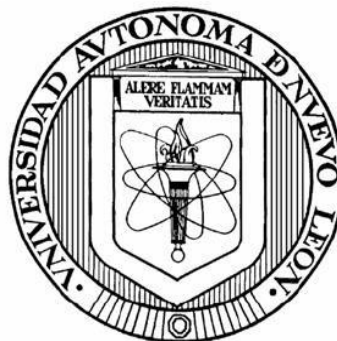


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DEL IMMUNEPOTENT-CRP SOBRE CÉLULAS NK

POR :

ALAN BENANCIO MARTÍNEZ-LORIA

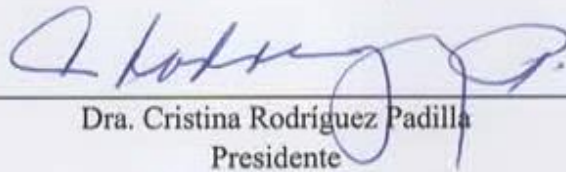
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

Septiembre, 2020

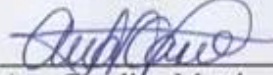
EFFECTO DEL IMMUNEPOTENT-CRP SOBRE

CÉLULAS NK

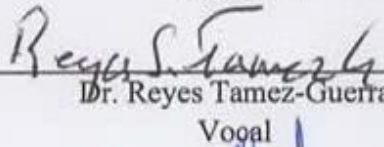
Comité de Tesis



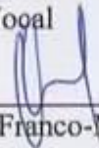
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente



Dra. Ana Carolina Martínez-Torres
Secretario



Dr. Reyes Tamez-Guerra
Vocal



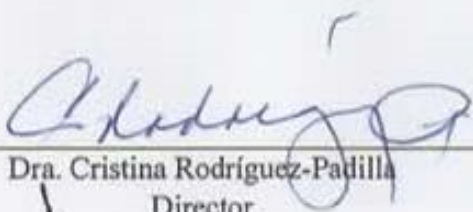
Dr. Moisés Franco-Molina
Vocal



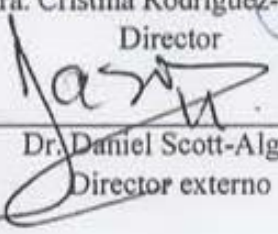
Dr. Edgar Mendoza-Gamboa
Vocal

**EFFECTO DEL IMMUNEPOTENT-CRP SOBRE
CÉLULAS NK**

Dirección de Tesis



Dra. Cristina Rodríguez-Padilla
Director



Dr. Daniel Scott-Algara
Director externo



INSTITUT PASTEUR

*Unité de Biologie
Cellulaire des Lymphocytes
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 13*



Institut Pasteur

Agradezco al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Biología Celular de Linfocitos del Instituto Pasteur por el apoyo económico e infraestructura brindados para la realización de este trabajo de tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Benacio Martínez y Fátima Loria.
A mis hermanas, Karla Martínez y Karen Martínez.

Agradezco a la Dra. Carolina Martínez, asesora y amiga.

Agradezco al Dr. Daniel Scott, asesor y amigo.

Agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez.

Agradezco a los miembros del laboratorio de Inmunología del Cáncer y Sistema Inmune, en especial a Kenny, Rodolfo, Alejandra y Ana.

Agradezco a los miembros del laboratorio de Biología Celular de Linfocitos del Instituto Pasteur, en especial a Marta Mastrogiovanni.

Agradezco a mis amigos, Omar, Rodrigo, Servando, Raúl y Alberto.

Agradezco a Martín García, mi mejor amigo.

Agradezco a Helen Lorenzo, mi mejor amiga.

Agradezco a Yareellys Ramos.

Gracias a todos.

ÍNDICE

	ÍNDICE DE TABLAS.....	III
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
I.	RESUMEN.....	1
	ABSTRACT.....	2
II.	INTRODUCCIÓN.....	3
III.	ANTECEDENTES.....	5
	3.1 Células NK.....	5
	3.2 Receptores de células NK.....	5
	3.2.1 Receptores de células NK de tipo Inmunoglobulina.....	9
	3.2.2 Familia de receptores de lectina tipo C.....	10
	3.2.3 Receptores de Citotoxicidad Natural.....	11
	3.3 Subtipos de células NK.....	12
	3.3.1 CD56bright.....	13
	3.3.2 CD56dim.....	13
	3.3.3 CD56-.....	24
	3.4 Mecanismos citotóxicos.....	14
	3.4.1 Desgranulación.....	14
	3.4.1.1 CD107a (LAMP-1).....	15
	3.4.2 Acoplamiento de receptores de muerte.....	15
	3.5 Agotamiento de las células NK.....	16
	3.6 Inmunomoduladores.....	18
	3.6.1 Extractos Dializables de Leucocitos.....	20
	3.6.2 El IMMUNEPOTENT-CRP®.....	20
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	22
V.	HIPÓTESIS.....	23
VI.	OBJETIVO GENERAL.....	24
	6.1 Objetivos específicos.....	24

VII.	METODOLOGÍA.....	35
	7.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	25
	7.2 Aislamiento de células NK.....	25
	7.3 Líneas celulares.....	26
	7.4 Ensayo de viabilidad y activación.....	26
	7.5 Ensayo de desgranulación (CD107a).....	27
	7.6 Análisis de receptores de células NK.....	33
	7.7 Análisis estadístico.....	30
VIII.	RESULTADOS.....	31
	El IMMUNEPOTENT-CRP no reduce la viabilidad de las PBMC de donantes sanos.....	31
	El IMMUNEPOTENT-CRP induce la activación de las células NK de donantes sanos.....	31
	La línea celular K562 es reconocida con una eficacia mayor por las células NK estimuladas con el IMMUNEPOTENT-CRP.....	33
	La activación ex-vivo de las células NK con el IMMUNEPOTENT-CRP aumenta la predisposición de receptores NK.....	35
	El tratamiento ex-vivo con el IMMUNEPOTENT-CRP no activa a las células T pero sí induce modificaciones de marcadores de NK.....	37
IX.	DISCUSIÓN.....	39
	Modificaciones en el repertorio de células NK inducidos por el IMMUNEPOTENT-CRP.....	39
	Los cambios en el repertorio de células NK estimuladas con el IMMUNEPOTENT-CRP no indican hiporeactividad.....	41
	Potencial del IMMUNEPOTENT-CRP como inmunoterapia.....	42
X.	CONCLUSIONES.....	43
XI.	PERSPECTIVAS.....	44
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
XIII.	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Receptores inhibidores de células NK y sus ligandos, en humanos.....	6
Tabla 2. Receptores activadores de células NK y sus ligandos, en humanos.....	6
Tabla 3. Combinaciones de anticuerpos para el análisis multicitométrico de marcadores y receptores de células NK.....	28
Tabla 4. Anticuerpos empleados para el análisis de receptores de células NK.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células NK reconocen células tumorales.....	8
Figura 2. Representación esquemática de la funcionalidad del KIR inhibitor y activador.....	9
Figura 3. Representación esquemática de los receptores de lectina tipo C.....	11
Figura 4. Representación esquemática de la funcionalidad de los NCR en humanos.....	12
Figura 5. Agotamiento de las células NK.....	17
Figura 6. Estrategia de selección de células NK para el análisis de CD107a en PBMC.....	28
Figura 7. Estrategia de selección de células NK y células T para el análisis del repertorio de células NK.....	30
Figura 8. Viabilidad de PBMC al ser expuestas al I-CRP.....	31
Figura 9. Activación de las células NK después del tratamiento con I-CRP.....	32
Figura 10. Desgranulación de las células NK después del tratamiento con I-CRP.....	34
Figura 11. Análisis de citometría de flujo del repertorio de células NK.....	36
Figura 12. Análisis de citometría de flujo de marcadores NK presentes en células T.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

I-CRP	IMMUNEPOTENT-CRP
NK	Asesinas Naturales
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
CD	Cúmulo de diferenciación
ConA	Concanavalina A
IL	Interleucina
IFN	Interferón
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
CCL-5	Ligando 5 de quimiocina CC
TNF	Factor necrótico tumoral
EDL	Extracto Dializable de leucocitos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BCR	Receptor de células B
TCR	Receptor de células T
LILRB1	Miembro 1 de la sub-familia B del receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria
KIR	Receptor de células NK de tipo inmunoglobulina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
DC	Célula dendrítica
ITIM	Motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina
ITAM	Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina
DAP-12	Proteína activadora DNAZ de 12 kDa
ZAP-70	Proteína cinasa 70 asociada a la cadena zeta
MICA	Proteína A asociada a MHC-I
MICB	Proteína B asociada a MHC-I
ULBP	Proteína de unión a UL16

RAET1	Transcrito temprano 1E de ácido retinoico
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
Syk	Tirosina cinasa del bazo
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos alfa 1
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos beta 1
RANTES	Regulado tras la activación, expresadas y secretadas en células T normales
PSGL-1	Ligando-1 de glicoproteína de P-selectina
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
TRAIL-R	Receptor del ligando inductor de apoptosis relacionada TNF
LAMP	Glicoproteínas de membrana asociadas a lisosomas
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
TiNKs	Células NK infiltrantes de tumor
SDF-1	Factor 1 derivado de células estromales
MDSC	Células supresoras derivadas de la línea mieloide
COX2	Ciclooxigenasa 2
TAM	Macrófago asociado a tumor
HIF-1 α	Factor 1 alfa inducido por hipoxia
MMP-7	Metaloproteasa 7 de matriz
CAF	Fibroblasto asociado a tumor
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
CXCL1	Ligando 1 de quimiocina CXC
IDO	Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
IMiD	Agentes inmunomoduladores
TF	Factor de transcripción
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
ATP	Adenosín trifosfato

HSP70	Proteína de choque térmico de 70kDa
HSP90	Proteína de choque térmico de 90kDa
HMGB1	Proteínas de alta movilidad del grupo 1
CFU-GM	Unidad formadora de colonias de granulocitos y monocitos
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
FACS	Clasificación celular activada por fluorescencia
ATCC	American type culture collection
PMA-iono	forbol-12-miristato-13-acetato - ionomicina
NCR	Receptores de citotoxicidad natural
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
HCMV	Citomegalovirus humano
MDDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
T-ALL	Leucemia linfocítica aguda de células T

I. RESUMEN

El IMMUNEPOTENT-CRP® (I-CRP) es un extracto dializable de leucocitos que se obtiene del bazo bovino, posee moléculas menores a 12 kDa y es empleado como adyuvante en pacientes de cáncer en terapias tradicionales, donde aumenta los porcentajes de leucocitos totales y las subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ y CD56⁺. Sin embargo, no se ha determinado si el I-CRP induce la activación o incrementa la actividad de las células del sistema inmune, principalmente aquellas poblaciones que expresan CD56 y CD16, las células Natural Killer (NK). Por lo que el objetivo de esta tesis fue establecer si el I-CRP activa a las células NK provenientes de donantes sanos (sin signos clínicos de enfermedad), analizar su capacidad efectora y la modulación del repertorio de NK. Para ello se obtuvieron PBMC y se expusieron al I-CRP (0.3, 0.7 y 1.5 U/mL) durante 24 y 48 h para medir la viabilidad con Calceína-AM. Después se determinó la activación inducida por el I-CRP (1.5 U/mL) midiendo la expresión del marcador CD69, tanto en las PBMC como en las células NK aisladas, comparando contra controles positivos: ConA (1 mg/mL), IL-2 (100 U/mL) e IL-15 (15 ng/mL). Después se evaluó la actividad efectora de las células NK estimuladas con el I-CRP, evaluando la desgranulación (CD107a+) antes y después de los co-cultivos contra la línea celular K562. Posteriormente, se realizó un análisis multicitométrico de los marcadores de células NK en células estimuladas con I-CRP. Se observó que el I-CRP no reduce la viabilidad (Calceína+) de las PBMC, comparado al control sin tratamiento, pero sí induce la activación de las células NK (CD69+). Se determinó un aumento significativo en la desgranulación después del tratamiento con I-CRP, que se incrementa después del co-cultivo con células K562. Y el análisis de marcadores indicó que el I-CRP aumenta de manera significativa la expresión de los principales receptores activadores, como NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D y NKG2C, observándose también un incremento en el receptor CD85j y en los receptores KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor), pero sin encontrar diferencias significativas en los receptores CD160 y CD226. No se han encontrado reportes que indiquen una modulación similar de estos receptores por parte de otro estimulante. En conclusión, el I-CRP activa a las células NK, mejora su respuesta efectora y aumenta la expresión de los receptores de células NK. Este trabajo ayuda a comprender el mecanismo del I-CRP como inmunoestimulante, contribuyendo a su futuro empleo contra infecciones virales, bacterianas y cáncer, donde el agotamiento de las células NK juega un rol en la progresión de estas.

ABSTRACT

IMMUNEPOTENT-CRP® (I-CRP) is a dialysable leukocyte extract obtained from bovine spleen, composed by molecules smaller than 12 kDa and administrated as an adjuvant in traditional therapies of cancer patients, where increases total percentages in leukocytes and subpopulations CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ and CD56⁺. However, it has not been determined whether I-CRP activates or increases immune system cells activity, mainly in those populations expressing CD56 and CD16, the Natural Killer (NK) cells. Therefore, the thesis objective was to establish whether I-CRP activates NK cells from healthy donors (without clinical signs of disease), analyze their effector capacity and modulation of NK repertoire. To achieve this, PBMC were obtained and exposed to I-CRP (0.3, 0.7 and 1.5 U/mL) during 24 and 48 h to measure viability (Calcein-AM). Activation was determined by measuring the expression of CD69 marker, both in PBMC and isolated NK cells after I-CRP (1.5 U/mL) treatment, comparing against positive controls: ConA (1 mg/mL), IL- 2 (100 U/mL) and IL-15 (15 ng/mL). Effector activity of I-CRP stimulated NK cells was then evaluated, measuring degranulation (CD107a+) before and after co-culture against K562 cell line. Subsequently, a multicytometric NK cell markers analysis was performed in I-CRP stimulated PBMC. I-CRP does not reduce viability (Calcein+) of PBMC, compared to untreated control, but it does induce NK cells activation (CD69+). Degranulation was significantly increased after I-CRP treatment, and augmented even more after K562 cells co-culture. NK cell marker analysis indicated increased expression of the main activating receptors (NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D and NKG2C) after I-CRP treatment, also increased CD85j receptor and KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor) expression was observed, but without finding significant differences in CD160 and CD226. No reports indicating a similar modulation of these receptors were found. In conclusion, I-CRP activates NK cells, improves their effector response and increases NK cell receptors expression. These results help to understand how the mechanism of immunostimulant I-CRP works, contributing to its future use against viral, bacterial and cancer infections, in which NK cells exhaustion plays a determining role in their progression.

II. INTRODUCCIÓN

Las células NK pertenecen a las células linfoides innatas (ILC) y comúnmente están definidas en humanos como $CD56^+CD16^{+/-}CD3^-$. Representan el 10% en la población total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y comprenden la tercera población en porcentaje de linfocitos, después de las células B y T.

Entre las funciones biológicas que desempeñan las células NK, incluye reconocer y matar células infectadas por patógenos intracelulares, así como también células cancerosas. Sin embargo, las células NK también tienen un papel inmunomodulador, ya que secretan varias citocinas; entre ellas el interferón (IFN) $-\gamma$, la proteína-1 α inflamatoria de macrófagos (MIP) -1α , interleucina (IL) -6 , el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), CCL5 (RANTES), el factor necrótico tumoral (TNF) $-\alpha$, IL-5, IL-6 e IL-13.

Dependiendo del subtipo, las células NK expresan diferentes combinaciones de receptores inhibidores o activadores, que dan como resultado una diversidad dentro de la población de células NK con la capacidad de responder a una variedad de estímulos, bajo diferentes condiciones patológicas. Sin embargo, la progresión tumoral y las infecciones crónicas generalmente conducen al agotamiento de las células NK, lo que limita el potencial antitumoral/infección de las células NK. Múltiples mecanismos podrían contribuir al agotamiento, como la desregulación en la señalización de receptores de células NK, así como los efectos supresores de las células reguladoras o factores solubles dentro del microambiente.

Se ha sugerido que esta condición puede superarse mediante, entre otras, la activación mediada por citocinas, así como otras inmunoterapias. Estos incrementan la inmunidad contra el tumor o mejoran la respuesta clínica al tratamiento convencional que se esté llevando a cabo.

Los Extractos Dializables de Leucocitos (EDL) son un tipo de inmunoterapia que consiste en una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular obtenida de sangre o tejido linfóide. Se ha demostrado que transfiere “la inmunidad mediada por células” de un donador inmune a un receptor no inmune, y se han observado efectos benéficos al

implementarse en padecimientos como inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, bacterianas, asma, alergias y algunos tipos de cáncer.

Un ejemplo destacable de los EDL es el IMMUNEPOTENT-CRP® (I-CRP), el cual se obtiene del bazo bovino y posee sustancias menores a 12 kDa. Algunos estudios con el I-CRP han demostrado que es capaz de modificar la respuesta inmune facilitando la capacidad de los linfocitos para destruir las células cancerosas y mejorar la calidad de vida en pacientes con cáncer de pulmón y de mama, observando un aumento de los leucocitos totales y las subpoblaciones CD4+, CD8+, CD16+ y CD56+.

Por lo expuesto anteriormente, en este proyecto de investigación se analizó el efecto in vitro que posee el IMMUNEPOTENT-CRP® sobre la viabilidad y la activación de las células NK. Nuestros resultados muestran que la activación de las células NK, asociada a una modulación de los receptores de células NK, aumenta la actividad funcional de las células NK; medida contra la línea celular K562.

Estos resultados añaden nuevos conocimientos sobre el mecanismo de acción y el efecto del IMMUNEPOTENT-CRP® sobre las células NK, miembros celulares importantes en la inmunovigilancia contra diversas enfermedades. Estos datos obtenidos pueden contribuir a una mejor aplicación clínica, revirtiendo los efectos negativos observados en las células NK en enfermedades crónicas, y una mejor adaptación a diversas terapias combinadas.

III. ANTECEDENTES

3.1 Células NK

El sistema inmune es un conjunto de moléculas, células, tejidos y órganos que contrarrestan el efecto de virus, bacterias, hongos, toxinas y células malignas. Este se clasifica en dos tipos de inmunidad; la respuesta inmune adaptativa y la respuesta inmune innata. La primera está representada principalmente por células B y T, y la segunda consiste en células y factores solubles que desempeñan un papel crucial en la iniciación y la posterior activación de la respuesta inmune adaptativa, así como en la eliminación eventual de los patógenos que han sido el objetivo de esta respuesta. Los principales componentes celulares del sistema inmune innato son las barreras epiteliales físicas, los leucocitos fagocíticos, las células dendríticas y las células asesinas naturales (NK) (Abbas, Lichtman, and Pillai 2014).

Las células NK fueron descritas a principios del año 1970, como células linfoides que poseen la capacidad de lisar células tumorales sin una previa inmunización, determinando que poseen una reactividad “natural” citotóxica (Herberman et al. 1975; Kiessling, Klein, and Wigzell 1975). Las células NK comprenden aproximadamente entre el 5 y el 15%, pudiendo llegar hasta un 25% de todos los linfocitos en sangre periférica (una variabilidad es observada según la población estudiada). Debido a su producción temprana de citocinas y quimiocinas, las células NK son componentes cruciales del sistema inmune innato (Mandal and Viswanathan 2015), aunque recientemente se le ha adjudicado otros roles al generar memoria específica contra antígenos (Nikzad et al. 2019). Morfológicamente se observan como linfocitos grandes y granulares (Adib-Conquy et al. 2014), pero se diferencian de las células B y T por la falta de receptores específicos generada por la recombinación del DNA, tal es el caso del BCR (Receptor de células B) y el TCR (Receptor de células T) (Long et al. 2013).

3.2 Receptores de células NK

La reactividad “natural” de las células NK está controlada por una amplia gama de receptores expresados en la superficie celular los cuales se pueden agrupar en diferentes familias, tales como: los receptores de citotoxicidad natural (NKp46, NKp44, NKp30), CD244 (2B4), correceptores y moléculas co-estimulación (CD226, CD57, NKp80), los receptores de lectina de tipo C (NKG2D, NKG2A), los receptores inhibidores de leucocitos

(LILRB1) y los receptores KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*) (Bauer 1999; Boudreau and Hsu 2018; Waldhauer and Steinle 2008). En la Tabla 1 se muestran los receptores clasificados como “activadores” o “inhibidores” de células NK, así como los ligandos con los que interactúan.

Tabla 1. Receptores inhibidores de células NK y sus ligandos, en humanos.

Receptor inhibidor	Ligando
KIR2DL1	Grupo HLA-C2 (Lys ⁸⁰)
KIR2DL2/3	Grupo HLA-C1 (Asn ⁸⁰), Grupo HLA-C2 (Lys80)
KIR2DL5A/B	No determinado
KIR3DL3	No determinado
KIR3DL1	HLA-A, Bw4
KIR3DL2	HLA-Aw3, Aw11
CD94/NKG2A/B	Péptido señal presentado en HLA-E
LILRB1	HLA clase I
KLRG1	Cadherinas
SIGLECS	Ácido siálico
NKRP1A	LLT1(<i>Lectine-like transcript-1</i>)

Tabla 2. Receptores activadores de células NK y sus ligandos, en humanos.

Receptor activador	Ligando
KIR2DS1	Grupo HLA-C2 (Lys ⁸⁰)
KIR2DS2	Grupo HLA-C2 con péptido viral
KIR2DS3	No determinado
KIR2DS5	HLA-C2
KIR3DS1	HLA-F
KIR2DL4	HLA-G
CD16	Sección Fc del anticuerpo
CD94/NKG2C	HLA-E
NKG2D	MIC-A, MIC-B, ULBP1-6
CD94/NKG2E/H	HLA-E

DNAM-1	CD155, CD112
CD58	CD2 (LFA-2)
NKp30	B7-H6, HCMV-pp65, BAG6, heparán sulfato
NKp44	MLL5, hemaglutinina viral, PCNA, PDGF-DD
NKp46	Factor P del complemento, hemaglutinina viral, heparán sulfato
NKp65	KACL
NKp80	AICL

Los receptores inhibidores se rigen, en su mayoría, por las interacciones con las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I), también conocidas en humanos como antígenos leucocitarios humanos (HLA) (Boudreau and Hsu 2018). El reconocimiento de las moléculas de MHC I del propio previene la activación de las células NK, exceptuando las células dendríticas (DC), donde puede ocurrir una co-activación (Cooper et al. 2004). No obstante, las células NK pueden discriminar entre las células anfitrionas normales y las células infectadas o “anormales”. Las células infectadas y las células tumorales a menudo regulan negativamente la expresión de MHC de clase I para escapar al reconocimiento por linfocitos T citotóxicos (CD8+), pero esto da como resultado su vulnerabilidad al ataque de células NK. En esta condición, los receptores de activación ya no son suprimidos e inducen señales estimulantes potentes, por lo tanto, inclinando la balanza a favor de la activación de las células NK (Figura 1). Esta condición a menudo se denomina auto-reconocimiento inducido (Poli et al. 2009).

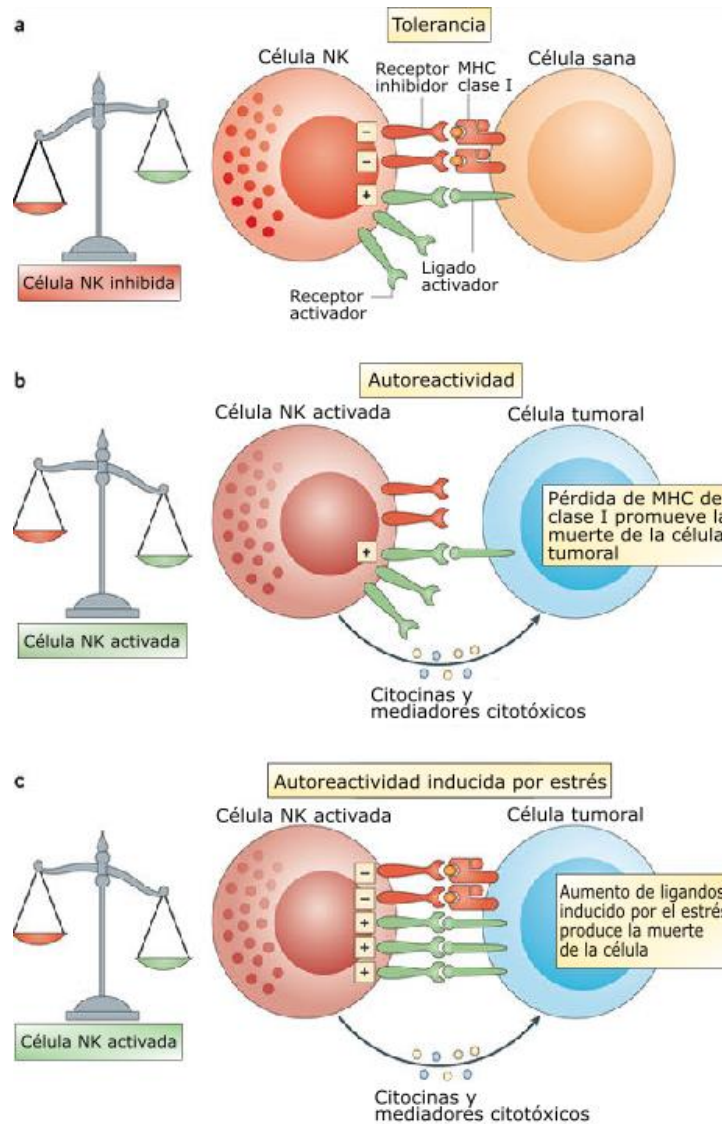


Figura 1. Células NK reconocen células tumorales. a) Las células NK son tolerantes a las células sanas del hospedero, ya que la fuerza de las señales de activación que reciben al encontrar estas células se ve atenuada por los receptores inhibidores (tolerancia). b) Las células tumorales pueden perder expresión de moléculas MHC de clase I, como resultado las células NK se activan al no ser retenidas por las señales inhibitorias. c) Además, las células NK se activan al reconocer células estresadas que regulan positivamente los ligandos activadores de las células NK, de ese modo superan la señalización inhibitoria liberada por las moléculas MHC de clase I. En ambas condiciones, la activación de las células NK conduce a la eliminación del tumor directamente (a través de la citotoxicidad mediada por células NK) o indirectamente (a través de la producción de citocinas proinflamatorias). Modificado de Vivier et al. 2012.

3.2.1 Receptores de células NK de tipo Inmunoglobulina

Los KIR pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas y se caracterizan estructuralmente por 2 ó 3 dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina. Los KIR reconocen específicamente los alelos MHC de clase I, incluidos los grupos de HLA-A, HLA-B, y HLA-C. Existen 2 conjuntos de KIR funcionalmente distintos: inhibidores y activadores. Cada conjunto tiene un dominio extracelular idéntico y, en consecuencia, cada conjunto se une a ligandos idénticos. Sin embargo, debido a las diferencias en sus dominios transmembranales e intracelulares, un conjunto de KIR señala una respuesta inhibitoria (dominios ITIM intracelulares) y un conjunto señala una respuesta de activación (por el intermedio de moléculas adaptadoras que tienen dominios ITAM) (Figura 2).

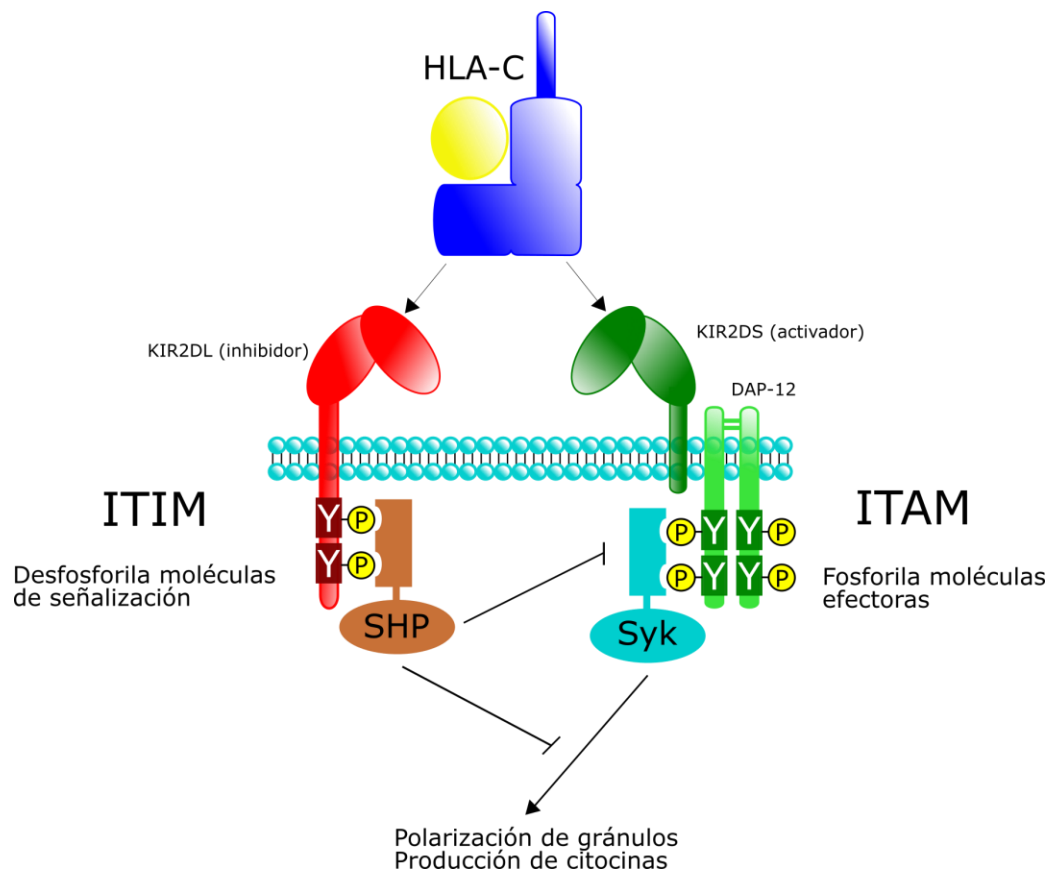


Figura 2. Representación esquemática de la funcionalidad del KIR inhibidor y activador. Los receptores KIR tienen dos o tres dominios de inmunoglobulina (2D o 3D) y una cola citoplásmica larga (L) que contiene motivos de inhibición basados en tirosina de inmunoreceptores (ITIM, ejemplificado con recuadros en color rojo), o una cola citoplásmica corta (S) acoplada a proteínas adaptadoras, como DAP-12. Cuando los KIR inhibidores se unen a su ligando HLA, la familia de cinasas SRC (no mostrada) fosforila el ITIM, permitiendo la unión de la tirosina fosfatasa SHP-1/2 a través de su dominio SH2. SHP-1/2 es capaz de desfosforilar

múltiples objetivos en la ruta de activación de los motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores (ITAM, ejemplificado en recuadros de color verde), mediando negativamente su señal. En contraste, los KIR activadores a través de su dominio transmembranal cargado positivamente, se asocian con la molécula adaptadora DAP-10, y cuando se unen a su ligando, las cinasas de la familia SRC fosforilan los ITAM de la proteína DAP-10, uniéndose y activando las tirosina cinasas de la familia ZAP70 (no mostrada) y Syk, los cuales desencadenan la cascada de activación.

3.2.2 Familia de receptores de lectina tipo C

Esta familia de receptores se caracteriza por poseer dominios extracelulares de lectina de tipo C. La mayoría están estructurados por un heterodímero, conformado por una subunidad común (CD94) unida covalentemente a una cadena distinta codificada por un gen de la familia NKG2, de la cual se han identificado cuatro transcritos: NKG2A (y su variante por splicing, NKG2B), NKG2C, NKG2E (y su variante por splicing, NKG2H), y NKG2F. NKG2D es un quinto miembro, siendo el receptor activador mejor descrito en las células NK. A diferencia de las otras proteínas NKG2, NKG2D tiene poca homología y no se asocia con CD94, presentándose como un homodímero. El dominio intracelular de NKG2D no tiene ningún motivo de señalización y, por lo tanto, esta depende de su asociación con DAP10, una proteína adaptadora (Figura 3). NKG2D se expresa en células NK, células T $\gamma\delta$, células T CD8⁺ y algunas células T CD4⁺ autorreactivas o inmunosupresoras. En humanos, NKG2D es el principal regulador de respuesta inmune, ya que sus ligandos únicamente se expresan en células estresadas, ya sea por patógenos intracelulares o en células cancerosas. Entre estos ligandos se incluyen MICA y MICB (proteínas A y B relacionadas con la cadena de clase I del MHC), y hasta seis proteínas diferentes llamadas ULBP (proteínas de unión a UL16), también conocidas como RAET1.

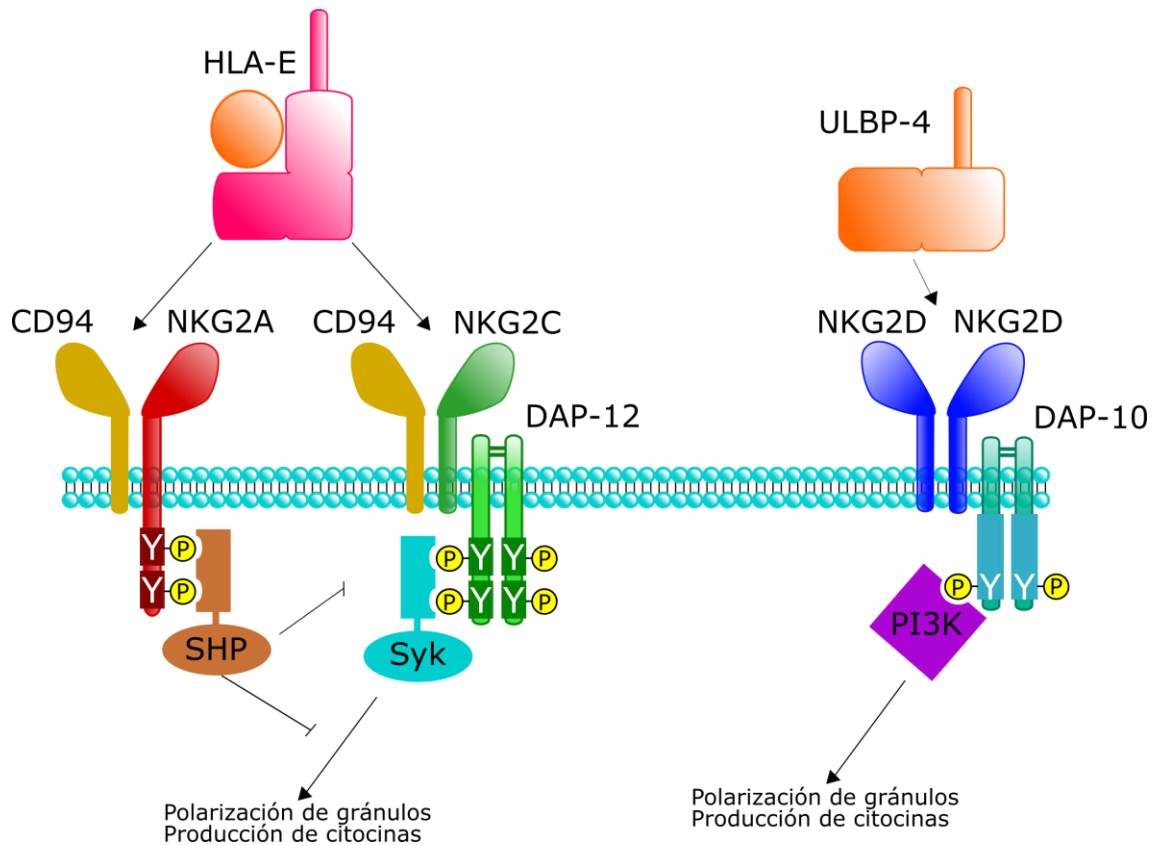


Figura 3. Representación esquemática de los receptores de lectina tipo C. Se trata de un heterodímero, entre CD94 y una proteína de la familia NKG2, ya sea el inhibidor NKG2A o el activador NKG2C, y reconocen la molécula de MHC de clase I no clásica HLA-E. Al igual que los KIR con largas colas citoplásmicas, NKG2A posee un dominio ITIM, el cual interactúa con SHP-1/2, mediando señales inhibitorias. Por otro lado, NKG2C tiene un dominio transmembranal cargado positivamente que interactúa con DAP-12 y transduce señales de activación a través de la interacción con las cinasas ZAP70 (no mostrada) y Syk. En contraste, NKG2D no se asocia con CD94, se encuentra como homodímero y se une a los ligandos similares a MHC: MICA, MICB y la familia ULBP (se esquematiza ULBP-4). A través de su dominio transmembranal cargado positivamente, NKG2D se asocia con la molécula adaptadora DAP-10 que contiene un motivo YXNK (representado con recuadros color azul celeste) para unirse a la cinasa PI-3 (PI3K) y enviar señales de activación a través de esta ruta alternativa. Como la cascada PI3K no está inhibida por SHP-1/2, NKG2D puede ser capaz de mediar una señal de activación dominante.

3.2.3 Receptores de Citotoxicidad Natural

Otro grupo principal de receptores activadores, de la familia de las inmunoglobulinas, son los Receptores de Citotoxicidad Natural (NCR), los cuales son: NKp30 (también conocido como NCR3, NCTR3, y CD337), NKp44 (NCR2, NCTR2, CD336) y NKp46 (NCR1, NCTR1, CD335). Los NCR carecen de un dominio para una señalización intracelular

activadora, por lo que se acoplan a proteínas adaptadoras. La unión de uno o más de estos receptores con un ligando específico induce una fuerte activación de las células NK, donde varios estudios han identificado y caracterizado los ligandos de NCR. Si bien, muchos ligandos de NCR permanecen sin identificar, se cree que no son expresados por células normales sino inducidos por estrés celular o condiciones patológicas.

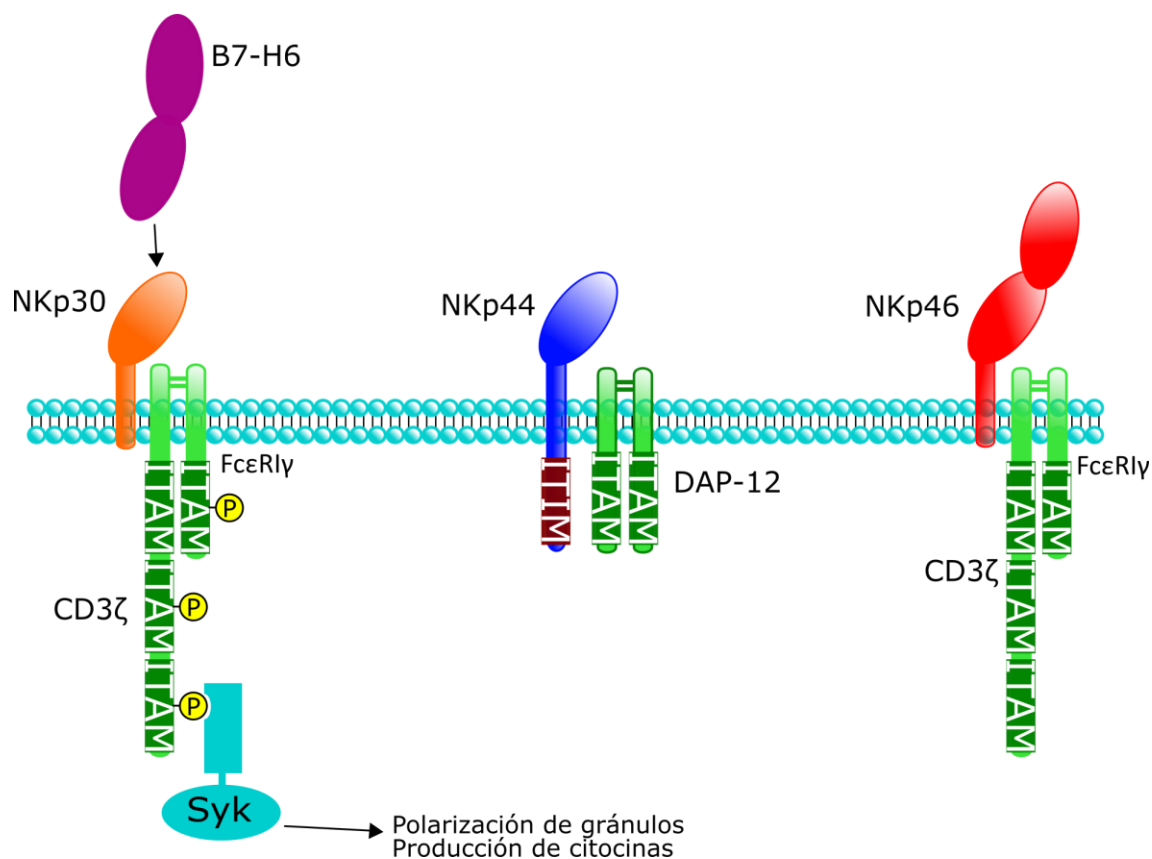


Figura 4. Representación esquemática de la funcionalidad de los NCR en humanos. Todas las NCR son proteínas de membrana de tipo I que comprenden uno (NKp30 y NKp44) o dos (NKp46) dominios similares a inmunoglobulina. En particular, NKp44 contiene un único inhibidor basado en tirosina de inmunoreceptores (ITIM) en su cola citoplásmica que, sin embargo, puede no ser funcional. Los motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores (ITAM) de las moléculas adaptadoras se muestran como recuadros en color verde. NKp30 se muestra interactuando con su ligando, B7-H6, lo cual desencadena la fosforilación de ITAM mediada por la cinasa de la familia SRC (no mostrada), resultando en el reclutamiento y activación de las cinasas ZAP70 (no mostrada) y Syk, que desencadenan la cascada de activación.

3.3 Subtipos de células NK

Existen tres principales subtipos de células NK que se reconocen por poseer diferentes marcadores: las células $CD56^{\dim}CD16^{+/-}$, $CD56^{\text{bright}}CD16^{+/-}$ y $CD56^-CD16^+$. Los

subconjuntos CD56^{dim} y CD56^{bright} son los más estudiados y se clasifican fenotípicamente como subconjuntos con mayor actividad citotóxica y mayor expresión de citocinas, respectivamente (Poli et al. 2009).

3.3.1 CD56^{bright}

Este subtipo comprende del 5-10% de células NK en PBMC, debido a que se encuentran principalmente en tejidos linfoides secundarios, como amígdalas, ganglios linfáticos y el bazo (Poli et al. 2009), aunque también se localizan en el hígado (Van Acker et al. 2017) y el útero (Manaster and Mandelboim 2010). Expresan altos niveles de L-selectina funcional (CD62L), una molécula de adhesión que media las interacciones iniciales con el endotelio vascular. Junto con la expresión de CCR7, la expresión de L-selectina sugiere la capacidad de traficar hacia los órganos linfáticos secundarios (Frey et al. 1998). Sólo las células CD56^{bright} expresan el marcador de células madre hematopoyéticas CD117 (c-kit), poseen niveles más bajos de proteínas efectoras citotóxicas (granzimas), expresan CD16 de manera parcial y confían en los receptores CD94/NKG2A en lugar de los KIR para la auto-tolerancia (Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001). Se ha reportado que las principales citocinas liberadas por las células CD56^{bright} son el factor de necrosis (TNF) α e interferón (IFN) γ , pero se han reportado otros factores inmunomoduladores como interleucina (IL)-5, -10, -13, el factor de crecimiento GM-CSF y las quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 y RANTES (Fauriat et al. 2010). Como resultado de estas propiedades, las células CD56^{bright} se consideran tradicionalmente como inmunomoduladores (Wagner et al. 2017).

3.3.2 CD56^{dim}

Este subtipo comprende la mayoría de las células NK, del 85-90% en sangre periférica. Las células CD56^{dim} carecen de expresión de L-selectina pero expresan PEN5, un epítipo de lactosamina sulfatada restringida a células NK, que, en combinación con PSGL-1 (ligando 1 de la glicoproteína P-selectina), media la unión a L-selectina (André et al. 2000), implicando potenciales interacciones entre las células CD56^{bright}L-selectina⁺ y las células CD56^{dim}PEN5/PSGL-1⁺. Poseen alta actividad citotóxica y expresan un receptor de baja afinidad para la región constante de la Inmunoglobulina G, *Fc γ RIIIa* (CD16) (Moretta 2010). La expresión de los receptores inhibidores difiere entre los subtipos de NK, y este subtipo exhibe una menor expresión de KIR e LILRB1, pero una expresión más alta de

CD94/NKG2A en comparación con las células CD56^{bright} (Poli et al. 2009). Las células CD56^{dim} también poseen mayor expresión de proteínas efectoras citotóxicas (granzimas), en comparación con las células CD56^{bright} (De Maria et al. 2011).

3.3.3 CD56⁻

Esta población en individuos sanos es poco frecuente, menos del 5% del total de células NK, posee funcionalidad siendo capaces de desencadenar diferentes mecanismos citotóxicos como la desgranulación y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (D. Mavilio et al. 2003; Müller-Durovic et al. 2019). En individuos con viremia-VIH, la población de células NK CD56⁻CD16⁺ se expande significativamente en PBMC, comprendiendo entre 20-55% de células NK. Comparadas con las células CD56⁻CD16⁺ provenientes de donantes sanos, las células CD56⁻CD16⁺ de pacientes con viremia-VIH exhiben una menor expresión de receptores activadores NKp46, NKp30 y NKp44, menor actividad citotóxica, mayores niveles de expresión de receptores inhibidores y niveles más bajos de expresión de citocinas incluyendo IFN γ , TNF α y GM-CSF (Domenico Mavilio, Hosmalin, and Scott-Algara 2010). Este subconjunto también se expande en individuos con infección crónica por el virus de hepatitis C, citomegalovirus, hantavirus, así como en enfermedades autoinmunes como la miastenia gravis ocular (Van Acker et al. 2017). Por lo tanto, la expansión de este subconjunto de NK pobremente funcional es clínicamente relevante en enfermedades virales crónicas.

3.4 Mecanismos citotóxicos

Una vez que la célula blanco es reconocida por las células NK, su capacidad citotóxica está mediada a través de dos vías predominantes que requieren contacto directo entre las células NK y las células diana: vía perforina/granzima (desgranulación) o la vía mediada por receptores de muerte celular; de Fas o TRAIL-R (Nouroz et al. 2016).

3.4.1 Desgranulación

En la primera vía ocurre la desgranulación, la cual se produce cuando los microtúbulos se movilizan por polarización y transportan los gránulos citotóxicos hacia la sinapsis formada entre la célula NK y la célula diana (Voskoboinik, Whisstock, and Trapani 2015). Estos gránulos citotóxicos poseen una bicapa lipídica que contiene glicoproteínas de

membrana asociadas a lisosomas (LAMP) que incluyen a CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) y CD63 (LAMP-3). Una vez que los gránulos alcanzan la membrana plasmática de la célula NK, las membranas se fusionan permitiendo la liberación de perforinas (proteínas disruptoras de membrana) y granzimas (familia de serin-proteasas). La ruta granulo-exocitosis activa potentemente los mecanismos de muerte celular que operan a través de la activación de cisteín-proteasas apoptóticas (caspasas), pero también puede causar la muerte celular en ausencia de la activación de caspasas (Smyth et al. 2005). Otras proteínas que pueden ser liberadas en este proceso son las granulosinas. Estas son proteínas presentes en los gránulos de las células NK y son líticas frente a microorganismos y células tumorales al formar poros en la membrana citoplasmática (Gamen et al. 1998; Stenger et al. 1998).

Como consecuencia del proceso de desgranulación, las glicoproteínas CD107a, CD107b y CD63 se localizan en la superficie celular (Zaritskaya et al. 2010).

3.4.1.1 CD107a (LAMP-1)

La detección del marcador CD107a con anticuerpos a la superficie de células NK es aplicable para la evaluación de la actividad de las células NK (Zaritskaya et al. 2010). La expresión de CD107a se ha correlacionado tanto con la secreción de citocinas como con la actividad citotóxica mediadas por las células NK, representando un buen marcador para la actividad funcional de éstas (Alter, Malenfant, and Altfeld 2004), pudiéndolas clasificar como células NK CD107a⁺ (Tomescu et al. 2009).

3.4.2 Acoplamiento de receptores de muerte

La segunda vía implica la asociación de los receptores de muerte de la célula diana (Fas o TRAIL-R) con los ligandos de las células NK (FasL o TRAIL), lo que resulta en una vía extrínseca de la apoptosis clásica.

3.4.3 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) también puede ser un mecanismo de eliminación de células tumorales por células NK, ya que al poseer el receptor CD16 (FC γ RIII) este se une a la porción Fc de anticuerpos IgG. Tras la ligación, induce una potente serie de señales que dan como resultado la producción de citocinas y la actividad efectora citotóxica a través de ADCC (Romee et al. 2013).

3.5 Agotamiento de las células NK

Dependiendo del subtipo, las células NK expresan diferentes combinaciones de receptores inhibidores o activadores, que dan como resultado una diversidad dentro de la población de células NK con la capacidad de responder a una variedad de estímulos, bajo diferentes condiciones patológicas. Sin embargo, durante una enfermedad viral y en los tumores humanos establecidos, a menudo hay unas pocas células NK infiltrantes, siendo poco probable que contribuyan a la eliminación de estas células (Albertsson et al. 2003; Domenico Mavilio, Hosmalin, and Scott-Algara 2010). Los cambios en el repertorio de receptores de las células NK y la expresión de los ligandos en las células diana, pueden resultar en una baja actividad de las células NK (Höglund and Ljunggren 2010).

En estos casos, las células NK muestran funciones efectoras alteradas (Figura 4). Por ejemplo, la progresión del mieloma múltiple en ratones se ha asociado con porcentajes reducidos de células NK (Guillerey et al. 2015). A niveles de células individuales, las células NK infiltrantes de tumores (TiNKs) produjeron una disminución de las citocinas efectoras IFN- γ y GM-CSF en modelos de ratón (Paul, Kulkarni, and Lal 2016). Las células NK de pacientes con cáncer mostraron una actividad citolítica disminuida, como lo demuestra la menor expresión de las moléculas citolíticas, como las granzimas, la perforina, FasL y TRAIL (Peng et al. 2013). Las células NK intratumorales de pacientes con diversos tipos de cáncer produjeron una disminución de IFN- γ , CD107a, granzima B y perforina, mostrando además una actividad citotóxica deteriorada en comparación con las células NK de las regiones peritumorales o de sangre periférica (Bi and Tian 2017). Tal agotamiento de las funciones de las células NK es el resultado de un proceso activo en tumores o infecciones crónicas, ya que las células NK murinas transferidas de forma adoptiva a ratones con leucemia perdieron rápidamente la producción de IFN- γ , seguido de una pérdida de citotoxicidad después de la proliferación homeostática en presencia de tumor (Gill et al. 2019).

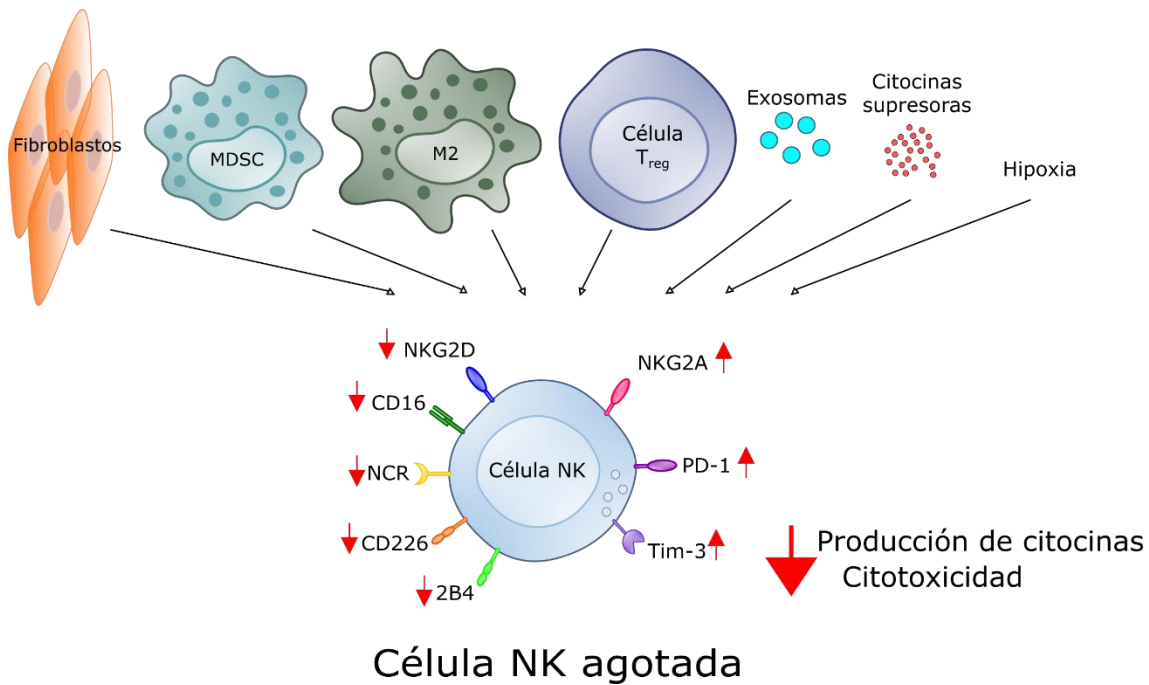


Figura 5. Agotamiento de las células NK. Las células NK agotadas se caracterizan por una menor producción de citocinas efectoras (por ejemplo, $\text{IFN-}\gamma$), así como por una actividad citotóxica alterada. Poseen baja expresión de ciertos receptores activadores y la expresión aumentada de los receptores inhibidores. Tanto las células supresoras como otros factores supresores (por ejemplo, exosomas, citocinas supresoras, hipoxia, etc.) en tumores o infecciones crónicas pueden contribuir a dicho estado de agotamiento.

Las células tumorales, a través de su capacidad para producir citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) $-\alpha$ y el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), inducen el reclutamiento de células mieloides CD45^+ derivadas de médula ósea (Mantovani et al. 2008). Las células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC), son uno de los principales componentes de la red inmunosupresora responsable del deterioro de la inmunidad, poseen una serie de mecanismos inhibidores, como la excreción de IL-10 y COX2, el secuestro de cisteína, y la inhibición de la expresión de NKG2D e $\text{IFN-}\gamma$, a través del factor de crecimiento transformante (TGF) $-\beta$ unido a su membrana (Li et al. 2009; Mantovani et al. 2008). Además, en condiciones de hipoxia, las MDSC son capaces de diferenciarse a macrófagos asociados a tumor (TAM) gracias a la producción del factor inducible por hipoxia (HIF) $1-\alpha$ por parte de estas MDSC (Corzo et al. 2010). Aunque los macrófagos contribuyen a la muerte de las células tumorales en la respuesta inmune temprana a la neoplasia, su presencia en el microambiente tumoral se correlaciona con un mal

pronóstico para los pacientes con estadios avanzados de cáncer (Bingle, Brown, and Lewis 2002). Ya que los TAM regulan positivamente la expresión de la metaloproteinasa de matriz (MMP) -7 en su superficie, lo que conduce a la escisión del receptor Fas de las células cancerosas, haciéndolas menos susceptibles a las células NK (Burke et al. 2003). Además, la exposición de los TAM a citocinas, como la IL-4 y -10, los diferencia en macrófagos M2, los cuales poseen actividades inmunosupresoras y pro-angiogénicas (Webb et al. 2007).

También se ha establecido que, mediante el reclutamiento de células T reguladoras (T_{reg}), el tumor logra la tolerancia inmune a las células NK. Las células cancerosas que secretan la citocina inmunosupresora TGF- β , posteriormente inducen la proliferación y la acumulación de células T_{reg} en el microambiente tumoral (Deng et al. 2013). Además, las células T_{reg} regulan negativamente el receptor activador NKG2D en la superficie de las células NK, a través del TGF- β unido a su membrana (Ghiringhelli et al. 2005).

El microambiente tumoral, mediante la liberación de TGF- β o IL-6, también puede activar a los fibroblastos asociados al cáncer (CAF). Estos son capaces de inhibir la expresión de los receptores activadores NKp44 y NKp30 mediante la excreción de prostaglandina E2 (PGE2) producida por los CAF (Giannoni et al. 2010). Los CAF también pueden impactar mediante la liberación de factores como IL-6, TGF- β , VEGF, SDF-1, CXCL1/2 e IL-1 β (Pietras and Östman 2010).

Las citocinas y metabolitos que suprimen directamente la maduración, la proliferación y las actividades funcionales de las células NK incluyen: el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , adenosina, prostaglandina E2 (PGE2), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), entre otros (Baginska et al. 2013; Guillerey, Huntington, and Smyth 2016; Waldhauer and Steinle 2008).

3.6 Inmunomoduladores

El bloqueo de los puntos de control inmunitarios, como parte importante de la inmunoterapia, resultó efectivo para revertir el agotamiento de las células T y aumentar la inmunidad antitumoral (Waldhauer & Steinle, 2008). Sin embargo, en la inmunoterapia para tumores e infecciones crónicas, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-PD-1, solo o adicional a un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, ha mostrado beneficios clínicos sólo para algunos pacientes, lo que sugiere la necesidad de combinar terapias adicionales que

contrarresten los mecanismos inmunosupresores por tumores o células infectadas. En este contexto, los tratamientos pueden enfocarse en revitalizar a las células NK y proporcionar inmunidad adicional.

La administración de citocinas generalmente se usa para expandir a las células NK transferidas de forma adoptiva, siendo la IL-2 la más utilizada en la clínica. No obstante, la IL-2 también activa a las células T_{reg}, las cuales dificultan la actividad de las células NK (Burns et al. 2003). Por otro lado, el empleo de IL-15 no activa las células T_{reg}, y estimulan de manera simultánea a las células NK y a las células T CD8⁺, sin embargo, aún no se ha demostrado su inocuidad (Conlon et al. 2015). Otras citocinas, tales como IL-12, -18 y -21, podrían potenciar las respuestas de las células NK (Guillerey, Huntington, and Smyth 2016).

Algunos agentes antitumorales tienen propiedades que modulan la actividad de las células NK más allá de su toxicidad directa hacia las células cancerosas. Tales agentes son los fármacos genotóxicos, los inhibidores del proteosoma o los fármacos inmunomoduladores (IMiD). Estos sensibilizan a las células tumorales a la muerte mediada por células NK, mediante la alteración en la expresión de moléculas de superficie (regulación a la baja de moléculas HLA y regulación positiva de los ligandos activadores). Sin embargo, los agentes genotóxicos resultan en la inmunosupresión del paciente (Krieg and Ullrich 2012).

Otras estrategias son el empleo de fármacos inmunomoduladores como el inhibidor de tirosina cinasa, Imatinib, el cual estimula la función de las células NK indirectamente, a través de la activación de otros subconjuntos de células inmunes como las células dendríticas (DC) (Krieg and Ullrich 2012).

CD39 y CD73 son dos enzimas expresadas en el microambiente tumoral que contribuyen a la producción del metabolito inmunosupresor adenosina. El bloqueo de estas dos enzimas a través de anticuerpos o el empleo moléculas pequeñas inhibitoras restaura la función de las células NK. Alternativamente, bloqueo del receptor adenosina de alta afinidad (A2AR) podría prevenir el efecto supresor directo de la adenosina en las células NK (Young et al. 2014).

Finalmente, la citocina inmunosupresora TGF- β sustancialmente reprime la actividad de las células NK, y esta ruta puede bloquearse neutralizando a la citocina o a su receptor, pero cabe recordar que esta citocina no sólo interactúa con las células NK, por lo que los efectos de su inhibición aún no han sido definidos (Viel et al. 2016).

Debido a la problemática que representan aún los tratamientos actuales, se siguen buscando nuevas alternativas inmunomoduladoras que sean inocuas. Como el empleo de Extractos Dializables de Leucocitos.

3.6.1 Extractos Dializables de Leucocitos

Los Extractos Dializables de Leucocitos (EDL) son un tipo de inmunoterapia que consiste en una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular obtenidas de sangre o tejido linfoide. Los EDL tienen propiedades inmunomoduladoras debidas a pequeños péptidos, denominados "factor de transferencia" (TF) (Arnaudov 2016). El factor de transferencia, el componente principal del EDL, tiene un peso molecular de 3.5-6.0 kDa y consiste en pequeños péptidos y oligorribonucleótidos (Sánchez-González, Sosa-Luna, and Vásquez-Moctezuma 2011). El ribonucleótido está unido al extremo amino del péptido. La actividad específica de TF se debe a los péptidos que pesan 5.0 kDa (Kirkpatrick 1993). El resto de los componentes en los extractos tienen diferentes propiedades bioquímicas e inmunológicas.

Se ha demostrado que los EDL transfieren la inmunidad mediada por células de un donador inmune a un receptor no inmune (Lawrence 1955), y se han observado efectos benéficos al implementarse en padecimientos como inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, bacterianas, asma, alergias y algunos tipos de cáncer (Arnaudov 2016; Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Castillo-Tello, et al. 2006; Salazar-Ramiro et al. 2016; Sánchez-González, Sosa-Luna, and Vásquez-Moctezuma 2011). Un ejemplo destacable de los EDL es el IMMUNEPOTENT-CRP® (I-CRP).

3.6.2 El IMMUNEPOTENT-CRP®

El I-CRP es un EDL de bazo bovino con sustancias menores a 12 kDa. Actualmente se utiliza como tratamiento para una gran variedad de inmunodeficiencias, enfermedades bacterianas, asma, alergias, enfermedades auto-inmunes y como adyuvante para el

tratamiento de cáncer con terapias tradicionales (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Miranda-Hernández, et al. 2006). Algunos estudios con el I-CRP han demostrado que es capaz de modificar la respuesta inmune, facilitando la habilidad de los linfocitos para destruir las células cancerosas (Franco-Molina et al. 2010, 2011; Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Miranda-Hernández, et al. 2006; Lara, Ixtapan-Turrent, et al. 2010) y mejorar la calidad de vida en pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de mama, observando un aumento de los leucocitos totales y las subpoblaciones de los linfocitos T, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ y CD56⁺ (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Miranda-Hernández, et al. 2006; Lara, Ixtapan-Turrent, et al. 2010).

El I-CRP podría ser un tratamiento prometedor contra el cáncer, ya que se ha demostrado que es capaz de inducir muerte celular en líneas tumorales de cérvix (Martinez-Torres et al. 2018), melanoma (Franco-Molina et al. 2010-2006), mama, pulmón, y linfoma, causando la fragmentación del DNA en células MCF-7 (cáncer de mama) y en células HeLa (cáncer cérvicouterino) (Martinez-Torres et al. 2018). Todo ello sin ocasionar daño a las células mononucleares de sangre periférica (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Miranda-Hernández, et al. 2006). Además, en modelos murinos con un tumor implantado de células B16F10, el I-CRP (sólo y en combinación con oxiplatino) induce la liberación de patrones asociados a daño (DAMPs), tales como exposición de calreticulina, y liberación extracelular de adenosin-trifosfato (ATP), HSP70, HSP90 y HMGB1 (Rodríguez-Salazar et al. 2017).

El I-CRP no sólo ha demostrado su capacidad citotóxica de manera selectiva, también se ha reportado que posee un efecto quimioprotector contra el 5-flourouracilo en ratones Balb/c, aumentando el número de células de la médula ósea y CFU-GM, aumentando los porcentajes de granulocitos, mejorando los niveles hematológicos y recuperando la ganancia de peso de los ratones tratados (Coronado-Cerda et al. 2016).

Está demostrado que la modulación de las citocinas puede modificar la actividad biológica, la expresión de marcadores de membrana, y el crecimiento de las células NK. Por ello, es probable que los efectos inducidos por el I-CRP podrían mejorar la actividad de las células NK y su proliferación.

IV. JUSTIFICACIÓN

En las infecciones crónicas y en los tumores establecidos, la evasión del sistema inmune y el agotamiento de las células citotóxicas, continúan siendo un problema por resolver. Además, los tratamientos actuales son poco eficientes y pueden llegar a ser tóxicos en dosis altas. Como ya se ha expuesto, las células NK llevan a cabo un rol determinante en la *inmunovigilancia* contra estas patologías. Por su parte, el IMMUNEPOTENT-CRP® (I-CRP) ha demostrado poseer actividades inmunomoduladoras, principalmente en células de origen mieloide. Por lo que determinar y analizar los efectos potenciadores que ejerce sobre las células NK ayudará a comprender la funcionalidad del I-CRP, para así en un futuro poder implementarse en la clínica para el control de la progresión de enfermedades donde la hiporeactividad de las células NK juega un rol importante, tanto en casos de cáncer como en las infecciones crónicas por diversos virus, como los flavivirus (como el virus de la fiebre amarilla, el dengue y el virus del Nilo occidental), el virus de la hepatitis, el virus de la influenza y las infecciones con VIH-1.

V. HIPÓTESIS

El IMMUNEPOTENT-CRP® activa y mejora la capacidad efectora de las células NK.

VI. OBJETIVO GENERAL

Analizar la activación de las células NK tratadas con el IMMUNEPOTENT-CRP®.

6.1 Objetivos específicos

1. Analizar la viabilidad en las PBMC al ser tratadas con diferentes concentraciones de IMMUNEPOTENT-CRP.
2. Determinar la activación de PBMC y las células NK aisladas, tratadas con IMMUNEPOTENT-CRP.
3. Estudiar la capacidad efectora de las células NK estimuladas con IMMUNEPOTENT-CRP contra la línea celular K562.
4. Evaluar la expresión de marcadores de células NK, en PBMC tratadas con IMMUNEPOTENT-CRP.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Después de firmar el consentimiento informado se colectó la sangre de donantes sanos (sin signos clínicos de enfermedad) con un rango de edad entre 21 y 35 años, independientemente de su sexo, para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante gradiente de densidad estándar con Ficoll-Paque. Se vació la sangre lentamente en tubos cónicos centrifugables de 50 mL y se realizó una dilución 1:1 en Buffer de fosfatos (PBS). Luego, se preparó otro tubo de 50 mL con 1/3 de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, UK) atemperado y 2/3 de la dilución sangre con PBS. Una vez realizada la dilución se centrifugó por 30 min a 400 gravedades, con la aceleración y frenado al mínimo. Se tomó la población correspondiente a las PBMC y se contabilizaron las células empleando una cámara de Neubauer, tiñéndolas con azul tripán. Se incubaron en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino, a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera controlada con 5% CO₂.

7.2 Aislamiento de células NK

Las células NK se aislaron en columnas magnéticas (Miltenyi Biotec, USA) mediante selección negativa, usando los anticuerpos: contra CD14, CD3, y CD20 acoplados a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se incubaron en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino, a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera controlada con 5% CO₂. La eficiencia de aislamiento se verificó mediante FACS con anticuerpos contra CD3 (555916) y CD20 (559776), de BD Biosciences, y se diferenciaron de los monocitos mediante tamaño y granularidad. Se sembraron por duplicado en placas de polipropileno con 96 pocillos de fondo cónico, y se recuperaron en un mismo tubo para reducir la variabilidad.

7.3 Líneas celulares

La línea celular K562 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvo en medio RPMI 1640 (Gibco®, US) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco®, US).

7.4 Ensayo de viabilidad y activación

La viabilidad se evaluó utilizando calceína-AM (Invitrogen™, US). Este se basa en substratos de esterases que no permanecen en el interior de la célula si el grupo AM está intacto. Una vez dentro de las células viables, las esterases activas escinden el grupo AM que permite que el colorante permanezca fluorescente en el interior de la célula. Se sembraron 1×10^5 PBMC por pocillo (placa de 96 pocillos con fondo redondo), y fueron tratadas con concentraciones crecientes de I-CRP (0.3 U/mL, 0.75 U/mL, 1.5 U/mL), Concanavalina A (1 mg/mL; Sigma-Aldrich, Germany) como control positivo, y células sin estimular como control negativo, todo esto durante los tiempos de 24 h y 48 h. Finalizado el tratamiento, se recuperaron las células en microtubos de 1.5 mL, se lavaron añadiendo PBS 1X y centrifugando a 1600 rpm (Centrifuge 5415 D; Eppendorf, Germany). Debido a que se analizan de forma simultánea con el marcador de activación (CD69), primero se realizó el marcaje de viabilidad, agregando 0.020 μ L de calceína-AM (Stock, 2mM) por muestra en un volumen de 100 μ L de FACS buffer. Se incubaron durante 20 min en oscuridad y se lavaron dos veces con 400 μ L de FACS buffer. Después se incubaron con anticuerpos contra CD69 (555533, BD Biosciences), durante 30 min. Se lavaron y se analizaron en el citómetro de flujo recolectando 10,000 eventos para las poblaciones de linfocitos y células grandes. Después se seleccionaron las poblaciones viables (calceína +) para analizar la expresión de CD69. Una vez que se obtuvo la dosis donde se observa una mayor expresión de CD69, se analizó la activación en las células NK aisladas, utilizando la concentración de 1.5 U/mL de I-CRP, usando IL-15 (15 ng/mL; Gibco®, US) como control positivo y células sin tratamiento como control negativo.

7.5 Ensayo de desgranulación (CD107a)

Las PBMC o las células NK fueron tratadas con 1.5 U/mL de I-CRP durante 24 h, y como controles células sin estimular y células tratadas con IL-2 (200 U/mL; R&D Systems®, US). Se realizaron triplicados por donante, destinando uno de los pocillos para medir viabilidad con naranja de acridina, utilizando LUNA-FL™ (Logos biosystems, France) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, esto con el objetivo de calcular la cantidad de células presentes para los pasos posteriores en los co-cultivos. Se realizaron dos lavados en los que se descartó el sobrenadante, y posteriormente se realizó un co-cultivo de 6h con la línea celular eritroleucémica K562 (en una relación NK:K562 de 5:1), diana de las células NK por carecer de HLA-I . Una hora después de poner a las células NK en contacto con las K562, se añadió 5µL de anti-CD107a (555800, BD Biosciences) en cada pocillo. El marcador de desgranulación, CD107a, se encuentra en la membrana de los gránulos citotóxicos y es expuesto durante el reconocimiento de las células diana y la liberación de granzimas y perforinas. Concluido el tiempo del co-cultivo, se añadieron los anticuerpos contra CD3 (555335), CD56 (555516) y CD16 (560717) de la compañía BD Biosciences, y se analiza la expresión de CD107a de las células NK mediante citometría de flujo, seleccionando la población linfocitos CD3-CD56+CD16+/- (Figura 6). Para evaluar la actividad citotóxica de las células NK aisladas, se sigue un protocolo similar, pero utilizando como control positivo un mix de *Phorbol 12-myristate 13-acetate* con ionomicina (PMA-iono) a una concentración de 5 ng/mL y 1µM, respectivamente. La PMA activa la proteína cinasa C, mientras que la ionomicina es un ionóforo de calcio, y la estimulación con ambas activan varias vías de señalización intracelular, resultando en la activación de las células NK y la producción de citocinas.

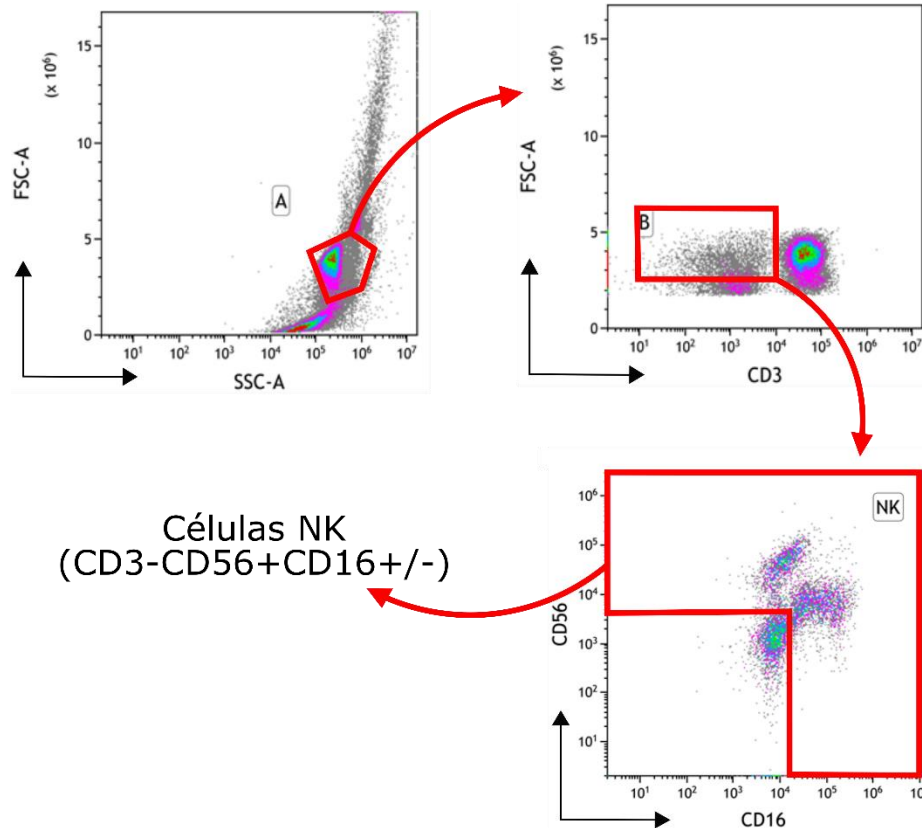


Figura 6. Estrategia de selección de células NK para el análisis de CD107a en PBMC.

7.6 Análisis de receptores de células NK

Se sembraron 1×10^5 PBMC por pocillo (placa de 96 pocillos con fondo redondo), las PBMC fueron tratadas con I-CRP (1.5 U/mL), IL-2 (200 U/mL) como control positivo, y células sin estimular como control negativo, durante los tiempos de 24 h y 48 h. Finalizado el tratamiento, se desechó el sobrenadante, manteniendo los pellets celulares. Después se colocó en los pocillos el mix de anticuerpos para cada combinación (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Combinaciones de anticuerpos para el análisis multicitométrico de marcadores y receptores de células NK.

Tubo	KO	ECD	Pacific Blue	AF-700	PE	APC	FITC	PE-Cy5	PE-Cy7
1	CD45 1.5 μ L	CD3 1 μ L	CD16 1.5 μ L	CD56 2 μ L	CD160 3 μ L	NKG2C 2 μ L	CD69 7.5 μ L		
2	CD45 1.5 μ L	CD3 1 μ L	CD16 1.5 μ L	CD56 2 μ L	NKp44 3 μ L		CD158a 3 μ L		
3	CD45 1.5 μ L	CD3 1 μ L	CD16 1.5 μ L	CD56 2 μ L	NKp30 3 μ L		CD158d 3 μ L		
4	CD45 1.5 μ L	CD3 1 μ L	CD16 1.5 μ L	CD56 2 μ L	CD85j 3 μ L	NKG2D 2.5 μ L	CD226 3 μ L	CD161 2 μ L	NKp46 2 μ L
5	CD45 1.5 μ L	CD3 1 μ L	CD16 1.5 μ L	CD56 2 μ L	CD158e 3 μ L				
6	CD45 1.5 μ L	CD3 1 μ L	CD16 1.5 μ L	CD56 2 μ L	CD158i 3 μ L	CD158b 3 μ L			

Tabla 4. Anticuerpos empleados para el análisis de receptores de células NK.

	Clon	Ref	Marca	País
CD45	J33	B36294	Beckman Coulter	France
CD3	UCHT1	A07748	Beckman Coulter	France
CD16	3G8	B36292	Beckman Coulter	France
CD56	B159	557919	BD Biosciences	US
CD160	191B8	IM3450	Beckman Coulter	France
NKp44	BAB281	B38703	Beckman Coulter	France
NKp30	Z25	IM3709	Beckman Coulter	France
CD85j	HP-F1	A07408	Beckman Coulter	France
CD158e1/2	Z27.3.7	IM3292	Beckman Coulter	France
CD158i	FES172	IM3337	Beckman Coulter	France
NKG2C	134591	FAB138A	R&D Systems	US
NKG2D	ON72	A22329	Beckman Coulter	France
CD158b/j	DX27	130-092-617	Miltenyi Biotec	Germany
CD69	L78	347823	BD Biosciences	US
CD158a/h	11PB6	FAB1844F	Miltenyi Biotec	Germany
CD158d	181703	FAB2238F	R&D Systems	US
CD226	DX11	559788	BD Biosciences	US
CD161	DX12	551138	BD Biosciences	US
NKp46	BAB281	B38703	Beckman Coulter	France

Se obtuvieron 30,000 eventos para la primera selección “Cells”, y a partir de ahí los análisis de expresión de los receptores de células NK se realizaron en la población de linfocitos CD45⁺CD3⁻CD56⁺CD16^{+/-} y en la población CD45⁺CD3⁺ (Figura 7). Los umbrales se establecieron utilizando controles de fluoróforos emparejados con isotipo. Los datos de eventos se analizaron en *Kaluza Analysis 2.1* y se reportan como % de eventos por encima del umbral.

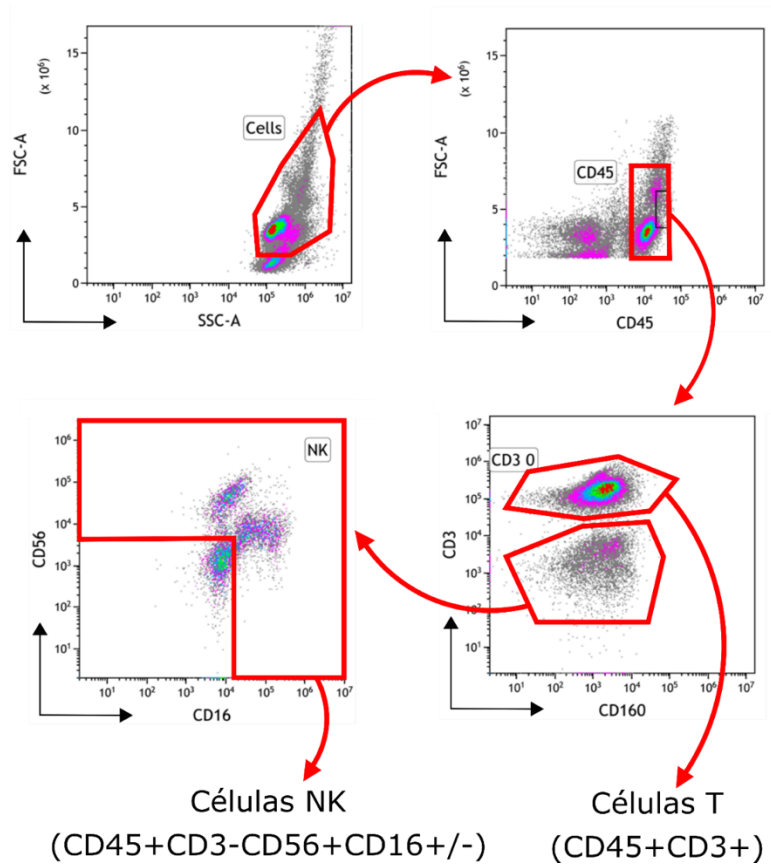


Figura 7. Estrategia de selección de células NK y células T para el análisis del repertorio de células NK.

7.7 Análisis estadístico

Se utilizó una n de 10 donantes para la viabilidad, de 6 para la activación en PBMC y 5 en las células NK aisladas, de 6 para la modulación de receptores de NK a 24 h, y de 8 para 48 h, y 5 para los co-cultivos. Se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney empleando el programa GraphPad Prism (San Diego, CA) en donde el grupo de tratamientos (I-CRP, IL-15, IL-2 o PMA-iono) se compararon contra el grupo control (sin tratamiento).

VIII. RESULTADOS

El IMMUNEPOTENT-CRP no reduce la viabilidad de las PBMC de donantes sanos

Se realizaron ensayos con Calceína-AM para observar los efectos del I-CRP sobre la viabilidad en PBMC (Figura 8). Se realizaron tratamientos con una duración de 24 y 48 h, donde se probaron de manera simultánea concentraciones crecientes de I-CRP (0.3, 0.7 y 1.5 U/mL), para ser comparadas contra el control sin tratamiento.

Los resultados muestran que no hay diferencia significativa en la pérdida de calceína (viabilidad) en células de donantes normales al compararse con el control, tanto a 24 h como a las 48 h.

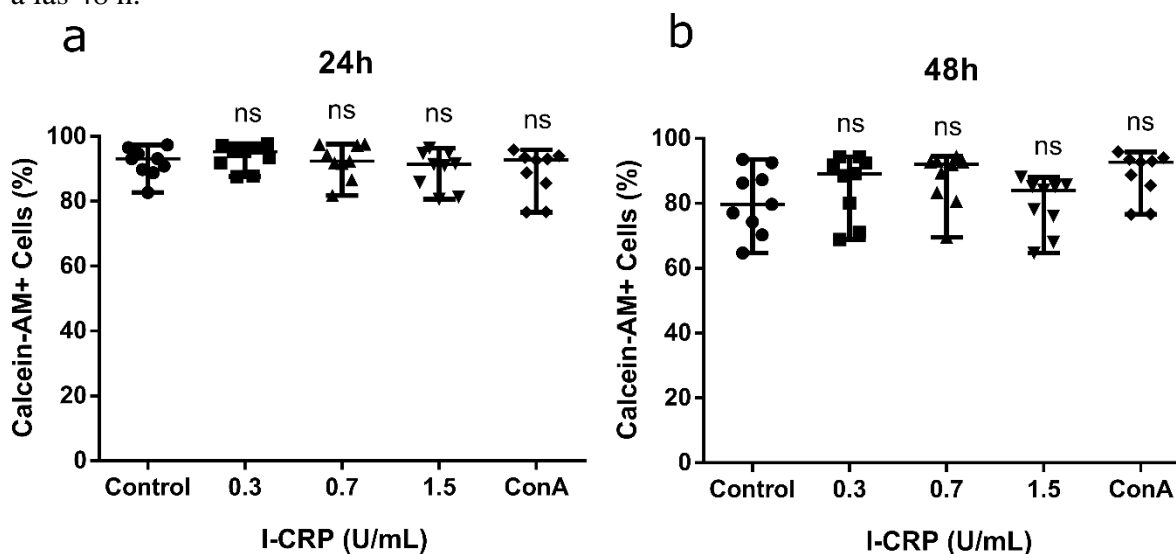


Figura 8. Viabilidad de PBMC al ser expuestas al I-CRP. Análisis del porcentaje de viabilidad determinada mediante el marcaje calceína-AM en PBMC tratadas con diferentes concentraciones de I-CRP (0.3, 0.7, 1.5 U/mL) durante a) 24 h y b) 48 h. Cada punto representa el promedio de un donante diferente y la línea central representa la media entre donantes. Se usó el análisis estadístico Mann-Whitney, se considera significativo $p < 0.05$.

El IMMUNEPOTENT-CRP induce la activación de las células NK de donantes sanos

Las PBMC fueron estimuladas con concentraciones crecientes de I-CRP durante 24 y 48 h, para compararse contra el control positivo (Concanavalina A, 1 mg/mL), observándose la expresión del marcador de activación, CD69, desde la concentración de 0.7 U/mL y una expresión máxima de este marcador (alrededor del 40%) hasta la concentración de 1.5 U/mL (Figura 9a y b). Después se estimularon las PBMC con 1.5 U/mL y se definieron las células

NK (CD3⁻CD56⁺CD16⁺, Figura 7), observándose una expresión de CD69 mayor al 30% a las 24 h (Figura 9c) y mayor al 50% a las 48 h (Figura 9d). Para determinar si la activación es un efecto directo del I-CRP, se aislaron a las células NK y se estimularon con 1.5 U/mL durante 24 h, observándose alrededor del 30% de células positivas para CD69 (Figura 9e), demostrando que el I-CRP induce directamente la activación de las células NK.

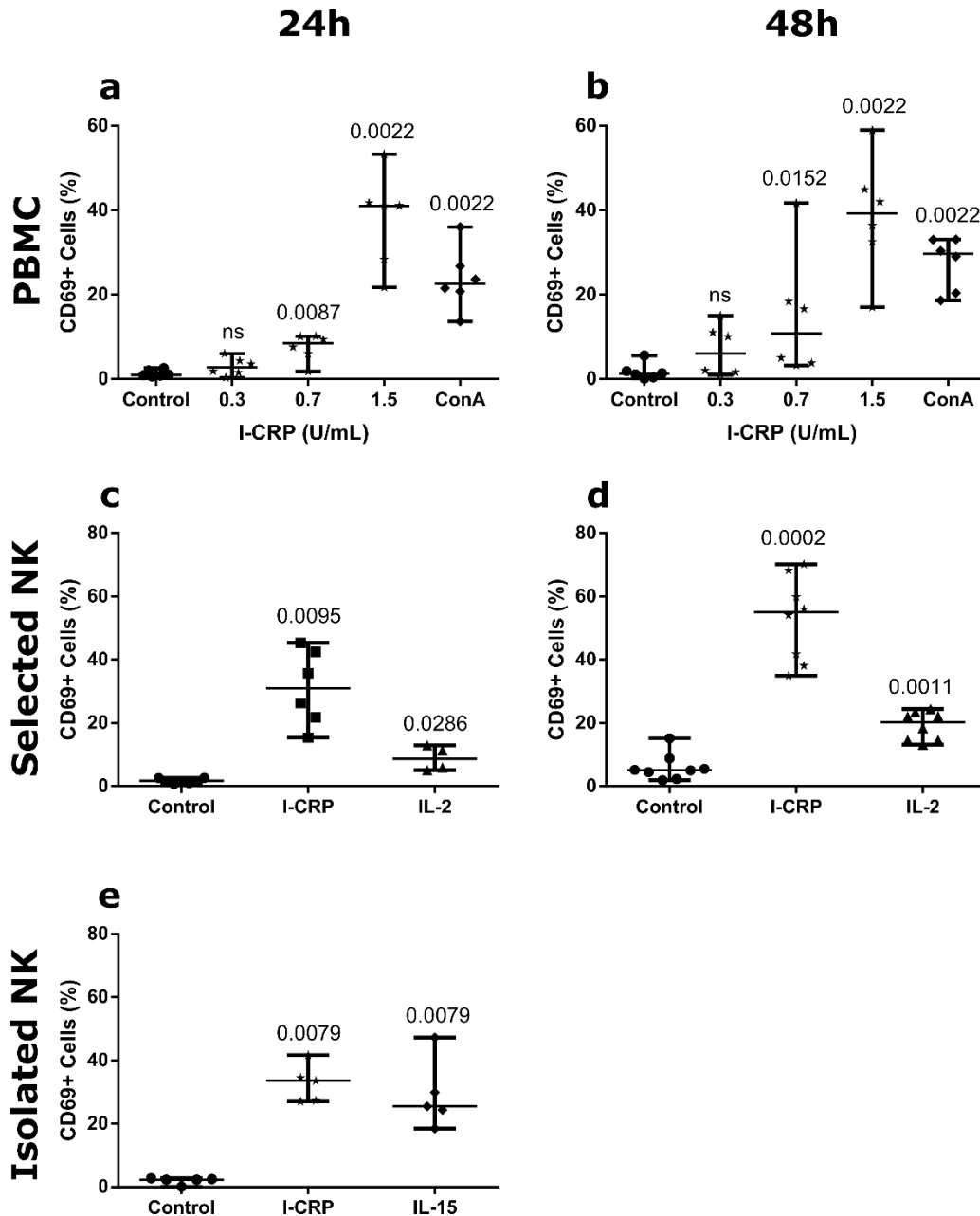


Figura 9. Activación de las células NK después del tratamiento con I-CRP. Porcentaje de PBMC positivas para el marcador CD69 después de a) 24 h y b) 48 h de tratamiento con I-CRP. Análisis de la expresión de

CD69 en las poblaciones de células NK ($CD3^-CD56^+CD16^{+/-}$) que fueron tratadas con I-CRP durante c) 24 h y d) 48 h. Y en e) se observa la expresión de CD69 en células NK aisladas después de 24 h de tratamiento. Cada punto representa el promedio de un donante distinto, y las líneas centrales la media entre donantes. Se usó el análisis estadístico Mann-Whitney, se considera significativo $p < 0.05$.

La línea celular K562 es reconocida con una eficacia mayor por las células NK estimuladas con el IMMUNEPOTENT-CRP

Con la intención de probar el potencial de las células NK activadas con el I-CRP, se realizaron co-cultivos contra la línea celular K562 y se evaluó la expresión del marcador de desgranulación CD107a, que representa una medición indirecta de la capacidad citotóxica para las células NK. Las PBMC se trataron con el I-CRP (1.5 U/mL) durante 24 h, a la par de un control negativo (sin estimular) y el control positivo (IL-2, 100 U/mL). Después se analizó la presencia de CD107a en la población de linfocitos $CD3^-CD56^+CD16^{+/-}$ (Figura 6), observándose que la estimulación con el I-CRP aumenta de manera significativa el reconocimiento de estas células (Figura 10a).

Para determinar si este efecto es directamente inducido por el I-CRP, a las células NK aisladas de donantes sanos se les dio un tratamiento de 24 h con 1.5 U/mL de I-CRP y se utilizó como control positivo la PMA-iono (5ng/mL-1uM). Como se observa en la Figura 10b, el I-CRP aumenta la actividad citotóxica de las células NK al observar un aumento altamente significativo del marcador CD107a.

Por otro lado, la presencia de CD107a se ha correlacionado con otros procesos además de la citotoxicidad, como la liberación de citocinas. Por ello se evaluó este marcador después de la activación con I-CRP pero antes del co-cultivo, observándose la presencia de CD107a de manera significativa en las células NK, sin embargo, la presencia de este marcador aumenta cuando están en contacto con las células K562 (Figura 10c).

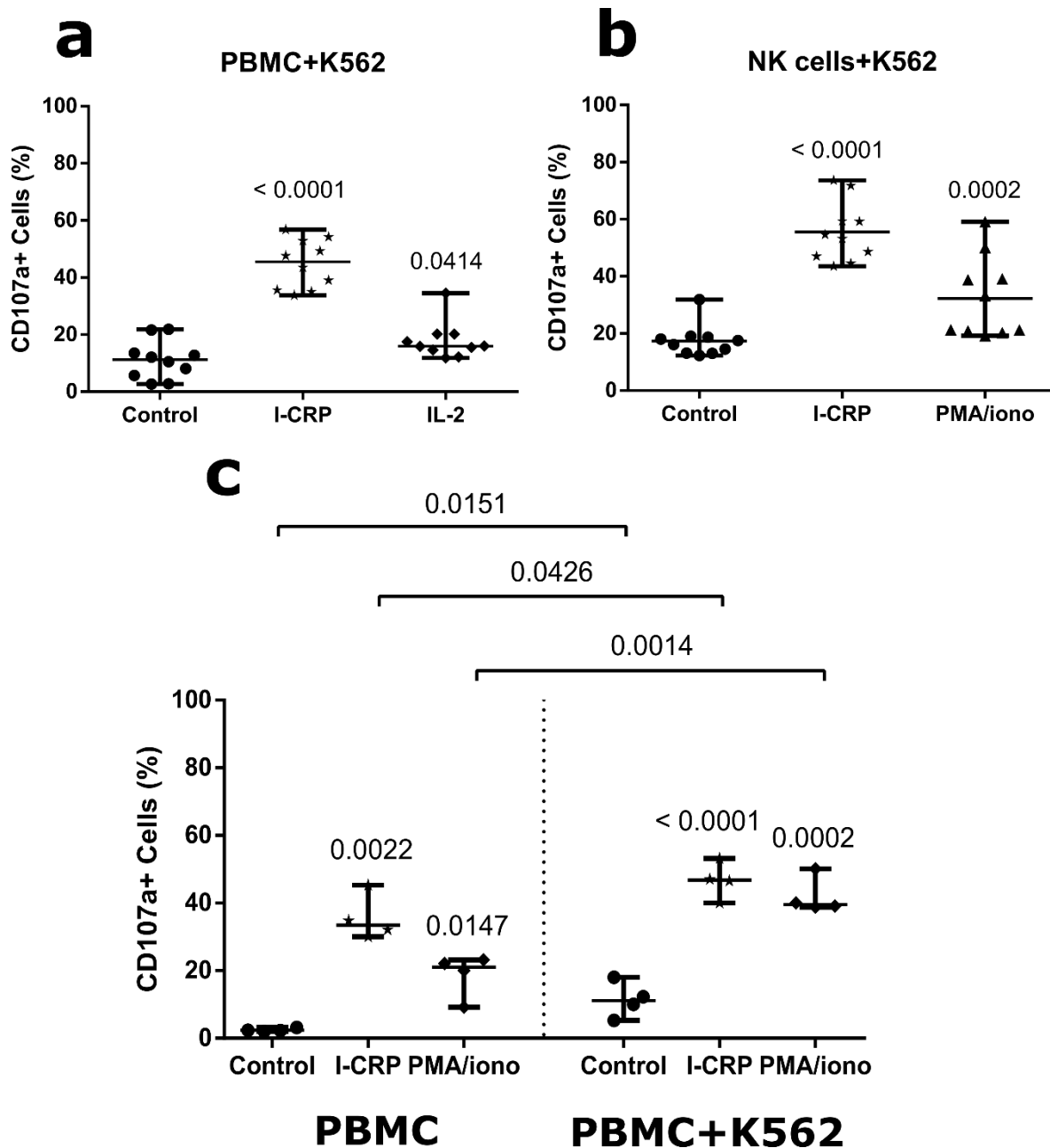


Figura 10. Desgranulación de las células NK después del tratamiento con I-CRP. a) Porcentaje de la población de células NK (CD3-CD56+CD16+/-) positivas para el marcador CD107a, previamente estimuladas con 1.5 U/mL de I-CRP o 100 U/mL de IL-2 (durante 24 h), que expresan CD107a después de 6 horas de co-cultivo contra la línea celular K562. b) Porcentaje de células NK aisladas positivas para CD107a, estimuladas previamente durante 24 h con 1.5 U/mL de I-CRP o PMA-iono (5ng/mL-1uM), después de 6 horas de co-cultivo con la línea celular K562. c) Análisis de la presencia de CD107a en células NK aisladas y estimuladas con I-CRP o PMA-iono, antes (izquierda) o después (derecha) del co-cultivo con la línea celular K562. Cada punto representa un donante distinto y la línea central el promedio entre donantes, se usó el análisis estadístico Mann-Whitney para a) y b), y t-student para c), considerando significativo $p < 0.05$.

La activación ex-vivo de las células NK con el IMMUNEPOTENT-CRP aumenta la predisposición de receptores NK

Para correlacionar la mejora en el reconocimiento de las células K562 con la expresión de los receptores de células NK activadas, se realizó un análisis del repertorio de estos receptores en la población CD3-CD56+CD16+/- (Figura 7), a partir de PBMC de donantes sanos estimuladas *ex-vivo* con I-CRP (1.5 U/mL), usando como controles células sin estimular y células estimuladas con IL-2 (200 U/mL).

Aunque existían variaciones en la expresión de diferentes receptores en los donantes estudiados, se observó un aumento significativo en la expresión de los receptores de lectina tipo C (Figura 11b), de igual manera en los receptores KIR (Figura 11d), en el receptor inhibidor CD85j (Figura 11a) y en los principales receptores activadores NCR (Figura 11c), manteniendo este aumento tanto a las 24 h como a las 48 h de tratamiento. No se observan diferencias en la modulación de los receptores CD160 y CD226 (Figura 11a).

Debido a la naturaleza de los anticuerpos, no es posible aseverar que haya una mayor predisposición de KIR activadores, pero estos resultados sugieren que la activación de las células NK inducida por el I-CRP provoca cambios en el repertorio de receptores, aumentando la expresión de los principales receptores activadores como NKG2D, NKp44, NKp30 y NKp46.

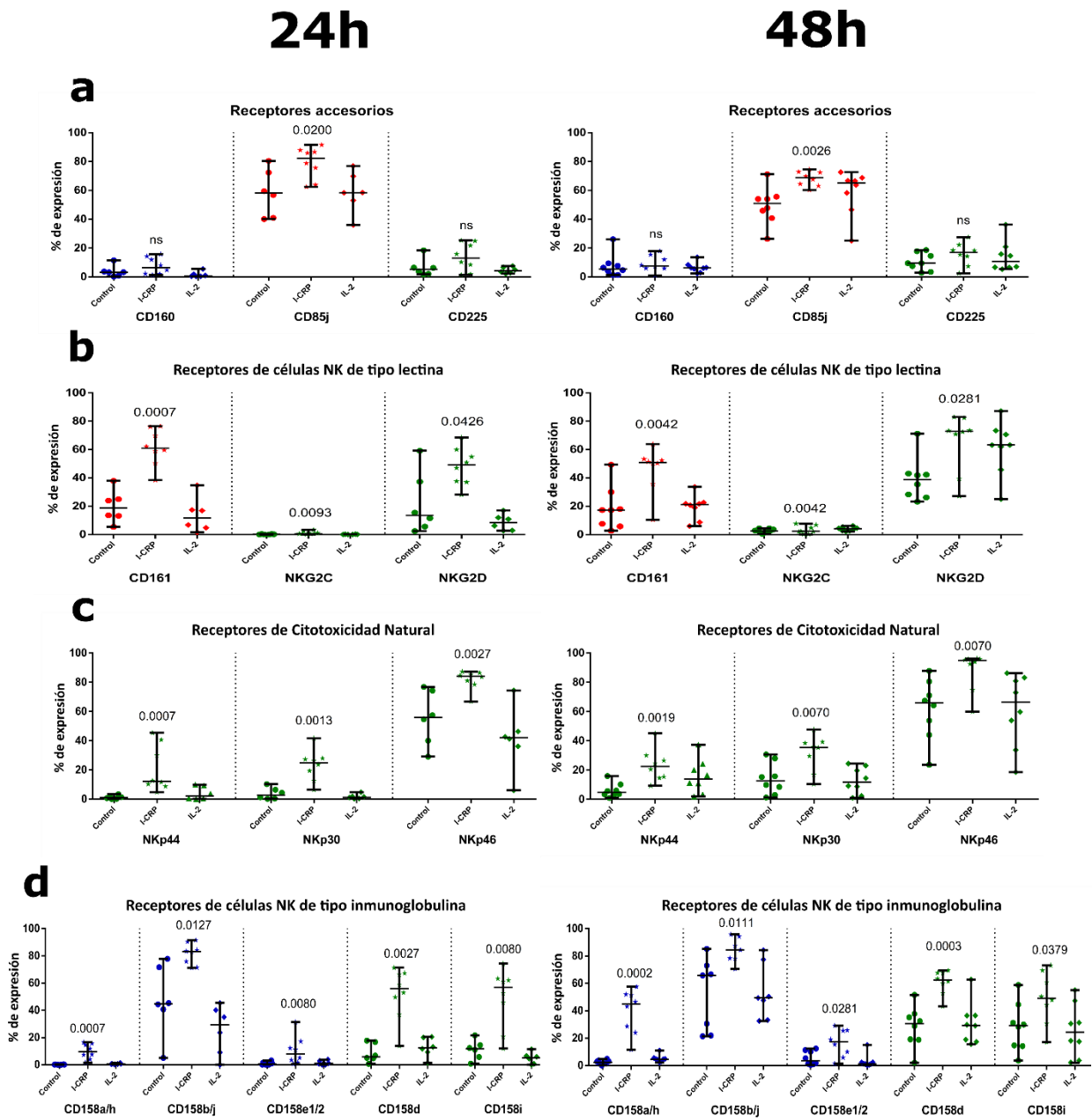


Figura 11. Análisis de citometría de flujo del repertorio de células NK. Porcentaje de células NK que expresan **a)** Receptores accesorios, **b)** Receptores de células NK de tipo lectina tipo-C, **c)** Receptores de Citotoxicidad Natural y **d)** Receptores de células NK de tipo inmunoglobulina. Del lado izquierdo se muestran los resultados del tratamiento durante 24 h y del lado derecho durante 48 h. Las PBMC se trataron con I-CRP (1.5 U/mL) y como controles células sin estimular y células con IL-2 (200 U/mL) y se realizó el análisis en la población CD3-CD56+CD16+/- (Figura 7). Cada punto representa el promedio de un donante distinto y la línea central la media entre donantes, en color verde se representan los receptores activadores, en rojo los inhibidores y en color azul aquellos receptores que reconocen tanto activadores como inhibidores. Se usó el análisis estadístico Mann-Whitney considerando significativo $p < 0.05$.

El tratamiento ex-vivo con el IMMUNEPOTENT-CRP no activa a las células T pero sí induce modificaciones de marcadores de NK

A partir de PBMC tratadas con I-CRP (1.5 U/mL) o con IL-2 (100 U/mL) durante 24 h, se analizó la población de linfocitos CD3⁺ (Figura 7) y se realizó el análisis de expresión de marcadores de activación (CD69) y la expresión de marcadores de células NK.

Contrario a lo que ocurre en las células NK, el I-CRP no activa a las células T al no observarse expresión de CD69 (Figura 12a), pero existe modulación de otros receptores, como es el caso de la disminución significativa de NKG2D y CD161 (Figura 12b), y el aumento significativo en la expresión de CD158e1/2 (Figura 12c). No se observaron diferencias en los otros marcadores analizados.

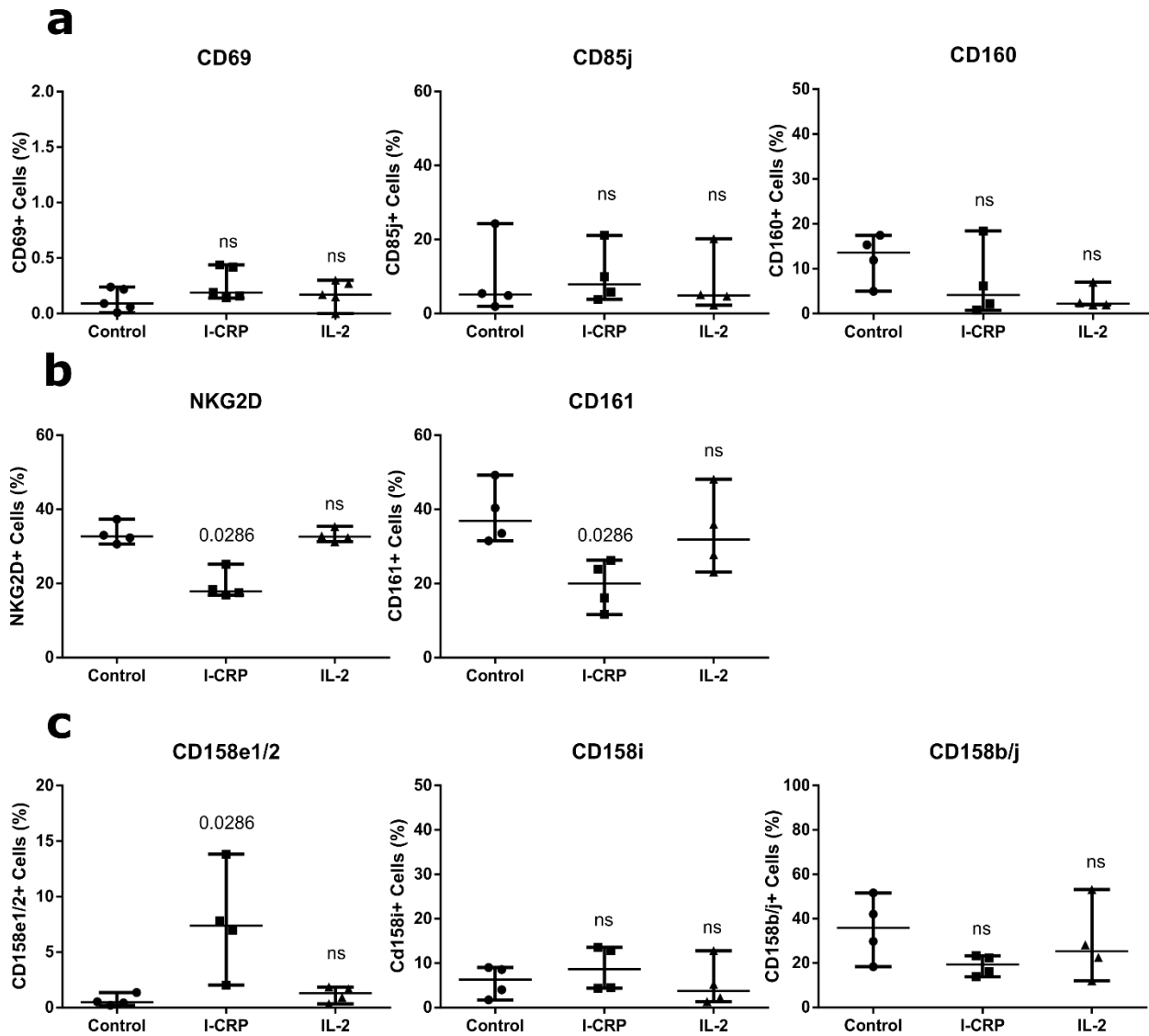


Figura 12. Análisis de citometría de flujo de marcadores NK presentes en células T. Porcentaje de células T que expresan **a)** Receptores accesorios, **b)** Receptores de células NK de tipo lectina tipo-C, **c)** Receptores de células NK de tipo inmunoglobulina. Las PBMC fueron tratadas con I-CRP (1.5 U/mL), como controles células sin estimular y células con IL-2 (200 U/mL) y se realizó el análisis en la población de linfocitos CD3+ (Figura 7). Cada punto representa el promedio de un donante distinto y la línea central la media entre donantes. Se usó el análisis estadístico Mann-Whitney considerando significativo $p < 0.05$.

IX. DISCUSIÓN

Al IMMUNEPOTENT-CRP (I-CRP), un extracto dializable de células de bazo bovino, se le han atribuido diferentes actividades, entre ellas la actividad citotóxica demostrada en múltiples líneas celulares tumorales (Franco-Molina et al. 2010; Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Miranda-Hernández, et al. 2006; Martínez-Torres et al. 2018, 2019; Rodríguez-Salazar et al. 2017). Sin embargo, a pesar de que las dosis empleadas en este trabajo sobrepasan aquellas empleadas para la citotoxicidad de las células cancerosas (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Miranda-Hernández, et al. 2006; Martínez-Torres et al. 2018, 2019), no se observó la pérdida de viabilidad en PBMC de donantes sanos (Figura 1a y b), siendo esto reportado en dosis menores utilizando el ensayo de MTT para medir la viabilidad (Franco-Molina, Mendoza-Gamboa, Miranda-Hernández, et al. 2006) y cuando la citotoxicidad es comparada con células leucémicas (Palacios-Castro 2017).

Otra actividad observada en el I-CRP es la inmunoestimulante, donde algunos autores proponen que facilita la habilidad de los linfocitos para destruir las células cancerosas (Franco-Molina et al. 2008; Lara, Turrent, et al. 2010). Sin embargo, ningún trabajo hasta ahora ha demostrado la activación de las células del sistema inmune ni su capacidad efectora. En el presente estudio, se demostró que el tratamiento previo con el I-CRP activa a las células NK, modifica el repertorio de marcadores NK y aumenta el reconocimiento contra la línea celular cancerosa K562. Esto indica que el I-CRP mejora la actividad funcional de las células NK, ya que esta es definida por la citotoxicidad contra líneas celulares cancerosas y el patrón de expresión de los receptores de células NK, como el aumento en NKG2D, CD69, NKp30, NKp44, NKp46 y CD158b (Montaldo et al. 2013).

Modificaciones en el repertorio de células NK inducidos por el IMMUNEPOTENT-CRP

Generalmente, se cree que los receptores KIR se adquieren mediante un mecanismo que opera exclusivamente durante el desarrollo de las células NK, y que el repertorio se fija después de la maduración (Chiossone et al. 2009). Sin embargo, se ha demostrado que la expresión del receptor Ly49 (el equivalente en ratón de los KIR en humanos) puede ser regulada por citocinas, como IL-2, IL-15, IL-4 e IL-21, en las células NK maduras (Gays et al. 2005; de Rham et al. 2007). También pueden existir cambios relevantes en el repertorio de células NK inducidos por factores ambientales, y en particular por las infecciones virales.

Por ejemplo, el HCMV es un potente impulsor de la maduración de las células NK (Della Chiesa et al. 2014), caracterizado por la expansión de la subpoblación CD56^{dim}, la cual expresa KIR inhibidores (Björkström, Ljunggren, and Sandberg 2010). Debido a la naturaleza de los anticuerpos empleados en este trabajo, no se puede aseverar que exista una mayor predisposición de KIR inhibidores, pero, como se observa en la Figura 11d, existe un aumento en todos los receptores KIR analizados, por lo que puede indicar un fenotipo del tipo citotóxico y una maduración de las células NK, producto del tratamiento con el I-CRP. No obstante, cultivos durante 7 días con IL-2 e IL-15 pueden inducir la expresión *de novo* de KIR en poblaciones negativas para estos receptores, por lo que el aumento observado en los KIR no indica estrictamente la preferencia por CD56^{dim} (de Rham et al. 2007).

Dentro del repertorio de células NK analizado en este estudio, el porcentaje de células que expresan CD161 aumentó de forma significativa (Figura 11b). CD161 es un receptor inhibidor que define a las células NK que han conservado la capacidad de responder a IL-12 e IL-18, expresando niveles altos de IFN- γ , NKp30, CD160, CD25 y CD69, después del estímulo (Kurioka et al. 2018). De manera similar, el I-CRP induce el aumento en la expresión de NKp30 y CD69, pero no así en CD160, por lo que es una activación distinta a la inducida por la combinación de IL-12 e IL-18. Sin embargo, la presencia de CD107a antes del co-cultivo (Figura 10c) sugiere la posible producción de citocinas, por lo que es imperativo el análisis de expresión de IFN- γ o TNF- α para determinar un posible fenotipo de células NK inmunomoduladoras.

Otro receptor inhibidor con un aumento significativo en la expresión después de la activación con el I-CRP fue CD85j (Figura 11a). Si bien, a este receptor se le atribuyen funciones como inhibidor, recientemente se ha determinado que interactúa con otros ligandos. Arnold y colaboradores en el 2013 encontraron que el receptor CD85j interactúa con proteínas de unión al calcio de la familia S100 (S100A9, específicamente)(Arnold et al. 2013). Esta interacción ejerce un control de la replicación del VIH-1 en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC), al co-cultivarse con células NK CD85j+ (Scott-algara et al. 2008), por lo que el aumento observado en este receptor, después del tratamiento con el I-CRP, podría indicar un potencial en el control de esta enfermedad.

Dentro de los receptores activadores con un aumento significativo observado, se encuentra NKG2D (Figura 11b). Este receptor funciona como activador y co-estimulador, teniendo un papel fundamental en la vigilancia de infecciones microbianas y cáncer (Wensveen, Jelenc, and Bojan 2018), debido a que sus ligandos (MICA/B y ULBP) sólo suelen expresarse bajo esas condiciones de estrés (James, Cohen, and Campbell 2013). En humanos, además de NKG2D, los principales receptores de activación involucrados en la destrucción de células diana son los receptores de citotoxicidad natural (NCR) (Hudspeth, Silva-Santos, and Mavilio 2013). NKp46 y NKp30 se expresan en casi todas las células NK humanas en reposo, y se regulan positivamente en las células NK activadas (Hudspeth, Silva-Santos, and Mavilio 2013) como sucede con el I-CRP en la Figura 11c. A diferencia de NKp46 y NKp30, NKp44 se expresa constitutivamente solo en las células NK CD56^{bright}, pero es esencialmente adquirido por todas las células NK después de la activación por citocinas, lo cual explica su baja expresión en los controles, pero su aumento después del tratamiento con el I-CRP (Figura 11c). Generalmente, los ligandos de estos receptores están aumentados o se expresan *de novo* en células "estresadas" (Bottino et al. 2005; Dieffenbach et al. 2000; Smith et al. 2002), como en el caso de NKG2D. Por lo que el aumento en la predisposición de estos receptores inducido por el I-CRP, podría indicar un aumento en el mejoramiento funcional contra distintos padecimientos.

Los cambios en el repertorio de células NK estimuladas con el IMMUNEPOTENT-CRP no indican hiporeactividad

Los tratamientos frecuentes o con altas concentraciones de citocinas pueden conducir a la hiporeactividad, también denominado agotamiento, de las células NK (Frutoso et al. 2018; Portielje et al. 2003), por lo que es importante determinar si estas modificaciones en los marcadores de NK provocadas por el I-CRP, indican el agotamiento de estas células. La hiporeactividad se caracteriza por la disminución de la expresión del marcador de activación temprana, CD69 (Elpek et al. 2010), el aumento en el receptor inhibitor NKG2A (Zhang et al. 2019), la disminución de receptores activadores (como NKG2D, NKp46, NKp30 y CD226) (Peng et al. 2013; Sun et al. 2012), así como la disminución de la actividad efectora (Romera-Cárdenas et al. 2016), procesos que no fueron observados con la estimulación con I-CRP. Se puede observar la expresión de CD69 desde las 24 h y su persistencia hasta las 48

h (Figura 9). A pesar de que no se analizó la expresión de NKG2A, el aumento en la expresión de NKG2D no sugiere el agotamiento de las células NK (Peng et al. 2013). De manera similar no se observó la disminución en otros receptores activadores, incluidos NKp46, NKp30 y CD226 (Figura 11a y c).

Además, contrario a un estado hiporeactivo, las células activadas con el I-CRP poseen una actividad mejorada al observarse un aumento en la expresión CD107a en células NK co-cultivadas contra la línea celular cancerosa K562 (Figura 10), lo cual es indicativo de un reconocimiento y la acción efectora de estas células (Alter, Malenfant, and Altfeld 2004).

Potencial del IMMUNEPOTENT-CRP como inmunoterapia

El cultivo *ex vivo* de células NK con citocinas es un enfoque que permite una expansión significativa de las subpoblaciones de células NK, que posean potentes efectos antitumorales, antivirales o inmunomoduladores (Granzin et al. 2017). Las citocinas más comúnmente usadas para este propósito son IL-2 e IL-15 que pueden inducir la expresión de receptores de células NK, como algunos KIR, NKG2D y NKp44 (Bottino et al. 2005; Diefenbach et al. 2000; Smith et al. 2002), no obstante, para observar modificaciones en el repertorio de células NK se necesitan tiempos más prolongados que los empleados en este trabajo, por lo que el I-CRP resulta tener un potencial mayor como inmunoestimulante.

Por otro lado, para combatir *in vivo* el agotamiento de las células NK, se ha planteado el tratamiento con citocinas, como ya se ha demostrado en algunos trabajos con citocinas activadoras, como IL-12 e IL-18, aumentando la supervivencia de ratones portadores de tumores deficientes en MHC-I (Ardolino et al. 2014; Ni et al. 2012). Los resultados obtenidos en este proyecto abren la pauta al empleo del I-CRP con el objetivo de revertir las condiciones de hiporeactividad de las células NK, en la búsqueda de nuevas terapias contra infecciones virales crónicas y tumores establecidos, enfermedades donde el agotamiento de las células NK juega un rol determinante (Peppia 2017; Zheng, Sun, and Zhigang 2018).

X. CONCLUSIONES

En general, se demostró que las células NK humanas pueden ser activadas con el extracto dializable de leucocitos, IMMUNEPOTENT-CRP (1.5U/mL), durante un tiempo de 24 h y 48 h. Bajo esas mismas condiciones no se observó pérdida de viabilidad en las PBMC, sin embargo, no ocurre la activación en las células T. El tratamiento previo con I-CRP aumenta la capacidad de las células NK para reconocer a la línea celular K562. Por otro lado, la desgranulación de las células NK se observa desde el tratamiento, y es aumentada gracias al reconocimiento contra las células K562. El I-CRP provoca cambios en el repertorio de marcadores NK, tanto en las células NK como en las células T. Los principales cambios se determinaron en las células NK, con el aumento en la expresión de receptores involucrados en la respuesta inmune. Nuestros resultados respaldan la relevancia del IMMUNEPOTENT-CRP como imunoestimulante, activando a las células NK funcionales con una mayor capacidad para reconocer células leucémicas.

XI. PERSPECTIVAS

Se debe destacar el rol de las células NK en infecciones bacterianas, siendo no solamente importantes en el reconocimiento de las células infectadas, sino también en el reconocimiento de patrones asociados a patógenos, analizando la expresión de los TLR.

Analizar la expresión de otros marcadores importantes la funcionalidad de las células NK, como el caso CD57 y NKp80, marcadores observados en células NK maduras o “memory-like”. Así como la expresión de NKG2A, siendo uno de los principales receptores inhibidores presentes en células NK agotadas, pero de expresión normal en células NK funcionales.

Analizar si el I-CRP es capaz de revertir el estado hiporeactivo de las células NK provenientes de pacientes con enfermedades crónicas, como diferentes formas de cáncer como T-ALL, o infecciones virales como la hepatitis. Haciendo este análisis ex vivo e in vivo.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, Abul K., Andrew H. H. Lichtman, and Shiv Pillai. 2014. Elsevier Health Sciences. *Cellular and Molecular Immunology: With STUDENT CONSULT Online Access*. <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=RWYWBAAAQBAJ&pgis=1>.
- Van Acker, Heleen H., Anna Capsomidis, Evelien L. Smits, and Viggo F. Van Tendeloo. 2017. "CD56 in the Immune System: More than a Marker for Cytotoxicity?" *Frontiers in Immunology* 8(JUL): 1–9.
- Adib-Conquy, Minou, Daniel Scott-Algara, Jean Marc Cavaillon, and Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes. 2014. "TLR-Mediated Activation of NK Cells and Their Role in Bacterial/Viral Immune Responses in Mammals." *Immunology and Cell Biology* 92(3): 256–62. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2013.99>.
- Albertsson, Per A. et al. 2003. "NK Cells and the Tumour Microenvironment: Implications for NK-Cell Function and Anti-Tumour Activity." *Trends in Immunology* 24(11): 603–9.
- Alter, Galit, Jessica M. Malenfant, and Marcus Altfeld. 2004. "CD107a as a Functional Marker for the Identification of Natural Killer Cell Activity." *Journal of Immunological Methods* 294(1–2): 15–22.
- André, P et al. 2000. "Modification of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 with a Natural Killer Cell-Restricted Sulfated Lactosamine Creates an Alternate Ligand for L-Selectin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(7): 3400–3405.
- Ardolino, Michele et al. 2014. "Cytokine Therapy Reverses NK Cell Anergy in Find the Latest Version : Cytokine Therapy Reverses NK Cell Anergy in MHC-Deficient Tumors." 124(11): 4781–94.
- Arnaudov, Atanas. 2016. "Immunotherapy with Dialyzable Leukocyte Extracts Containing Transfer Factor." *Agricultural and Biological Sciences Grain Legumes*.
- Arnold, Vincent et al. 2013. "S100A9 Protein Is a Novel Ligand for the CD85j Receptor and Its Interaction Is Implicated in the Control of HIV-1 Replication by NK Cells." : 1–11.
- Baginska, Joanna et al. 2013. "The Critical Role of the Tumor Microenvironment in

- Shaping Natural Killer Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity.” *Frontiers in Immunology* 4(DEC): 1–13.
- Bauer, S. 1999. “Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA.” *Science* 285(5428): 727–29.
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5428.727>.
- Bi, Jiacheng, and Zhigang Tian. 2017. “NK Cell Exhaustion.” *Frontiers in Immunology* 8(JUN).
- Bingle, L., N. J. Brown, and C. E. Lewis. 2002. “The Role of Tumour-Associated Macrophages in Tumour Progression: Implications for New Anticancer Therapies.” *Journal of Pathology* 196(3): 254–65.
- Björkström, Niklas K., Hans Gustaf Ljunggren, and Johan K. Sandberg. 2010. “CD56 Negative NK Cells: Origin, Function, and Role in Chronic Viral Disease.” *Trends in Immunology* 31(11): 401–6.
- Bottino, Cristina, Roberta Castriconi, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. 2005. “Cellular Ligands of Activating NK Receptors.” *Trends in Immunology* 26(4): 221–26.
- Boudreau, Jeanette E., and Katharine C. Hsu. 2018. “Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned.” *Trends in Immunology* 39(3): 222–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.12.001>.
- Burke, Bernard et al. 2003. “Hypoxia-Induced Gene Expression in Human Macrophages.” *The American Journal of Pathology* 163(4): 1233–43.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010634839>.
- Burns, L. J. et al. 2003. “IL-2-Based Immunotherapy after Autologous Transplantation for Lymphoma and Breast Cancer Induces Immune Activation and Cytokine Release: A Phase I/II Trial.” *Bone Marrow Transplantation* 32(2): 177–86.
- Della Chiesa, Mariella et al. 2014. “Human Cytomegalovirus Infection Promotes Rapid Maturation of NK Cells Expressing Activating Killer Ig-like Receptor in Patients Transplanted with NKG2C ^{-/-} Umbilical Cord Blood.” *The Journal of Immunology* 192(4): 1471–79.
- Chiossone, Laura et al. 2009. “Maturation of Mouse NK Cells Is a 4-Stage Developmental Program.” *Blood* 113(22): 5488–96.

- Conlon, Kevin C. et al. 2015. "Redistribution, Hyperproliferation, Activation of Natural Killer Cells and CD8 T Cells, and Cytokine Production during First-in-Human Clinical Trial of Recombinant Human Interleukin-15 in Patients with Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 33(1): 74–82.
- Cooper, Megan A. et al. 2004. "NK Cell and DC Interactions." *Trends in Immunology* 25(1): 47–52.
- Cooper, Megan A., Todd A. Fehniger, and Michael A. Caligiuri. 2001. "The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets." *Trends in Immunology* 22(11): 633–40.
- Coronado-Cerda, Erika Evangelina et al. 2016. "In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil." *Journal of Immunology Research* 2016.
- Corzo, Cesar A. et al. 2010. "HIF-1 α Regulates Function and Differentiation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment." *The Journal of Experimental Medicine* 207(11): 2439–53.
<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20100587>.
- Deng, Bin et al. 2013. "Intratumor Hypoxia Promotes Immune Tolerance by Inducing Regulatory T Cells via TGF- β 1 in Gastric Cancer." *PLoS ONE* 8(5): 1–9.
- Diefenbach, Andreas et al. 2000. "Ligands for the Murine NKG2D Receptor: Expression by Tumor Cells and Activation of NK Cells and Macrophages." *Nature Immunology* 1(2): 119–26.
- Elpek, Kutlu G. et al. 2010. "Mature Natural Killer Cells with Phenotypic and Functional Alterations Accumulate upon Sustained Stimulation with IL-15/IL-15R α Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(50): 21647–52.
- Fauriat, Cyril, Eric O Long, Hans-Gustaf Ljunggren, and Yenan T Bryceson. 2010. "Regulation of Human NK-Cell Cytokine and Chemokine Production by Target Cell Recognition." *Immunobiology* 115(11): 2167–76.
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/115/11/2167.short%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2844017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Franco-Molina, M. A., Edgar Mendoza-Gamboa, Paloma Castillo-Tello, et al. 2006. "In

- Vitro Antibacterial Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract.”
Immunopharmacology and Immunotoxicology 28(3): 471–83.
- Franco-Molina, M. A., E. Mendoza-Gamboa, D. Miranda-Hernández, et al. 2006. “In Vitro Effects of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract (BDLE) in Cancer Cells.”
Cytotherapy 8(4): 408–14.
- Franco-Molina, M. A. et al. 2008. “IMMUNEPOTENT CRP (Bovine Dialyzable Leukocyte Extract) Adjuvant Immunotherapy: A Phase I Study in Non-Small Cell Lung Cancer Patients.” *Cytotherapy* 10(5): 490–96.
- . 2010. “Antiangiogenic and Antitumor Effects of IMMUNEPOTENT CRP in Murine Melanoma.” *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32(4): 637–46.
- . 2011. “Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human Macrophages.” *African Journal of Microbiology Research* 5(22): 3726–36.
http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract_2011/16Oct/Franco-Molina_et_al.htm.
- Frey, M et al. 1998. “Differential Expression and Function of L-Selectin on CD56bright and CD56dim Natural Killer Cell Subsets.” *J Immunol* 161(1): 400–408.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9647249.
- Frutoso, Marie et al. 2018. “Emergence of NK Cell Hyporesponsiveness after Two IL-15 Stimulation Cycles.” *The Journal of Immunology* 201(2): 493–506.
- Gamen, S et al. 1998. “Granulysin-Induced Apoptosis. I. Involvement of at Least Two Distinct Pathways.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161(4): 1758–64.
- Gays, Frances et al. 2005. “Multiple Cytokines Regulate the NK Gene Complex-Encoded Receptor Repertoire of Mature NK Cells and T Cells.” *The Journal of Immunology* 175(5): 2938–47.
- Ghiringhelli, François et al. 2005. “CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Inhibit Natural Killer Cell Functions in a Transforming Growth Factor- β -Dependent Manner.” *The Journal of Experimental Medicine* 202(8): 1075–85.
<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20051511>.
- Giannoni, Elisa et al. 2010. “Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-

- Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness.” *Cancer Research* 70(17): 6945–56.
- Gill, Saar et al. 2019. “Rapid Development of Exhaustion and Down-Regulation of Eomesodermin Limit the Antitumor Activity of Adoptively Transferred Murine Natural Killer Cells.” 119(24): 5758–69.
- Granzin, Markus et al. 2017. “Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation.” *Frontiers in Immunology* 8(APR).
- Guillerey, Camille et al. 2015. “Immunosurveillance and Therapy of Multiple Myeloma Are CD226 Dependent.” 125(5): 2077–89.
- Guillerey, Camille, Nicholas D. Huntington, and Mark J. Smyth. 2016. “Targeting Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy.” *Nature Immunology* 17(9): 1025–36.
- Herberman, Ronald B. et al. 1975. “Augmentation of Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells against Syngeneic and Allogeneic Target Cells.” *International Journal of Cancer* 19(4): 555–64.
- Höglund, Petter, and Hans Gustaf Ljunggren. 2010. *Natural Killer Cells* *Natural Killer Cells in Cancer*. Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-370454-2.00004-1>.
- Hudspeth, Kelly, Bruno Silva-Santos, and Domenico Mavilio. 2013. “Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells.” *Frontiers in Immunology* 4(MAR): 1–15.
- James, Ashley Mentlik, Adam D Cohen, and Kerry S Campbell. 2013. “Combination Immune Therapies to Enhance Anti-Tumor Responses by NK Cells.” 4(December): 1–12.
- Kiessling, R., Eva Klein, and H Wigzell. 1975. “‘Natural’ Killer Cells in the Mouse.” *European journal of immunology* (5): 112–17.
- Kirkpatrick, Charles H. 1993. “Structural Nature and Functions of Transfer Factors.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 685(1): 362–68.
- Krieg, Stephanie, and Evelyn Ullrich. 2012. “Novel Immune Modulators Used in Hematology: Impact on NK Cells.” *Frontiers in Immunology* 3(JAN): 1–11.
- Kurioka, Ayako et al. 2018. “CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells.” 9(April): 1–14.

- Lara, Humberto H, Liliana Ixtepan Turrent, et al. 2010. "Clinical and Immunological Assessment in Breast Cancer Patients Receiving Anticancer Therapy and Bovine Dialyzable Leukocyte Extract as an Adjuvant." *Experimental and therapeutic medicine* 1(3): 425–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993557> (February 12, 2018).
- Lara, Humberto H, Liliana Ixtepan-Turrent, et al. 2010. 1 Experimental and Therapeutic Medicine *Experimental and Therapeutic Medicine*. Spandidos Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993557> (February 12, 2018).
- Lawrence, H. S. 1955. "The Transfer in Humans of Delayed Skin Sensitivity to Streptococcal M Substance and to Tuberculin with Disrupted Leucocytes." *The Journal of clinical investigation* 34(2): 219–30.
- Li, Hequan et al. 2009. "Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF-Beta 1." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182(1): 240–49.
- Long, Eric O. et al. 2013. "Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition." *Annual review of biochemistry* 31: 1–36.
- Manaster, Irit, and Ofer Mandelboim. 2010. "The Unique Properties of Uterine NK Cells." *American Journal of Reproductive Immunology* 63(6): 434–44.
- Mandal, Arundhati, and Chandra Viswanathan. 2015. "Natural Killer Cells: In Health and Disease." *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy* 8(2): 47–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.11.006>.
- Mantovani, Alberto, Paola Allavena, Antonio Sica, and Frances Balkwill. 2008. "Cancer-Related Inflammation." *Nature* 454(7203): 436–44.
- De Maria, A., F. Bozzano, C. Cantoni, and L. Moretta. 2011. "Revisiting Human Natural Killer Cell Subset Function Revealed Cytolytic CD56dimCD16+ NK Cells as Rapid Producers of Abundant IFN- on Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(2): 728–32. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1012356108>.
- Martinez-Torres, Ana Carolina et al. 2018. "IMMUNEPOTENT CRP Induces Cell Cycle Arrest and Caspase-Independent Regulated Cell Death in HeLa Cells through Reactive Oxygen Species Production." *BMC Cancer* 18(1): 13. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3954-5>.

- . 2019. “Cytotoxic Activity of IMMUNEPOTENT CRP against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines.”
- Mavilio, D. et al. 2003. “Natural Killer Cells in HIV-1 Infection: Dichotomous Effects of Viremia on Inhibitory and Activating Receptors and Their Functional Correlates.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(25): 15011–16.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2336091100>.
- Mavilio, Domenico, Anne Hosmalin, and Daniel Scott-Algara. 2010. “Natural Killer Cells and Human Immunodeficiency Virus.” *Natural Killer Cells*: 481–97.
- Montaldo, Elisa et al. 2013. “Human NK Cell Receptors/Markers: A Tool to Analyze NK Cell Development, Subsets and Function.” *Cytometry Part A* 83(8): 702–13.
- Moretta, Lorenzo. 2010. “Dissecting CD56dim Human NK Cells.” *Blood* 116(19)(2010 Nov 11): 3689–91.
- Müller-Durovic, Bojana et al. 2019. “CD56-Negative NK Cells with Impaired Effector Function Expand in CMV and EBV Co-Infected Healthy Donors with Age.” *Aging* 11(2): 724–40.
- Ni, Jing et al. 2012. “Sustained Effector Function of IL-12/15/18-Preactivated NK Cells against Established Tumors.” *Journal of Experimental Medicine* 209(13): 2351–65.
- Nikzad, Rana et al. 2019. “Human Natural Killer Cells Mediate Adaptive Immunity to Viral Antigens.” *Science Immunology* 4(35): eaat8116.
<http://immunology.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciimmunol.aat8116>.
- Nouroz, Faisal, Farzana Bibi, Shumaila Noreen, and Nosheen Masood. 2016. “Natural Killer Cells Enhance the Immune Surveillance of Cancer.” *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 17(2): 149–54.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2015.08.006>.
- Palacios-Castro, Keila Abigail. 2017. “Estudio de La Muerte Celular Inducida Por IMMUNEPOTENT-CRP En Líneas Celulares de Leucemia Linfocítica Aguda de Células T.” Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Paul, Sourav, Neeraja Kulkarni, and Girdhari Lal. 2016. “Intratumoral Natural Killer Cells Show Reduced Effector and Cytolytic Properties and Control the Differentiation of Effector Th1 Cells.” 5(12).
- Peng, Yun-peng et al. 2013. “Comprehensive Analysis of the Percentage of Surface

- Receptors and Cytotoxic Granules Positive Natural Killer Cells in Patients with Pancreatic Cancer , Gastric Cancer , and Colorectal Cancer.” *Journal of Translational Medicine* 11(1): 1. Journal of Translational Medicine.
- Peppas, Dimitra. 2017. “Natural Killer Cells in Human Immunodeficiency Virus-1 Infection: Spotlight on the Impact of Human Cytomegalovirus.” *Frontiers in Immunology* 8(OCT).
- Pietras, Kristian, and Arne Östman. 2010. “Hallmarks of Cancer: Interactions with the Tumor Stroma.” *Experimental Cell Research* 316(8): 1324–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>.
- Poli, Aurélie et al. 2009. “CD56bright Natural Killer (NK) Cells: An Important NK Cell Subset.” *Immunology* 126(4): 458–65.
- Portielje, Johanna E.A. et al. 2003. “Repeated Administrations of Interleukin (IL)-12 Are Associated with Persistently Elevated Plasma Levels of IL-10 and Declining IFN- γ , Tumor Necrosis Factor- α , IL-6, and IL-8 Responses.” *Clinical Cancer Research* 9(1): 76–83.
- de Rham, Casimir et al. 2007. “The Proinflammatory Cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 Modulate the Repertoire of Mature Human Natural Killer Cell Receptors.” *Arthritis Research and Therapy* 9(6): 1–15.
- Rodríguez-Salazar, Maria Del Carmen et al. 2017. “The Novel Immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP Combined with Chemotherapy Agent Increased the Rate of Immunogenic Cell Death and Prevented Melanoma Growth.” *Oncology letters* 14(1): 844–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28693241> (February 12, 2018).
- Romee, Rizwan et al. 2013. “NK Cell CD16 Surface Expression and Function Is Regulated by a Disintegrin and Metalloprotease-17 (ADAM17).” *Blood* 121(18): 3599–3608.
- Romera-Cárdenas, Gema et al. 2016. “Ionomycin Treatment Renders NK Cells Hyporesponsive.” *PLoS ONE* 11(3): 1–21.
- Salazar-Ramiro, A et al. 2016. “Dialyzable Leukocyte Extract (Transfer Factor) as Adjuvant Immunotherapy in the Treatment of Cancer.” 1(1): 1–7.
- Sánchez-González, Dolores J., Carlos A. Sosa-Luna, and Ismael Vásquez-Moctezuma. 2011. “Factores de Transferencia En La Terapéutica Médica.” *Medicina Clinica* 137(6): 273–77.

- Scott-algara, Daniel et al. 2008. "The CD85j + NK Cell Subset Potently Controls HIV-1 Replication in Autologous Dendritic Cells." 3(4).
- Smith, Hamish R.C. et al. 2002. "Recognition of a Virus-Encoded Ligand by a Natural Killer Cell Activation Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(13): 8826–31.
- Smyth, Mark J. et al. 2005. "Activation of NK Cell Cytotoxicity." *Molecular Immunology* 42(4 SPEC. ISS.): 501–10.
- Stenger, Steffen et al. 1998. "An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin." *Science* 282(5386): 121–25.
- Sun, Cheng et al. 2012. "TGF- B1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/ SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence." *PLoS Pathogens* 8(3).
- Tomescu, C., J. Chehimi, V. C. Maino, and L. J. Montaner. 2009. "Retention of Viability, Cytotoxicity, and Response to IL-2, IL-15, or IFN- by Human NK Cells after CD107a Degranulation." *Journal of Leukocyte Biology* 85(5): 871–76.
<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.1008635>.
- Viel, Sébastien et al. 2016. "TGF- b Inhibits the Activation and Functions of NK Cells by Repressing the MTOR Pathway." 9(415): 1–14.
- Vivier, Eric et al. 2012. "Targeting Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells in Cancer." *Nature Reviews Immunology* 12(4): 239–52.
<http://dx.doi.org/10.1038/nri3174>.
- Voskoboinik, Ilia, James C. Whisstock, and Joseph A. Trapani. 2015. "Perforin and Granzymes: Function, Dysfunction and Human Pathology." *Nature Reviews Immunology* 15(6): 388–400. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3839>.
- Wagner, Julia A. et al. 2017. "CD56bright NK Cells Exhibit Potent Antitumor Responses Following IL-15 Priming." *Journal of Clinical Investigation* 127(11): 4042–58.
<https://www.jci.org/articles/view/90387>.
- Waldhauer, I., and A. Steinle. 2008. "NK Cells and Cancer Immunosurveillance." *Oncogene* 27(45): 5932–43.
- Webb, Steven D. et al. 2007. "Macrophage-Based Anti-Cancer Therapy: Modelling Different Modes of Tumour Targeting." *Bulletin of Mathematical Biology* 69(5):

1747–76.

- Wensveen, Felix M, Vedrana Jelenc, and Polió Bojan. 2018. “NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness.” 9(March).
- Young, Arabella, Deepak Mittal, John Stagg, and Mark J. Smyth. 2014. “Targeting Cancer-Derived Adenosine: New Therapeutic Approaches.” *Cancer Discovery* 4(8): 879–88.
- Zaritskaya, Liubov, Michael R. Shurin, Thomas J. Sayers, and Anatoli M. Malyguine. 2010. “New Flow Cytometric Assays for Monitoring Cell-Mediated Cytotoxicity.” *Expert Review of Vaccines* 9(6): 601–16.
- Zhang, Chao et al. 2019. “NKG2A Is a NK Cell Exhaustion Checkpoint for HCVpersistence.” *Nature Communications*. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09212-y>.
- Zheng, Meijuan, Haoyun Sun, and Tian Zhigang. 2018. “Natural Killer Cells in Liver Diseases.” 12(3): 269–79.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Alan Benancio Martínez-Loria

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología

Tesis: EFECTO DEL IMMUNEPOTENT-CRP SOBRE CÉLULAS NK

Campo de Estudio: Inmunobiología

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 13 de julio de 1995, hijo de Benacio Martínez y Fátima Loria-Cervantes

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica con mención honorífica.

Experiencia Profesional: Asistente de investigación desde el 2013 en el Departamento de Microbiología e Inmunología, en la Unidad de Biología Celular del Cáncer y Sistema Inmune.