maduración de iDCs cultivándolas con NKs previamente estimuladas con IL2 y agonistas de TLR. Con el fin de tener controlada las proporciones de NK : DC que se utilizarían en los cultivos, teniendo en cuenta algunos estudios previos, se manejaron relaciones bajas de NKs (1 : 5) (Piccioli et al., 2002). También se tuvo cuidado de lavar muy bien las células antes de realizar los cultivos con el fin de evitar que IL2 y los agonistas de TLR utilizados para la activación previa de NKs fueran los que estimularan las dendríticas inmaduras y no las NKs. Tanto el contacto célula – célula como la edad fueron dos factores que en este estudio alteraron la interacción entre estas dos células; en los Jóvenes se observó la inducción de la maduración de las iDCs cuando se cultivaron junto con las NKs activadas y esta maduración disminuyó al cultivar las células separadas (TW). Al evaluar estos cultivos en los Adultos Mayores, la inducción de la maduración de las iDCs por las aNKs fue menor que el detectado en los Jóvenes y al utilizar el sistema Transwell se observó también una disminución (**Figuras 7 y 8**). Luego de la estimulación de NKs con interleucinas y agonistas de TLR, se ha informado que estas NKs activadas tienen la capacidad de liberar grandes cantidades de citocinas como Interferón gamma (IFN- γ), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y quimiocinas (CCL3, CCL4 y CCL5) (Piccioli et al., 2002). Por ende, la secreción por parte de las aNKs de TNF- α en los cultivos mejora la expresión de moléculas coestimuladoras en las dendríticas y junto con el IFN- γ al inducir la regulación positiva de la expresión de TLRs en estas iDCs, contribuye a la producción de IL-12 por parte de las dendríticas, también las iNKs al solo ser estimuladas con IL2 probablemente están induciendo la liberación de IFN- γ favoreciendo el incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80) en las mDCs (Warfield et al., 2004); para verificar la contribución de estas citocinas para la maduración de las iDCs se pretendía incluir en el protocolo la realización de CBA y ELISA para la cuantificación de citoquinas en estos cultivos, y por esta razón se colectaron los sobrenadantes de los cultivos al momento de colectar las células. Los resultados de estas mediciones están pendientes de ser procesados.

Asimismo, analizando los resultados, este proceso parece requerir de la interacción física entre los dos tipos de células, lo cual podría estar ligado al hecho reportado de que la maduración de iDCs por parte de células NK induce la activación del receptor NKp30 a través del reconocimiento de un ligando desconocido expresado en las dendríticas, favoreciendo la liberación de IFN- γ y TNF- α (Vitale et al., 2005). Si bien, la expresión de este marcador en células NK fue medido, hasta ahora en los análisis realizados, no hemos podido evidenciar una expresión diferencial de este marcador entre las NK rescatados de los diferentes cocultivos (datos no mostrados). En cuanto al aspecto de la edad, en estudios previos se ha demostrado en donantes de edad avanzada la disminución de la expresión del receptor activador NKp30 (Le Garff-Tavernier et al., 2010) y una producción reducida de IFN- γ por NKs activadas (Hazeldine & Lord, 2013), por lo anterior, en este resultado posiblemente las aNKs de los Adultos Mayores no están induciendo de forma notoria la maduración de las iDCs por falta de expresión del NKp30 o reducción de la secreción de IFN- γ en estos cultivos. Además, sería interesante en próximos experimentos evaluar el nivel de expresión de otros receptores inhibidores de NKs como los KIR y el CD94/NKG2A ya que estos también pueden estar modulando esta cooperación bidireccional entre estas dos células.

Otra de las observaciones importantes de estos experimentos fue que en los Jóvenes las NKs así estuvieran inactivas lograron estimular las mDCs ya que se detectó un incremento significativo del MFI de CD80 al comparlas con el MFI de las mDC maduras con el coctel (**Figura 8**), este hecho también se vio alterado por la edad y el contacto célula-célula, ya que en los Adultos Mayores no se observó este mismo incremento y en el Joven al evaluar este mismo cultivo pero en Transwell, se disminuyó significativamente esta maduración. Además de lo mencionado anteriormente, la posible explicación a la cual se le atribuye este incremento del MFI de CD80 inducido por las iNKs en los Jóvenes se relacionó con la segunda hipótesis de esta sección en la cual se buscaba comprobar si al cultivar una iNK con una mDC se inducía su activación. Al igual que en NKs, al estimular inicialmente las iDCs con ligandos de TLR y citocinas, en este caso LPS e IFN gamma para inducir su maduración, estas dendríticas probablemente se convierten en una fuente de una variedad de citocinas como IL12, IL18, IL15 e interferones de tipo I (IFN- α / β), las cuales pueden llegar a modular el comportamiento funcional de células NK cocultivadas con estas dendríticas (Iwasaki & Medzhitov, 2004). La interacción de estas dos células es mediada probablemente por lo que se conoce como sinapsis inmunológica que implica el reordenamiento del citoesqueleto y movilización de balsas lipídicas en las dendríticas (Borg et al., 2004); esta sinapsis favorece la secreción de IL-12 por las DCs hacia las NKs. Varios estudios *in-vitro* han demostrado que la IL-12 y la IL-18 (citocinas tipo Th1), son cruciales para la inducción de la liberación de IFN- γ por parte de las células NK (Ferlazzo et al., 2004), y además promueven la citotoxicidad celular mediada por perforina en estas células (Mahmood et al., 2015). Se enfatiza en la importancia del contacto célula – célula ya que la interacción de CX3CL1 expresada en las DCs con el CX3CR1 de las células NK promueve también liberación de IFN- γ por las NKs (Pallandre et al., 2008). Otra citocina relevante para el desarrollo y las funciones de las NK es la IL-15 transpresentada por el IL15R alfa en dendríticas maduras la cual estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de NKs de CD56

bright CD16⁻ a CD56 *dim* CD16⁺ (Brilot, Strowig, Roberts, Arrey, & Münz, 2007) y también la interacción entre CD40 (DCs) y CD40L (NKs), así como moléculas B7 en DCs con CD28 en NKs resultan ser importantes en este contacto (Mahmood et al., 2015). Por lo anterior, al analizar el grado de activación de las iNKs co-cultivadas con mDCs en términos de la expresión de CD69+, el beneficio de ambas células al estar en contacto célula – célula, se evidenció al encontrarse que las mDCs del Joven indujeron la activación de las iNKs (**Figura 9 y 10**) y estas beneficiaron al mismo tiempo a las dendríticas maduras evidenciado en el incremento del MFI de CD80 (**Figura 8**). Al evaluar si la edad también influía en la activación de estas iNKs por el contacto con mDCs el resultado no fue tan claro ya que solo en uno de los adultos se observó incremento en el CD69 (**Figura 9 y 10**). Con base en estos resultados se puede deducir que las mDC de los adultos mayores pueden estar presentando alguna alteración en la producción de las citocinas mencionadas anteriormente ya que algunos estudios reportan cambios funcionales de las DC con el envejecimiento demostrando que con la edad se altera la expresión de moléculas coestimuladoras, sus funciones básicas como endocitosis, quimiotaxis, una disminución de la producción de IL-12 y una capacidad disminuida para inducir la proliferación y activación de células T (Della Bella et al., 2007).

Finalmente, otro de los sucesos que puede ocurrir durante la interacción entre NKs y DCs es la muerte de iDCs mediada por células aNK. Se ha documentado que células NK activadas son capaces de presentar una potente actividad citolítica contra iDCs, lo cual se ha asociado a que el receptor activador NKp30 además de participar en la maduración de DCs puede llegar a inducir la muerte directa de iDCs (Ferlazzo et al., 2002). Asimismo, este proceso se modula por el nivel de expresión de la molécula de histocompatibilidad del antígeno leucocitario E (HLA-E) en la superficie celular (Della Chiesa et al., 2003) y dado que la expresión de esta molécula se encuentra regulada negativamente en iDC esto las hace más susceptibles ante la lisis por NKs activadas y es por ello que se ha descrito que las mDC resultan ser más resistentes frente a la lisis porque en el momento de la maduración se da la regulación positiva de expresión en la superficie de estas moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), las cuales funcionan como ligandos de receptores inhibitorios de células NK (CD94 / NKG2 y KIR) (Della Chiesa et al., 2003). En este estudio, la posible destrucción de iDCs inducida por aNKs se pudo observar en los Adultos Mayores más que en los Jóvenes, al detectarse un ligero incremento en el porcentaje de las dendríticas Aqua+ de estas iDCs cocultivadas directamente con aNKs (**Figura suplementaria 3C, 4 y 5**), lo cual podría estar sugiriendo que dado que en Adultos Mayores no se evidenció una maduración clara inducida por las aNKs de estos individuos, estas iDCs con una expresión negativa de moléculas clase I del MHC quizás haya favorecido que estas fueran más susceptibles a la lisis. También se ha descrito que las células NK de individuos de edad avanzada se han caracterizado por la expresión negativa de CD94/NKG2A cuyo ligando es el HLA-E (Lutz, Moore, Bradley, Shelton, & Lutgendorf, 2005) (Han et al., 2018), por ende, sería interesante evaluar cómo se encuentra la expresión de estos receptores inhibitorios de NKs, ya que, si estas NKs de Adultos Mayores presentaran una expresión a la baja de estos receptores, estas iDCs serían más susceptibles a la lisis por aNKs.

Conclusiones

El estudio fenotípico y funcional de las células NK y DC es importante porque estas dos células contribuyen a modular respuestas inmunitarias adaptativas responsables de la vigilancia inmunológica, del control del cáncer y de las infecciones. Por lo anterior es importante comprender aspectos que regulan su interacción, caracterizar subpoblaciones celulares y citocinas secretadas producto de la activación de receptores activadores e inhibitorios expresados sobre la superficie de estas dos células que puedan modular su interacción, importantes para la inducción de respuestas inmunes eficaces y diseño de nuevos enfoques terapéuticos. El sistema *in vitro* propuesto en este trabajo nos permitió examinar aspectos que modulan la interacción bidireccional de estas dos células. Nuestros resultados sugieren que NKs activadas por agonistas de TLRs tienen la capacidad de inducir la maduración de DCs y a su vez que DCs maduras tienen la capacidad de activar NKs inactivas. De manera interesante al parecer esta cooperatividad es dependiente de la interacción célula-célula y disminuye con la edad. La cuantificación de las citoquinas de los sobrenadantes crio-preservados de los distintos cocultivos y la caracterización del nivel de expresión diferencial de los receptores analizados en las diferentes condiciones de cultivos brindará información complementaria a los resultados reportados en este trabajo.

Finalmente, dada la complejidad y diversidad de funciones de estas dos células, el comprender el diálogo entre estas dos células representativas de la inmunidad innata va a contribuir a una mejor comprensión del papel de estas dos células en la inmunidad antitumoral y el control de agentes infecciosos.

Agradecimientos

Agradezco en primero lugar a Dios por haberme brindado fuerza en los momentos difíciles de este proceso, a la Pontificia Universidad Javeriana, a mis profesores y compañeros por darme las bases académicas y profesionales para llegar hasta aquí. Al grupo de investigación de Inmunología y Medicina Traslacional del Dr. Carlos Parra por su apoyo financiero de este trabajo. A los profesores Susana Fiorentino, Carlos Parra y a Manuel Alfonso Patarroyo por su colaboración, guía y apoyo durante el proceso de revisión de este trabajo. A mis compañeros de laboratorio Julian Chamucero, David Bernal, Nicolas Lalinde y a los demás miembros del laboratorio por su compañía y apoyo en este trabajo. Al Instituto IDC BIS por facilitar las muestras de Sangre utilizadas, a Ricardo Gonzalez por su apoyo en la colección y transporte de las muestras de sangre, y por último pero no menos importante, a mi familia y amigos por su apoyo incondicional en estos años.

Bibliografía

- Agrawal, A., Agrawal, S., Tay, J., & Gupta, S. (2008). Biology of dendritic cells in aging. *Journal of Clinical Immunology*, 28(1), 14–20. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9127-6>
- Almeida-Oliveira, A., Smith-Carvalho, M., Porto, L. C., Cardoso-Oliveira, J., Ribeiro, A. dos S., Falcão, R. R., ... Diamond, H. R. (2011). Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Human Immunology*, 72(4), 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.01.009>
- Anderson, A. C., Joller, N., & Kuchroo, V. K. (2016, May 17). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, Vol. 44, pp. 989–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
- Bevelacqua, V., Bevelacqua, Y., Candido, S., Skarmoutsou, E., Amoroso, A., Guarneri, C., ... Malaponte, G. (2012). Nectin like -5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma. *Oncotarget*, 3(8), 882–892. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.594>
- Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., ... Zitvogel, L. (2004). NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood*, 104(10), 3267–3275. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0380>
- Brilot, F., Strowig, T., Roberts, S. M., Arrey, F., & Münz, C. (2007). NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15R α . *Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3316–3329. <https://doi.org/10.1172/JCI31751>
- Camous, X., Pera, A., Solana, R., & Larbi, A. (2012). NK cells in healthy aging and age-associated diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/195956>
- Campos, C., López, N., Pera, A., Gordillo, J. J., Hassouneh, F., Tarazona, R., & Solana, R. (2015). Expression of Nkp30, Nkp46 and DNAM-1 activating receptors on resting and IL-2 activated NK cells from healthy donors according to CMV-serostatus and age. *Biogerontology*, 16(5), 671–683. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9581-0>
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., & Lanzavecchia, A. (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *Journal of Experimental Medicine*, 189(5), 821–829. <https://doi.org/10.1084/jem.189.5.821>

- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chester, C., Fritsch, K., & Kohrt, H. E. (2015, December 2). Natural killer cell immunomodulation: Targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, Vol. 6, p. 601. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00601>
- Das, M., Zhu, C., & Kuchroo, V. K. (2017, March 1). Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunological Reviews*, Vol. 276, pp. 97–111. <https://doi.org/10.1111/imr.12520>
- Degli-Esposti, M. A., & Smyth, M. J. (2005, February). Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 5, pp. 112–124. <https://doi.org/10.1038/nri1549>
- Della Bella, S., Bierti, L., Presicce, P., Arienti, R., Valenti, M., Saresella, M., ... Villa, M. L. (2007). Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clinical Immunology*, 122(2), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.09.012>
- Della Chiesa, M., Vitale, M., Carlomagno, S., Ferlazzo, G., Moretta, L., & Moretta, A. (2003). The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *European Journal of Immunology*, 33(6), 1657–1666. <https://doi.org/10.1002/eji.200323986>
- Ferlazzo, G., & Morandi, B. (2014). Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, 5(APR), 159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00159>
- Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., ... Münz, C. (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47), 16606–16611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407522101>
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., & Münz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195(3), 343–351. <https://doi.org/10.1084/jem.20011149>
- Fogel, L. A., Yokoyama, W. M., & French, A. R. (2013, July 11). Natural killer cells in human

autoimmune disorders. *Arthritis Research and Therapy*, Vol. 15, pp. 1–9.

<https://doi.org/10.1186/ar4232>

Freud, A. G., & Caligiuri, M. A. (2006, December 1). Human natural killer cell development.

Immunological Reviews, Vol. 214, pp. 56–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x>

Gayoso, I., Sanchez-Correa, B., Campos, C., Alonso, C., Pera, A., Casado, J. G., ... Solana, R. (2011).

Immunosenescence of Human Natural Killer Cells. *Journal of Innate Immunity*, 3(4), 337–343.

<https://doi.org/10.1159/000328005>

Gonzalez, V. D., Falconer, K., Björkström, N. K., Blom, K. G., Weiland, O., Ljunggren, H.-G., ...

Sandberg, J. K. (2009). Expansion of Functionally Skewed CD56-Negative NK Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection: Correlation with Outcome of Pegylated IFN- α and Ribavirin

Treatment. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6612–6618.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901437>

Grolleau-Julius, A., Abernathy, L., Harning, E., & Yung, R. L. (2009). Mechanisms of murine

dendritic cell antitumor dysfunction in aging. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(12), 1935–

1939. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0636-9>

Han, B., Mao, F. Y., Zhao, Y. L., Lv, Y. P., Teng, Y. S., Duan, M., ... Peng, L. S. (2018). Altered

NKp30, NKp46, NKG2D, and DNAM-1 Expression on Circulating NK Cells Is Associated with Tumor Progression in Human Gastric Cancer. *Journal of Immunology Research*, 2018.

<https://doi.org/10.1155/2018/6248590>

Hazeldine, J., Hampson, P., & Lord, J. M. (2012). Reduced release and binding of perforin at the

immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging*

Cell, 11(5), 751–759. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00839.x>

Hazeldine, J., & Lord, J. M. (2013, September 1). The impact of ageing on natural killer cell function

and potential consequences for health in older adults. *Ageing Research Reviews*, Vol. 12, pp.

1069–1078. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.04.003>

Hespe, C., & Moser, M. (2012). Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity.

European Journal of Immunology, 42(10), 2535–2543. <https://doi.org/10.1002/eji.201242480>

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004, October). Toll-like receptor control of the adaptive immune

responses. *Nature Immunology*, Vol. 5, pp. 987–995. <https://doi.org/10.1038/ni1112>

- Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T. H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., ... Colucci, F. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(5), 1251–1263. <https://doi.org/10.1172/JCI36022>
- Le Garff-Tavernier, M., Béziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., ... Vieillard, V. (2010). Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*, *9*(4), 527–535. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x>
- Lion, E., Smits, E. L. J. M., Berneman, Z. N., & Van Tendeloo, V. F. I. (2012). NK Cells: Key to Success of DC-Based Cancer Vaccines? *The Oncologist*, *17*(10), 1256–1270. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0122>
- Liu, Y. J. (2001, August 10). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*, Vol. 106, pp. 259–262. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00456-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00456-1)
- Lopez-Vergès, S., Milush, J. M., Pandey, S., York, V. A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., ... Lanier, L. L. (2010). CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*, *116*(19), 3865–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-282301>
- Lutz, C. T., Moore, M. B., Bradley, S., Shelton, B. J., & Lutgendorf, S. K. (2005). Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mechanisms of Ageing and Development*, *126*(6–7), 722–731. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.01.004>
- Mahmood, S., Upreti, D., Sow, I., Amari, A., Nandagopal, S., & Kung, S. K. P. (2015, March 1). Bidirectional interactions of NK cells and dendritic cells in immunotherapy: Current and future perspective. *Immunotherapy*, Vol. 7, pp. 301–308. <https://doi.org/10.2217/imt.14.122>
- Manser, A. R., & Uhrberg, M. (2016). Age-related changes in natural killer cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *65*(4), 417–426. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1750-0>
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M. C., & Moretta, A. (2006, June 1). Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Seminars in Immunology*, Vol. 18, pp. 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.03.002>
- Morice, W. G. (2007). The Immunophenotypic Attributes of NK Cells and NK-Cell Lineage

Lymphoproliferative Disorders. *American Journal of Clinical Pathology*, 127(6), 881–886.
<https://doi.org/10.1309/Q49CRJ030L22MHLF>

Nikolich-Žugich, J. (2018). The twilight of immunity: Emerging concepts in aging of the immune system review-article. *Nature Immunology*, 19(1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x>

Nyugen, J., Agrawal, S., Gollapudi, S., & Gupta, S. (2010). Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. *Journal of Clinical Immunology*, 30(6), 806–813.
<https://doi.org/10.1007/s10875-010-9448-8>

Pallandre, J. R., Krzewski, K., Bedel, R., Ryffel, B., Caignard, A., Rohrlich, P. S., ... Borg, C. (2008). Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: A pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood*, 112(12), 4420–4424. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-126888>

Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., & Valiante, N. M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195(3), 335–341. <https://doi.org/10.1084/jem.20010934>

Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 3, pp. 781–790. <https://doi.org/10.1038/nri1199>

Romagnani, C., Della Chiesa, M., Kohler, S., Moewes, B., Radbruch, A., Moretta, L., ... Thiel, A. (2005). Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *European Journal of Immunology*, 35(8), 2452–2458. <https://doi.org/10.1002/eji.200526069>

Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D., & Bethunaickan, R. (2018, July 30). Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Frontiers in Immunology*, Vol. 9, p. 1726. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01726>

Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., & Moretta, A. (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 10116–10121.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403744101>

- Solana, R., Tarazona, R., Gayoso, I., Lesur, O., Dupuis, G., & Fulop, T. (2012a, October). Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Seminars in Immunology*, Vol. 24, pp. 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.008>
- Solana, R., Tarazona, R., Gayoso, I., Lesur, O., Dupuis, G., & Fulop, T. (2012b, October 1). Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Seminars in Immunology*, Vol. 24, pp. 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.008>
- Tai, L. H., Alkayyal, A. A., Leslie, A. L., Sahi, S., Bennett, S., Tanese de Souza, C., ... Auer, R. C. (2018). Phosphodiesterase-5 inhibition reduces postoperative metastatic disease by targeting surgery-induced myeloid derived suppressor cell-dependent inhibition of Natural Killer cell cytotoxicity. *OncImmunity*, 7(6), e1431082. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1431082>
- Tarazona, R., Campos, C., Pera, A., Sanchez-Correa, B., & Solana, R. (2015). Flow cytometry analysis of NK cell phenotype and function in aging. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1343, pp. 9–18). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_2
- Tarazona, R., Sanchez-Correa, B., Casas-Avilés, I., Campos, C., Pera, A., Morgado, S., ... Solana, R. (2017, February 1). Immunosenescence: limitations of natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, Vol. 66, pp. 233–245. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1882-x>
- Ventura, M. T., Casciaro, M., Gangemi, S., & Buquicchio, R. (2017). Immunosenescence in aging: Between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clinical and Molecular Allergy*, Vol. 15, p. 21. <https://doi.org/10.1186/s12948-017-0077-0>
- Verschuur, C. P., Johnstone, J., Millar, J., Parsons, R., Lelic, A., Loeb, M., ... Bowdish, D. M. E. (2014). Alterations to the Frequency and Function of Peripheral Blood Monocytes and Associations with Chronic Disease in the Advanced-Age, Frail Elderly. *PLoS ONE*, 9(8), e104522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104522>
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., & Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*, 106(2), 566–571. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4035>
- Warfield, K. L., Perkins, J. G., Swenson, D. L., Deal, E. M., Bosio, C. M., Aman, M. J., ... Bavari, S.

(2004). Role of natural killer cells innate protection against lethal Ebola virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 200(2), 169–179. <https://doi.org/10.1084/jem.20032141>

Figuras suplementarias.

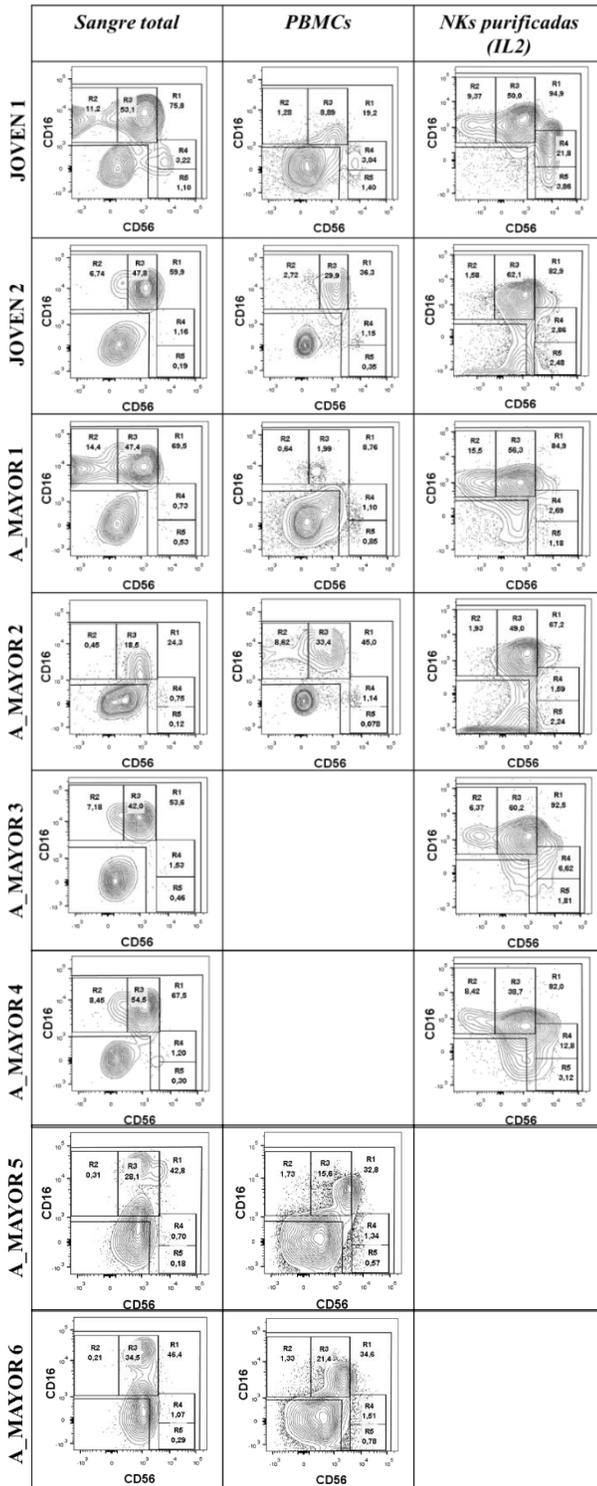


Figura suplementaria 1. Subconjuntos de células NK analizados por citometría de flujo de Jóvenes y Adultos Mayores Sangre total (A), PBMCs (B) y NKs purificadas mediante selección de células CD56+ cultivadas en IL2 (500U) por 48h luego de su criopreservación de dos jóvenes (JOVEN) y seis adultos mayores (A_MAYOR). Se hizo el análisis de la expresión de CD56 y CD16 para definir las regiones R1 a R5 que representan respectivamente: células NK totales, CD16+ CD56-, CD56 dim CD16+, CD56 bright CD16+ y CD56 bright CD16-; estas regiones fueron determinadas teniendo en cuenta el blanco de cada individuo.

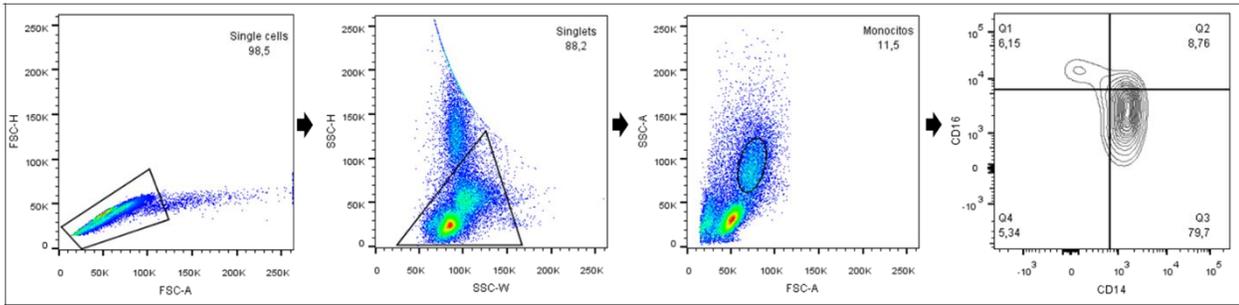


Figura suplementaria 2. Estrategia de análisis por citometría de flujo *ex vivo* de subpoblaciones de monocitos a partir de PBMCs del ADULTO MAYOR 1. Se seleccionaron los monocitos de acuerdo con los parámetros SSC y FSC y se hizo el análisis de la expresión de CD14 y CD16. Los cuadrantes representan monocitos CD14⁺ CD16⁺⁺ (no clásicos) (Q1), CD14⁺⁺ CD16⁺ (intermedios) (Q2) y CD14⁺⁺ CD16⁻ (clásicos) (Q3).

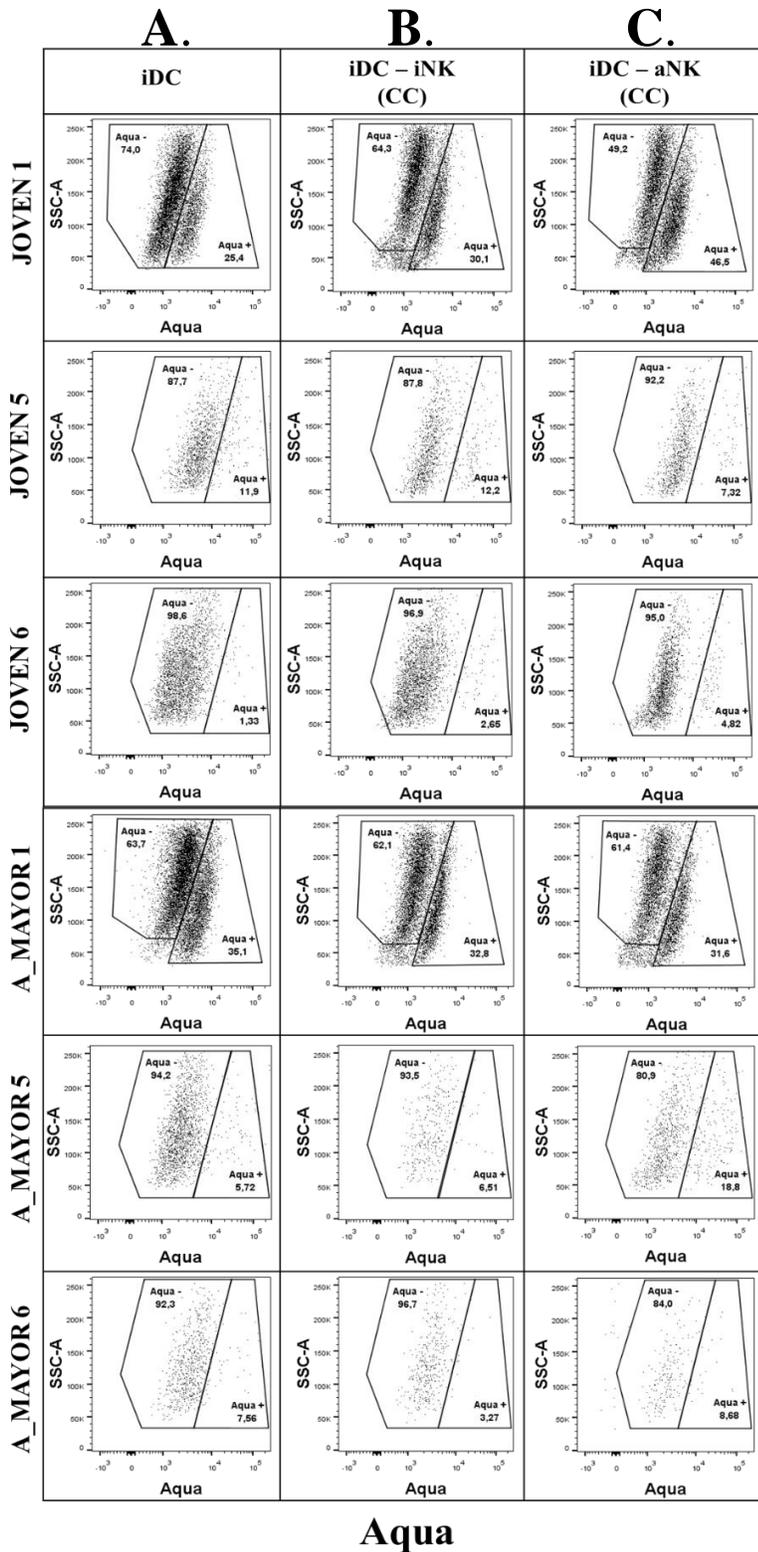


Figura suplementaria 3. Evaluación de la viabilidad de iDCs cultivadas con NKs. Histogramas de la comparación de tres cultivos del sistema *in-vitro* implementado, para la evaluación del porcentaje de viabilidad de dendritas inmaduras (iDC) en términos del porcentaje de Aqua cultivadas directamente con NKs activadas (aNK). Los cultivos comparados de izquierda a derecha son: (A) dendríticas inmaduras (iDC), (B) dendríticas inmaduras cultivadas directamente con NKs inactivas (iDC - iNK en contacto célula - célula CC), (C) dendríticas inmaduras cultivadas directamente con NKs activadas (iDC - aNK en contacto célula - célula CC). Se evaluaron los cultivos de tres Jóvenes (JOVEN 1, 5 y 6) y tres Adultos Mayores (A_MAYOR 1, 5 y 6). Las NKs del JOVEN 1 y el A_MAYOR 1 fueron activadas previamente al ser estimuladas con la combinación IL2 + Poly IC y las NKs de los otros dos jóvenes y adultos mayores fueron activadas con IL2 + POLY IC + CpG. El punto en el que se empezaron a considerar Aqua+ se determinó a partir de los blancos. Se observa que en general el porcentaje de Aqua + de dendríticas inmaduras incrementa al ser cultivadas con aNKs (C) y no con las iNKs (B).

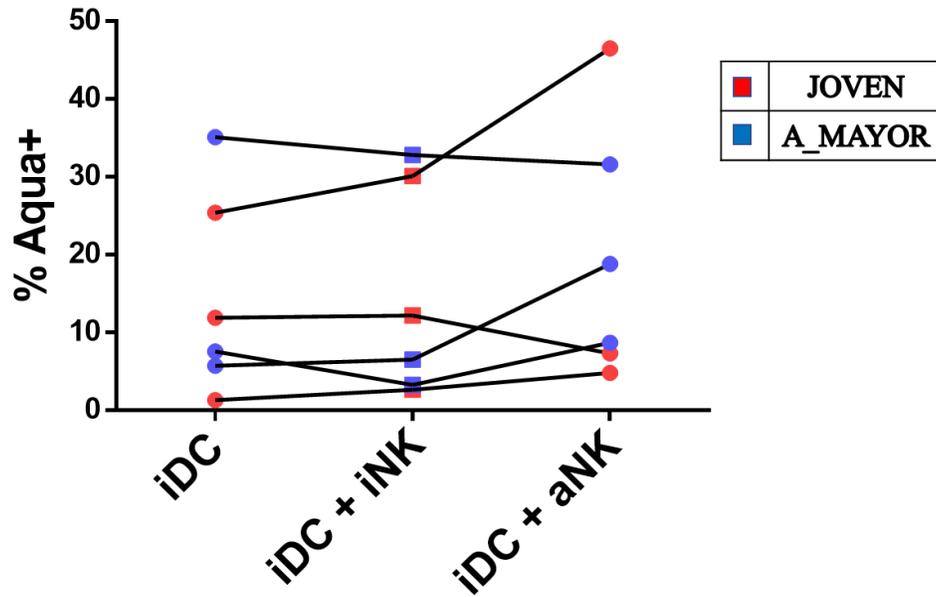


Figura suplementaria 4. Evaluación de la muerte de iDCs (%Aqua +) inducido por NKs en tres condiciones de cultivo. Análisis pareado del porcentaje de viabilidad de dendritas inmaduras (iDC) cultivadas directamente con NKs activadas (aNK), evaluado a nivel de Aqua+ de tres cultivos del sistema *in-vitro* implementado. Los cultivos comparados de izquierda a derecha son: dendríticas inmaduras (iDC), dendríticas inmaduras cultivadas directamente con NKs inactivas (iDC - iNK en contacto célula – célula CC), dendríticas inmaduras cultivadas directamente con NKs activadas (iDC - aNK en contacto célula – célula CC). Se tienen los valores de tres Jóvenes (JOVEN 1, 5 y 6) y tres Adultos Mayores (A_MAYOR 1, 5 y 6). Se observa que el porcentaje de Aqua + de dendríticas inmaduras incrementa en un Joven y dos Adultos Mayores al ser cultivadas con aNKs y no con las iNKs.

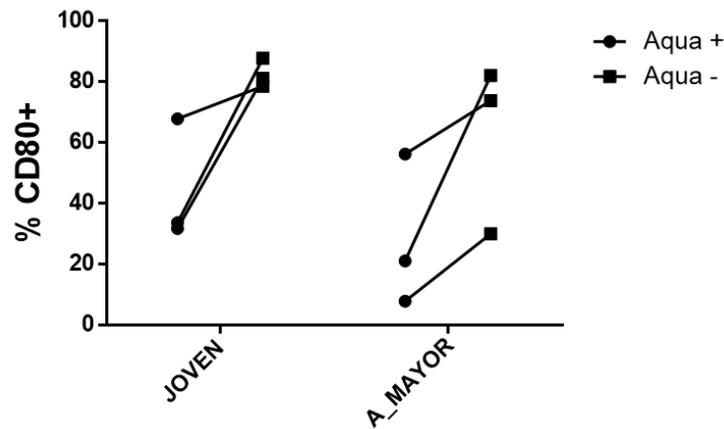


Figura suplementaria 5. Grado de maduración (%CD80+) de las iDCs Aqua+ y Aqua- cultivadas con aNKs (CC). Análisis del porcentaje de CD80+ de dendritas inmaduras (iDC) cultivadas directamente con NKs activadas (aNK), evaluado en las células Aqua+ y Aqua-. Se tienen los valores de tres Jóvenes (JOVEN 1, 5 y 6) y tres Adultos Mayores (A_MAYOR 1, 5 y 6). Se observa que el porcentaje de CD80+ de dendríticas inmaduras Aqua + es menor a las Aqua -, sugiriendo que las dendríticas muertas se encontraban con un menor grado de maduración.