

GRANZIMA B EN LINFOCITOS T CD8+ EN ARTRITIS REUMATOIDE

“Granzyme B in CD8 + T lymphocytes in rheumatoid arthritis ”

Bibiana Bernal¹, Paula Desportes Bielsa², Javier Godino² Luis Larrad Mur³.

1. Médica Patóloga. Doctora en Medicina. Profesora Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Grupo de investigación biomédica y de patología GIBP. E-mail: bibiana.bernal@uptc.edu.co
2. Bioquímico Doctor en Ciencias Inmunología Grupo de Investigación Inmunología e Ingeniería Tisular IACS
3. MD. Doctor en Medicina, Profesor Inmunología Universidad de Zaragoza, España, Inmunología e Ingeniería Tisular Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Recibido:	20	01	2013	Revisado:	22	02	2014
Corregido:	13	03	2013	Aceptado:	15	04	2014

Estilo de referencias: Vancouver X APA 6 Harvard ICONTEC

RESUMEN:

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune discapacitante en la que se presentan linfocitos activados en el compartimento sinovial. La contribución del linfocito T CD8+ en la patogénesis de la artritis reumatoide parece estar relacionada con un cambio en la homeostasis de poblaciones linfoides. El objetivo de este trabajo es describir la actividad de la granzima B, que es una de las más potentes moléculas apoptóticas, en dos subpoblaciones de linfocitos T CD8+ de acuerdo a la expresión en su superficie de L-Selectina (CD62L) de muestras sanguíneas de pacientes con artritis reumatoide **Materiales y métodos:** La actividad de granzima B en linfocitos extraídos de muestras de sangre total de pacientes con artritis reumatoide se midió por citometría de flujo fluorescente (FACS). Se comparó su expresión con la de muestras sanguíneas de donantes sanos. **Resultados.** Los linfocitos CD3+ CD8+ expresaron diferentes niveles de granzima B. Aunque el rango de expresión de granzima B en las dos subpoblaciones de linfocitos CD8+ CD62L+ Y CD8+ CD62L- fue similar entre los donantes sanos y entre los enfermos con artritis reumatoide, se estableció una diferencia entre los dos grupos. **Discusión** Los resultados apoyan la hipótesis de linfocitos T CD8+ con cambios cualitativos inespecíficos en artritis reumatoide (AR) y aportan evidencia sobre una

homeostasis diferente en la enfermedad. La expresión de granzima B en linfocitos T CD8+ podría ser útil para medir el estado de actividad inflamatoria de la artritis reumatoide, pero es necesario diseñar estudios clínicos para su validación.

Palabras claves: Artritis reumatoide, fisiopatología, granzima B, linfocito T CD8+, CD62L-L-selectina.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that is characterized by activated lymphocytes inside the synovial compartment. The contribution of CD8 + T lymphocyte in the pathogenesis of rheumatoid arthritis appears to be related with changes in lymphoid homeostasis. The aim of this paper is to describe the activity of granzyme B in T CD8 + in two subsets: CD62L positive and CD62L negative in rheumatoid arthritis. **Materials and methods** The granzyme B was measured by fluorescent flow cytometry in human T cells extracted from whole blood samples of patients with rheumatoid arthritis and healthy donors. **Results** The CD3 + CD8 + cells expressed different levels of granzyme B. Although the range was similar between healthy controls and patients with rheumatoid arthritis, there was different between these two groups. **Discussion** Granzyme B in CD8 + T lymphocytes has a wide range of expression. The results support the hypothesis that CD8 + T cells have qualitative changes in patients with rheumatoid arthritis (RA) versus those without the disease. The expression of granzyme B in CD8 + T cells could be useful in measuring the state of chronic inflammation associated with rheumatoid arthritis. It must be necessary to design clinical studies for its validation.

Key words: Rheumatoid Arthritis, physiopathology, granzyme B, T CD8+ lymphocyte, CD62L

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica autoinmune correspondiente a una poliartritis crónica simétrica discapacitante (1). Se caracteriza por la presencia de linfocitos activados en el compartimento sinovial (2,3) y por tres situaciones fisiopatológicas: la generación de auto-antígenos, la respuesta humoral con reacción de hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos y la persistencia de la inflamación. Esta perpetuación de la inflamación compuesta por linfocitos activados predominantemente de tipo T y macrófagos sobre vasos y fibroblastos (3), causa la sinovitis reumatoide que lesiona la articulación deformándola irreversiblemente.

La contribución del linfocito T CD8+ en la patogénesis de la artritis reumatoide parece estar relacionada con un cambio en la homeostasis de poblaciones periféricas linfoides

con inmunofenotipos T de maduración desigual y/o senescentes (4,5) y se han observado linfocitos CD8+ deficientes en perforina en tejidos procedentes de pacientes o animales con sinovitis (6). Los linfocitos T CD8+ (LT CD8+) esenciales en la defensa contra las células infectadas por virus y contra células neoplásicas (7), se han asociado con enfermedad autoinmune (8). Son los primeros que se encuentran en una respuesta inmune específica y estudios experimentales han demostrado que exhiben diferencias fisiológicas si son de memoria y ya han estado expuestos al antígeno, o si son linfocitos recién expuestos o naïves. Los LT CD8+ activados (9) eliminan patógenos intracelulares mediante lisis celular inducida por gránulos citotóxicos de proteasas que contienen perforina y granzimas (10); de estas, la *granzima B* es una de las más potentes moléculas apoptóticas, la cual usada con el factor reumatoide ha sido descrita como marcador pronóstico en la predicción de erosiones articulares en AR temprana (11).

Los linfocitos T normales pueden clasificarse por la expresión del marcador de superficie CD45RA y según si han estado o no en contacto con vasos sanguíneos de órganos linfoides secundarios con la *L-Selectina* o CD62L (12, 13). Los linfocitos T CD45RA+CD62L- se han encontrado disminuidos en AR. Mientras que los LT CD8+ de memoria central CD45RA-CD62L+ se han encontrado en mayor proporción, comparativamente con individuos sanos; los linfocitos T CD8+ no expuestos y los CD8+ prediferenciados CD45RA-CD62L- no difieren entre pacientes con AR e individuos control. Los linfocitos de memoria central CD45RA-CD62L+ CD4+ y CD8+ son más numerosos en pacientes con AR lo cual sugiere una maduración acelerada del linfocito T (14, 15) La disminución de linfocitos T CD8+ diferenciados terminalmente CD45RA+CD62L- en la sangre periférica en AR, puede ser debido a un incremento en su apoptosis o por migración a los sitios de la inflamación.

En linfocitos T CD4+, la subpoblación de memoria central CD45RA-CD62L+ está aumentada en pacientes con AR mientras que la población no expuesta y la de memoria efectora no difiere entre enfermos y sanos.

Además, la expresión de citocinas y la perturbación de la homeostasis de los linfocitos T CD8+ periféricos favorece la diferenciación a tipos celulares que pueden ser reclutados en la membrana sinovial, lo cual crea un círculo vicioso en los pacientes con AR por la continua generación de T CD8+ por destrucción articular (16)

El presente trabajo tiene como objetivo describir la actividad de la *granzima B* en LT CD8+ en dos subpoblaciones CD62L+ y CD62L- , en muestras sanguíneas de pacientes con AR y en muestras de individuos sanos sin la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se usaron muestras de sangre total en EDTA procedentes de 10 mujeres con artritis reumatoide y de 10 individuos sanos, anónimos del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, España con los criterios éticos de selección y su consentimiento informado. Las poblaciones celulares sanguíneas se separaron por la técnica del gradiente de densidad, con Ficoll-Histopaque. Las células mononucleares de sangre periférica PBL (Peripheral blood lymphocytes) se aislaron tras centrifugar 5 mL de ficoll y un volumen similar de sangre total (5mL) a 400 g durante 20 minutos.

Se obtuvieron tres fases, y se recogió la constituida por el anillo de color blanquecino nuboso localizada en la parte intermedia. Esta fase con las PBL, se lavó varias veces a velocidades gradualmente más bajas (285 g-127g) con el fin de eliminar el mayor número de plaquetas y la toxicidad del ficoll. Las células se re-suspendieron en un volumen de 4 ml de PBS y se contaron al microscopio con azul trypan. Se obtuvieron entre 760 000 y 810 000 PBL de 5 mL de sangre.

La suspensión celular se diluyó de manera que quedarán entre 95 000 y 150 000 células por cada 100 μ L, y se hizo el marcaje con anticuerpos fluorescentes. Para realizarlo se preparó una suspensión celular de 106 células/mL en PBS. Se añadieron 100 μ L de dicha suspensión a cada tubo de citometría sobre los que se agregó el anticuerpo monoclonal específico. En la tabla 1 se enumeran los diferentes anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales con fluorocromos usados en este diseño experimental

ANTÍGENO PARA DETECTAR Y FLUOROCROMO	CASA COMERCIAL	Tipo de anticuerpo	ISOTIPO	CANTIDAD
CD3 perCp	Beckman coulter	UCHT-1	Ig G1	2 microlitros
CD3 FITC	Beckman coulter	UCHT-1	Ig G1	2 microlitros
CD4 APC	Beckman coulter	SFC112T4D11 (T4)	Ig G1	2 microlitros
CD8 Pacific blue	Immunostep	8PB1-FS	Ig G1	2 microlitros
CD62L APC	e-Bioscience	Dreg 56	Ig G1	2 microlitros
Granzima B PE	e-Bioscience	GB11 antibody	Ig G1 monoclonal humano/ratón	0,75 microlitros
Control de Isotipo PE/FITC	Immunostep	IgG1/IgG2a		2 microlitros

Fuente: Bernal, Bibiana Actividad de Granzima B en LT CD8+ DEA Inmunología Universidad de Zaragoza. Septiembre 2010

En los casos en los que se hizo un marcaje múltiple, los anticuerpos se añadieron secuencialmente. La mezcla células/monoclonal se agitó en un vórtex durante 5 segundos y se incubó durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente las células se diluyeron con PBS hasta un volumen final de 500 μ L. En células que previamente habían sido marcadas con anticuerpos anti CD3, CD8 y CD62L, se realizó un marcaje intracelular para la granzima B. Una vez transcurridos 15 minutos de incubación del marcaje de membrana se usaron reactivos del kit intracell™ de Immunostep. Para ello se adicionaron a cada muestra, 100 μ L de la solución de fijación A (paraformaldehído al 1%) durante 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 500 μ L de PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 285 g.

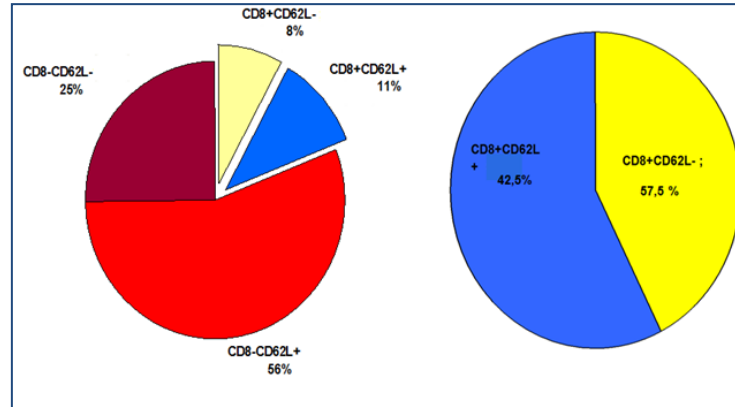
Se retiró el sobrenadante, se lavó y centrifugó el pellet durante 5 minutos más y después se agregó la solución permeabilizante B (saponina). Se mezcló bien con el vórtex y se agregaron 0.75 μ L de anticuerpo anti granzima B. Se incubó en cuarto oscuro durante 15 minutos más. Las células marcadas se midieron con un citómetro de flujo FACS Aria, utilizando el software de BD FACS Diva (Beckton, Dickinson).

En todas las medidas se adquirieron 50 000 eventos para el análisis. Este se hizo, seleccionando la población CD3 positiva, lo que determinó la población de linfocitos T. Se comparó la población CD3+ CD4+ con la CD3+ y CD8+, descartándose la población CD4+ para el análisis de esta experiencia. Posteriormente se seleccionó la población CD8+ y se cotejó con el marcaje de CD62L y se hizo de dos formas, primero con la población CD8+ y después la población CD3+/ CD62L. Se seleccionaron los CD62L high como de memoria central, los CD62L low como de memoria efectora o naïves y los CD62L negativos como los efectores citolíticos

RESULTADOS

Se midió una población de CD3+ CD8+ con un rango entre 1 257 y 18 090 células. La fracción de PBL extraída de las muestras de sangre tuvo una población del 63% de linfocitos T CD3+ y los CD8+ se muestran en la gráfica número 1.

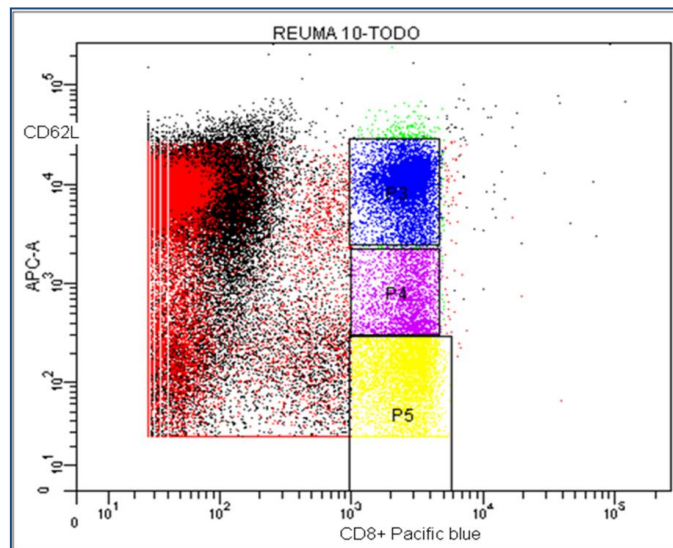
Gráfica 1. Inmunofenotipos linfoides: a la izquierda, las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD3+, a la derecha la población de linfocitos T CD8+ según el marcaje con *L-selectina* (CD62L)



Fuente: Bernal, Bibiana Actividad de Granzima B en LT CD8+ DEA Inmunología Universidad de Zaragoza. Septiembre 2010

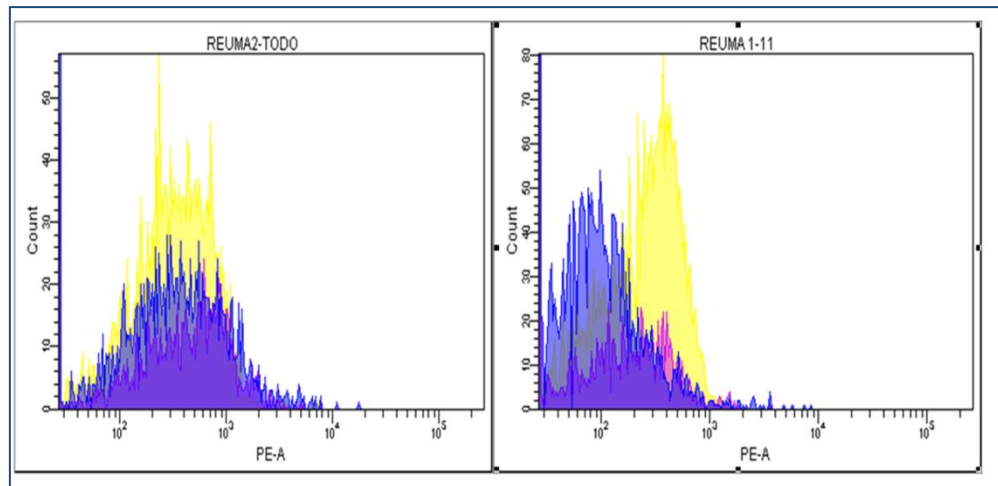
De ellos un 20% fueron linfocitos T CD8+ de los cuales un 57,5 % corresponde a linfocitos T CD8+ CD62L negativos y un 42,5% a linfocitos T CD8+ CD62L +. La expresión de *granzima B* fue variable, tal y como se puede observar en uno de los casos, representada en la gráfica número 2 y 3.

Gráfica 2. Diagrama cartesiano con las subpoblaciones linfocitarias marcadas con CD3, CD8 y CD62L



Fuente: Bernal, Bibiana Actividad de Granzima B en LT CD8+ DEA Inmunología Universidad de Zaragoza. Septiembre 2010

Gráfica 3. Histograma con la expresión de *granzima B* marcada con PE-A.



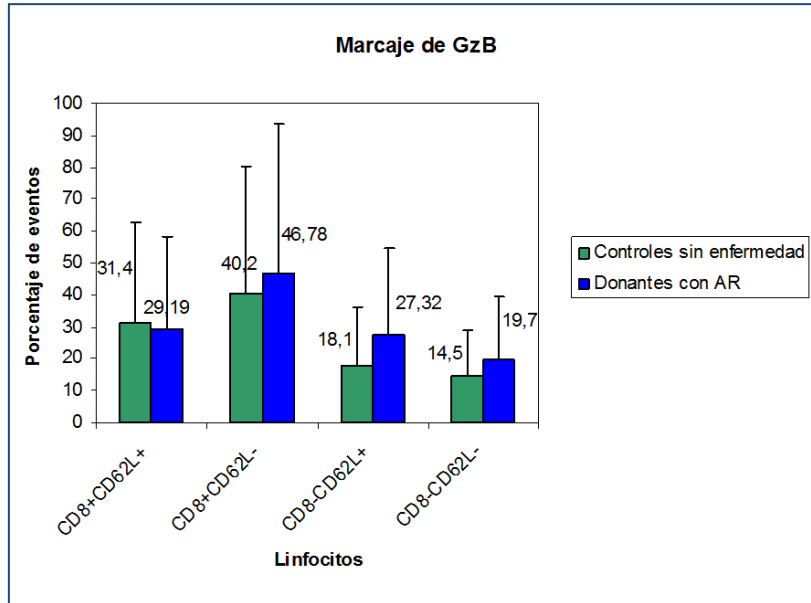
Fuente: Bernal, Bibiana Actividad de Granzima B en LT CD8+ DEA Inmunología Universidad de Zaragoza. Septiembre 2010

Se analizaron los inmunofenotipos CD3+ CD8+ CD62L+ (Linfocitos T CD8+ de memoria central por su marcación positiva de *L-selectina*) y CD3+ CD8+ CD62L- (efectores, naïve o de memoria efectora). La mayor proporción de linfocitos CD8+ fueron CD62L+ (11%) que corresponden a linfocitos de memoria. Un 8% de los linfocitos fueron CD62L negativos (linfocitos efectores y naïves).

La expresión de la *granzima B* en la población de CD8+ de memoria fue muy variada pero superior en los sanos (31,4%) con referencia a los enfermos (29,19%). El inmunofenotipo T CD8+ CD62L - que correspondería a un fenotipo efector tuvo una marcación de *granzima B* diferente al inmunofenotipo de memoria: en controles sin la enfermedad fue de 40,2 %, menor que en donantes con Artritis reumatoide (46,7%).

La expresión de *anti-granzima B* en los linfocitos T CD8+ de sanos alcanzó un 31,4%. Los linfocitos activados sin la molécula *L-selectina*, expresaron más *granzima B* y en una proporción mayor en los linfocitos de pacientes con AR. En los linfocitos de memoria de los donantes con la enfermedad parece conservarse una marcación del 30%, comparativamente más baja que en los linfocitos sin la enfermedad (gráfica número 4).

Gráfica 4. Porcentajes de la expresión de anticuerpos *antigranzima B* (GZB) en los linfocitos T CD8+ de donantes sanos frente a expresión en linfocitos de pacientes con artritis reumatoide en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD3+ CD8+ CD62L+/- y CD8-CD62L+/-.



Fuente: Bernal, Bibiana Actividad de Granzima B en LT CD8+ DEA Inmunología Universidad de Zaragoza. Septiembre 2010

En todos los linfocitos T CD3+ los niveles de *granzima B* fueron superiores en los donantes con enfermedad que en individuos control. En enfermos con AR los linfocitos de memoria CD62L positivos fueron positivos para *granzima B* en un 27,32% frente a un 18,1 % en los donantes sin la enfermedad. Los de tipo efector T CD8+ CD62L - alcanzaron un 19,7% de expresión de anticuerpos anti *granzima B* en pacientes con AR, frente a un 14,5% en los controles sin la enfermedad.

DISCUSIÓN

Al comparar la expresión de *granzima B* entre sanos y muestras de pacientes con AR, encontramos que existe un amplio rango de expresión y no se correlaciona con el hecho de poseer o no, la enfermedad.

La expresión de la *granzima B* fue mayor en los CD8+ que en linfocitos CD3+ CD8- fue mayor a la obtenida en los linfocitos CD3+ CD8-, similar a lo encontrado en la literatura. Las distintas subpoblaciones de linfocitos CD3+ CD8+ expresaron diferentes niveles de *granzima B*, en un rango comprendido en todos los casos sin una diferencia significativa. La población CD8 de memoria fue mayor que la efectora, lo que indica un estado sanguíneo de no activación linfoide. Debido a que son células memoria y expresan proporcionalmente más *granzima B* en los donantes sin enfermedad, es posible que

posean una mayor capacidad de adoptar el inmunofenotipo efector más rápido y con mayor capacidad de citólisis. La población de linfocitos T CD8+ naïve CD62L negativo y granzima negativas fue muy pequeña. La expresión mayor de anticuerpos *anti-granzima B* en los linfocitos T CD8+ efectores de los donantes con la enfermedad, podría ser manifestación de la inflamación propia de la AR, pero la mínima diferencia con los donantes sin la enfermedad y el hecho del escaso número de muestras no permite realizar una comparación estadística.

Aunque no son conocidos los datos de la línea basal de expresión de *granzima B* en linfocitos T CD8+ de sujetos normales, con este diseño experimental se han encontrado datos en subpoblaciones de linfocitos que podrían aportar un conocimiento de cómo es la función de los mismos en los pacientes con artritis reumatoide.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que linfocitos T CD8+ muestran cambios cualitativos en pacientes con artritis reumatoide frente a aquellos sin la enfermedad. En los pacientes con AR, los linfocitos T CD8+ de memoria central CD62L+ tienen una menor expresión de *granzima B* que la que tienen los linfocitos de pacientes sanos, mientras que los efectores expresan más *granzima B* que los de los sanos. Estos hallazgos muestran la evidencia de una alteración en la homeostasis de los linfocitos T CD8+ periféricos entre pacientes con AR. La expresión de *granzima B* superior en linfocitos T CD8+ de pacientes con la enfermedad podría deberse a una maduración acelerada del linfocito T hacia linfocito efector con defectos funcionales y determinaría un incremento en la apoptosis de dichas células, con la posibilidad de no eliminar los linfocitos T CD8+ autorreactivos, o de realizar una migración a los sitios de la inflamación, sin ser óptimos.

La persistencia en la respuesta inflamatoria de los pacientes con AR reumatoide puede asociarse con linfocitos T CD8+ efectores con una concentración superior de *granzima B*. Los linfocitos T CD8+ normales de memoria, ejecutarían mejor su función citotóxica con los linfocitos autorreactivos y el hecho de tener una menor expresión de *granzima B* en los de la enfermedad, sería una causa del aumento en la concentración de clones autorreactivos. La expresión de *granzima B* en linfocitos T CD8+ podría ser útil en la medida del estado de actividad inflamatoria de la artritis reumatoide, pero es necesario diseñar los estudios clínicos pertinentes para llegar a esa conclusión.

AGRADECIMIENTOS: B.B. agradece a Colciencias, Laspau, UPTC y Grupo de Investigación en Salud pública GISP por su apoyo académico y científico.

REFERENCIAS

- 1) Symmons D, Mathers C. Pflieger B. The global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000. En http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_rheumatoidarthritis.pdf Consultado: 10 septiembre de 2010.

- 2) Froelich CJ, Zhang X, Turbov J, Hudig D, Winkler U, Hanna WI. Human granzyme b degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *The journal of immunology* 1993; 151 (12): 7161-7171
- 3) Kraan MC, Haringman J, Weedon H, Barg E, Smith M, Hern P. et al. T Cells, Fibroblast-Like Synoviocytes, and granzyme b+ cytotoxic cells are associated with joint damage in patients with recent onset rheumatoid Arthritis *Ann Rheum Dis* 2004; 63(5): 483 – 488
- 4) Koetz K, Bryl E, Spickschen K, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. T Cell Homeostasis In Patients With Rheumatoid Arthritis. *Proc Natl Acad Sci Usa* 2000; 97:9203-9208
- 5) Masuko-Hongo K, Sekine T, Ueda S, Kobata T, Yamamoto K, Nishioka K. et al. Long term persistent accumulation of CD8+ T Cells in synovial fluid of rheumatoid Arthritis: *Ann Rheum Dis* 1997; 56(10): 613–621
- 6) Kang YM, Zhang X, Wagner UG, Yang H, Beckenbaugh RD, Kurtin PJ et al. CD8 T Cells Are Required For The Formation Of Ectopic Germinal Centers In Rheumatoid Synovitis *J Exp Med* 2002; 195(10):1325-36
- 7) Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C. et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Micorbes Infect* 2009;11(4):452-9.
- 8) Blanco P, Pitard V, Viallard JF, Taupin JL, Pellegrin JL, Moreau JF. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005;52(1):201-11.
- 9) Espersen C, Pakkenberg B, Harder E, Pallesen G, Gerstoft J, Pedersen BK, et al. High levels of CD8-positive lymphocytes expressing CD45RO, granzyme B, and Ki-67 in lymph nodes of HIV-infected individuals are not associated with increased mortality. *AIDS research and human retroviruses.* 2001;17(4):287-93.
- 10) Devadas S, Das J, Liu C, Zhang L, Roberts AI, Pan Z, et al. Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity.* 2006;25(2):237-47.
- 11) Goldbach-Mansky R, Suson S, Wesley R, Hack CE, El-Gabalawy HS, Tak PP. Raised Granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:715-721
- 12) Jackson SS, Schmitz JE, Kuroda MJ, McKay PF, Sumida SM, Martin KL. Et al. Evaluation of CD62L expression as a marker for vaccine-elicited memory cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 2005; 116(4):443-53
- 13) Maldonado A, Mueller YM, Thomas P, Bojczuk P, O'Connors C, Katsikis PD. Decreased effector memory CD45RA+ CD62L-CD8+ T cells and increased central memory CD45RA-CD62L+ CD8+ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):91-6
- 14) Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine.* 1997;186(9):1407-18.
- 15) Bachmann MF, Wolint P, Schwarz K, Jäger P, Oxenius A. Functional properties and lineage relationship of CD8+ T Cell Subset Identified by expression of IL-7 Receptor (Alpha) And CD62L+. *J Immunology* 2005; 175: 4686-4696
- 16) Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Saez-Gutierrez B, Royo-Cañas M, Bosque A, Alava MA, et al. Rheumatoid synovial fluid T cells are sensitive to APO2L/TRAIL. *Clinical immunology.* 2007;122(1):28-40.

COMO CITAR ESTE ARTICULO:

Bernal B, Desportes P, Godino J, Larrad-Mur L. Granzima B en linfocitos T CD8+ en artritis reumatoide. Rev salud hist sanid on-line 2014; 9(1): 51-61 Disponible en: <http://www.histosaluduptc.org/ojs-2.2.2/index.php?journal=shs>. Consultado en: (fecha de consulta)

*Los textos publicados en esta revista pueden ser reproducidos citando las fuentes.
Todos los contenidos de los artículos publicados, son responsabilidad de sus autores.*

Copyright. Revista Salud Historia y Sanidad ©

Grupo de Investigación en Salud Pública GISP-UPTC
Grupo de investigación Historia de la salud de Boyacá.

Tunja 2014