

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Centro de Investigación en Dinámica Celular

***Caracterización fenotípica y funcional de células NK en  
pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda: un  
estudio multicéntrico***

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctorado en Ciencias

PRESENTA:

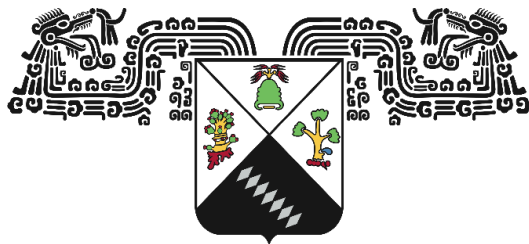
Lucero Valenzuela Vázquez

DIRECTOR: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

CO-DIRECTOR: Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Centro de Investigación en Dinámica Celular

***Caracterización fenotípica y funcional de células NK en  
pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda: un  
estudio multicéntrico***

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctorado en Ciencias

PRESENTA:

Lucero Valenzuela Vázquez

DIRECTOR: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

CO-DIRECTOR: Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2023

## PUBLICACIONES RELACIONADAS

- I. Rouce, R.H., et al., *The TGF- $\beta$ /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia*. 2016. **30(4)**: p. 800-811.
  
- II. Valenzuela-Vazquez L., Núñez-Enríquez J. C., Sánchez-Herrera, J., Jiménez-Hernández E., Martín-Trejo J. A., Espinoza-Hernández L. E., Medina-Sanson A., Flores-Villegas L.V., Peñaloza-González J.G., Torres-Nava J.R., Espinosa-Elizondo R. M., Amador-Sánchez R., Santillán-Juárez J. D., Flores-Lujano J., Pérez-Saldívar M. L., García-López L. R., Castañeda-Echevarría A., Rodríguez-Leyva F., Rosas-Vargas H., Mata-Rocha M., Duarte-Rodríguez D.A., Sepúlveda-Robles O. A., Mancilla-Herrera I., Mejía-Aranguré J.M. & Cruz-Munoz, M. E. (2020). “Functional characterization of NK cells in Mexican pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia”. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0227314.
  
- III. Valhondo, I., et al., *Characterization of the DNAM-1, TIGIT and TACTILE Axis on Circulating NK, NKT-Like and T Cell Subsets in Patients with Acute Myeloid Leukemia*. 2020. **12(8)**: p. 2171.
  
- IV. Sandoval-Borrego, D., Moreno-Lafont, M. C., Vazquez-Sanchez, E. A., Gutierrez-Hoya, A., López-Santiago, R., Montiel-Cervantes, L. A., ... & Vela-Ojeda, J. (2016). Overexpression of CD158 and NKG2A inhibitory receptors and underexpression of NKG2D and NKp46 activating receptors on NK cells in acute myeloid leukemia. *Archives of medical research*, *47(1)*, 55-64.

## CRÉDITOS

Este trabajo se realizó bajo la co-tutoría del Dr. Mario E. Cruz Muñoz jefe del Laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y del Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré miembro del Laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

La experimentación se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Medicina de la UAEM, en la Unidad de Citometría del Instituto de Biotecnología de la UNAM y en la Unidad de Citometría del Instituto Nacional de Perinatología.

Durante el desarrollo de este proyecto de investigación se contó con el apoyo económico de una beca para doctorado con número (CVU): 740420 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Durante la realización de este proyecto, el Dr. Mario E. Cruz Muñoz contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (FORDECYT-PRONACES-377883-2020). El Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré contó con el apoyo de FONCICYT/37/2018, FIS/IMSS/PROT/1782, y CB2015-258042-M.

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a todas las personas que me apoyaron en esta etapa de crecimiento profesional. Del ámbito científico: al Dr. Mario Cruz Muñoz por incentivarme a mejorar. Al Dr. Ismael Mancilla por su paciencia y disposición de orientarnos y apoyarnos en todo momento que lo necesitamos. A la (SCym) Maestra en Ciencias Erika Melchy y la Dra. Yvonne Rosenstein por permitirnos usar la unidad de citometría del IBT-UNAM y siempre estar dispuesta a apoyarnos. A mis compañeros el Dr. Arturo Gutiérrez Guerrero y a la Dra. Jacqueline Sánchez por ser buenos compañeros de trabajo y enriquecer mi crecimiento científico. Agradezco al Dr. Eduardo Lira y la Dra. Elizabeth Cárdenas del laboratorio 11 por todo su apoyo. Y a los miembros del jurado revisor de tesis: El Dr. José Luis Montiel, la Dra. Angélica Santana, el Dr. Iván Martínez Duncker, el Dr. Fernando Esquivel. Al Dr. Juan Carlos Núñez y el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré por siempre estar dispuestos a enriquecer el proyecto y apoyarnos en todo momento.

Por otro lado, también quiero expresar mi gratitud a personas fuera del ámbito científico comenzando por mi madre Antonia Vázquez Gándara y mi padre Jose Luis Valenzuela Bautista por apoyarme incondicionalmente en esta trayectoria. A mis hermanos Ana Karen y Jose Luis por motivarme en este camino.

Y, por último, pero no menos importante, agradezco a mi novio, amigo y compañero de vida Juan Antonio Barrios Pareja con quien sé que cuento incondicionalmente.

A todos, gracias

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a:

Mis 5 hermosos sobrinos: Manuel Isaac, Ancel José, Alexa Fare, José Daniel y Haidar Cemil.

Mis padres: Antonia Vázquez Gándara y Jose Luis Valenzuela

Mis hermanos: Ana Karen y Jose Luis Valenzuela Vázquez

Mi novio: Juan Antonio Barrios Pareja

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>ADCC</b>	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
<b>Bid</b>	BH3-interacting domain death agonist
<b>CCG</b>	Children's Cancer Group)
<b>DD</b>	Death Domain
<b>DISC</b>	Death-Inducing Signalling Complex
<b>DNAM</b>	DNAX accessory molecule
<b>DNAM-1</b>	DNAX Accessory Molecule-1
<b>ERM</b>	Enfermedad Residual Mínima
<b>FAB</b>	Franco-Americana-Británica
<b>FasL</b>	Fas Ligand
<b>GRB2</b>	Growth factor Receptor-Bound protein 2
<b>HSCT</b>	Haematopoietic Stem Cell Transplantation
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif
<b>ITIM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
<b>KIR</b>	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>LLC</b>	Leucemia Linfoblástica Crónica
<b>LMA</b>	Leucemia Mieloide Aguda
<b>LMC</b>	Leucemia Mieloide Crónica
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MPR</b>	Mannose 6-Phosphate Receptor
<b>NCAM</b>	Neural cell adhesion molecule
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>NCRs</b>	Natural Cytotoxicity Receptors
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>POG</b>	Pediatric Oncology Group
<b>SLE</b>	Sobrevida Libre de Enfermedad
<b>t(c)Bid</b>	C-terminal fragment of BH3-interacting domain death agonist
<b>TACTILE</b>	T cells-activated increased late expression
<b>TACTILE</b>	T cells-activated increased late expression
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	Transforming Growth Factor beta 1
<b>TIGIT</b>	T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains
<b>TIGIT</b>	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>TRAIL-R</b>	TRAIL-receptor

## RESUMEN

La leucemia es el cáncer más frecuente en la población infantil. De acuerdo con la International Agency for Research on Cancer, las leucemias ocupan el primer lugar en incidencia y mortalidad entre todos los cánceres en la población infantil a nivel mundial, representando el 28% del total de incidencias y el 34% del total de las muertes<sup>[1-2]</sup>. Las células NK junto con los linfocitos T CD8, constituyen las principales células citotóxicas del sistema inmunológico y son responsables de la eliminación de células infectadas por virus y células malignas<sup>[43, 44]</sup>. En las últimas décadas, las células NK se han convertido en elementos cruciales para el desarrollo de inmunoterapias en las leucemias. Sin embargo, poco ha sido estudiado en relación con el fenotipo y el comportamiento de las células NK en la LLA. En este estudio analizamos el fenotipo y la función de las células NK identificadas como CD3<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> de sangre periférica en 72 pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico comparados con 21 controles pareados por edad. Nuestros resultados mostraron que la principal alteración en el fenotipo de las células NK en leucemia pediátrica recae en la disminución de la expresión de receptores activadores tales como NKP46, NKG2C, NKG2D, DNAM, CD57 y CD69. Adicionalmente, se identificó que dicha disminución ocurre de manera simultánea en diferentes familias de receptores activadores en más del 50% de los pacientes. En contraste, la expresión de receptores inhibitorios fue similar respecto al grupo control. Por otro lado, al analizar subpoblaciones de células NK en diferentes estadios de maduración de acuerdo con la expresión de NKG2A y CD57, encontramos frecuencias más altas en la población parcialmente inmaduras (NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>) y a su vez, frecuencias más bajas de la población terminalmente maduras (NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup>) en pacientes respecto al grupo control. Adicionalmente, las células NK de los pacientes mostraron una reducción significativa en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Finalmente, los análisis de regresión lineal, demostraron que una menor expresión de receptores activadores está asociada con el fenómeno de la leucemia linfoblástica aguda en pacientes pediátricos.



## **ABSTRACT (actualizer)**

Leukemia is the most common cancer in children. According to the International Agency for Research on Cancer, leukemias rank first in incidence and mortality among all cancers in children worldwide, representing 28% of total incidences and 34% of total deaths. [1 2]. NK cells, together with CD8 T lymphocytes, constitute the main cytotoxic cells of the immune system and are responsible for the elimination of virus-infected cells and malignant cells [43, 44]. In recent decades, NK cells have become crucial elements for the development of immunotherapies in leukemias. However, little has been studied in relation to the phenotype and behavior of NK cells in ALL. In this study, we analyzed the phenotype and function of peripheral blood CD3<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK cells in 72 pediatric patients with ALL at diagnosis compared to 21 age-matched controls. Our results showed that the main alteration in the phenotype of NK cells in pediatric leukemia lies in the decrease in the expression of activating receptors such as NKP46, NKG2C, NKG2D, DNAM, CD57 and CD69. Additionally, it was identified that this decrease occurs simultaneously in different families of activating receptors in more than 50% of patients. In contrast, the expression of inhibitory receptors was similar to the control group. On the other hand, when analyzing subpopulations of NK cells in different stages of maturation according to the expression of NKG2A and CD57, we found higher frequencies in the partially immature population (NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>) and, in turn, lower frequencies in the terminally immature population. mature (NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup>) in patients compared to the control group. Additionally, patients' NK cells showed a significant reduction in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Finally, linear regression analyzes demonstrated that a lower expression of activating receptors is associated with the phenomenon of acute lymphoblastic leukemia in pediatric patients.

# ÍNDICE

## Contenido

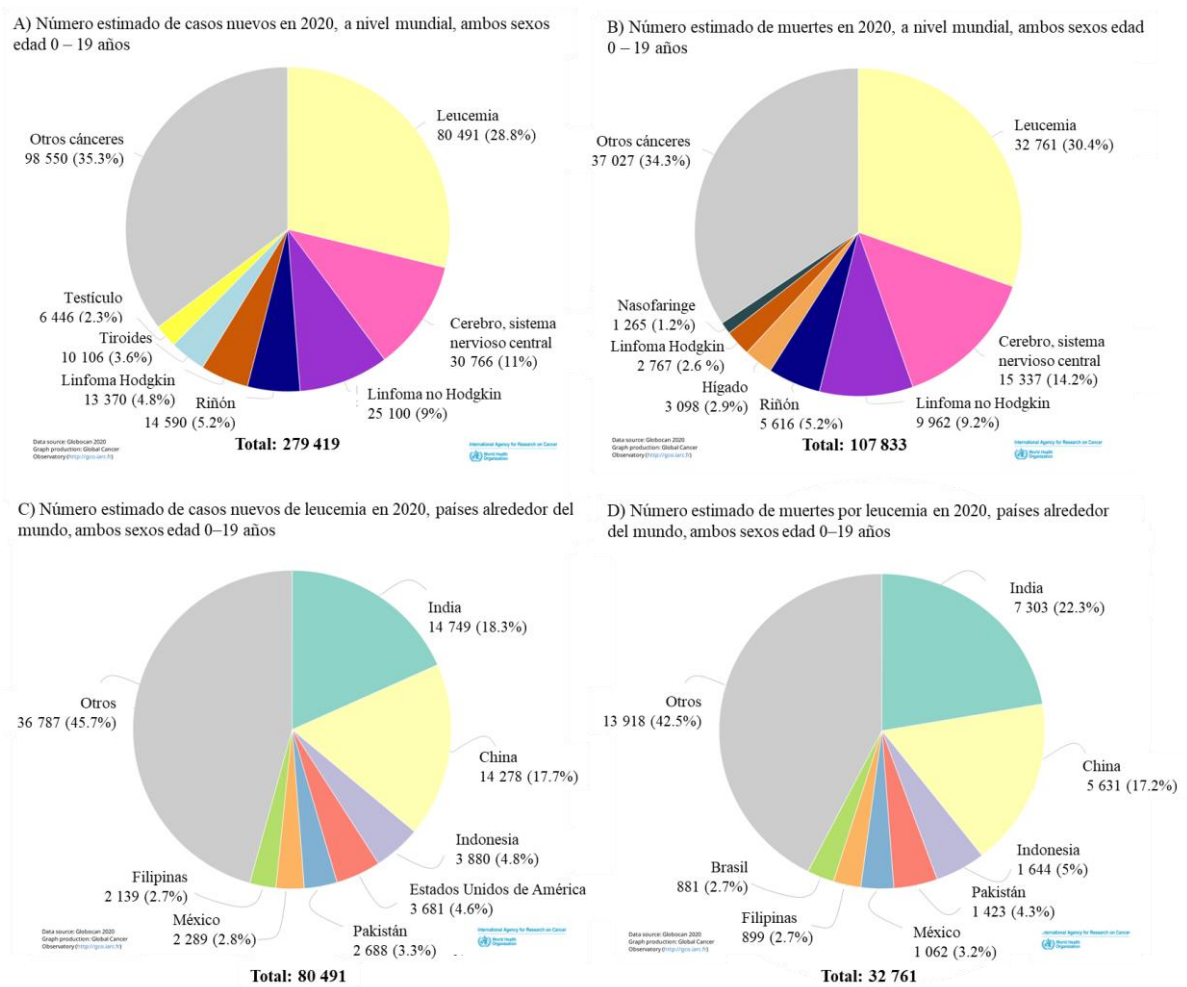
INTRODUCCIÓN.....	1
LEUCEMIA .....	1
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	2
DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN .....	3
FACTORES PRONÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE RIESGO .....	4
ETAPAS DEL TRATAMIENTO .....	8
BIOLOGIA DE LAS CÉLULAS NATURAL KILLER.....	9
FUNCIONES EFECTORAS DE LAS CÉLULAS NK .....	9
RECONOCIMIENTO DE CÉLULAS BLANCO .....	12
RECEPTORES DE LA CÉLULAS NK.....	12
RECEPTORES DE ACTIVACIÓN.....	12
RECEPTORES DE INHIBICIÓN.....	16
MARCADORES DE MADURACIÓN .....	20
CÉLULAS NATURAL KILLER EN LA INMUNOVIGILANCIA CONTRA EL CÁNCER.....	20
ANTECEDENTES DE CÉLULAS NK EN LEUCEMIAS.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
METODOLOGÍA.....	28
CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS (PACIENTES): .....	29
CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOS CONTROLES: .....	29
MUESTRAS.....	30
ANTICUERPOS.....	30

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE SUPERFICIE ....	31
ENSAYOS FUNCIONALES .....	31
ANÁLISIS DE CITOMETRÍA .....	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	33
ANÁLISIS BOOLEANO .....	33
RESULTADOS .....	34
DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN .....	34
FENOTIPIFICACIÓN DE CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA .....	36
EVALUACIÓN DE COEXPRESIÓN DE MARCADORES .....	40
EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD NATURAL DE CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA .....	43
DISMINUCIÓN CONCOMITANTE DE RECEPTORES DE ACTIVACIÓN EN PACIENTES CON ADCC-R DISMINUIDA.....	44
EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS NK Y SU ASOCIACIÓN CON LA LEUCEMIA. ....	45
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	58
PERSPECTIVAS .....	59
ANEXOS.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	66

# INTRODUCCIÓN

## LEUCEMIA

La leucemia es el cáncer más frecuente en la población infantil. De acuerdo con la International Agency for Research on Cancer, las leucemias ocupan el primer lugar en incidencia y mortalidad entre todos los cánceres en la población infantil a nivel mundial, representando el 28% del total de incidencias y el 34% del total de las muertes (Figura 1). A su vez, México es uno de los países con mayor incidencia y mortalidad por leucemias. En el 2020, México fue el 6to país a nivel mundial con mayor incidencia y el 5to con mayor mortalidad en leucemia infantil (Figura 1).



**Figura 1: Incidencia y mortalidad de Leucemia en población infantil 0-19 años.** A) Tipos de cáncer con mayor incidencia en población infantil<sup>[1]</sup>. B) Tipos de cáncer con mayor número de muertes en población infantil<sup>[2]</sup>. C) Países con mayor incidencia de leucemia en población infantil<sup>[3]</sup>. D) Países con mayor número de muertes por leucemia en población infantil<sup>[4]</sup>. Datos obtenidos y traducidos al español de Globocan 2020.

La leucemia es una neoplasia maligna que afecta el desarrollo de los glóbulos blancos. De acuerdo con el tiempo de progresión y del tipo de glóbulo blanco afectado, la leucemia puede clasificarse en cuatro subtipos: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia linfoblástica aguda (LLA) <sup>[5, 6]</sup>. Este último, es el subtipo de leucemia más común en la población infantil a nivel mundial y alcanza su mayor incidencia en niños entre 2 a 5 años <sup>[7]</sup>.

## **LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

La LLA es una neoplasia maligna heterogénea que resulta de la proliferación clonal de precursores linfoides, que inicia en médula ósea y puede comprometer diferentes órganos y/o sistemas. La transformación maligna y la expansión clonal en la LLA puede ocurrir en distintos estadios del proceso de diferenciación linfoide<sup>[6]</sup>. En el 50% de los casos esta enfermedad lleva a la muerte del paciente por lo que constituye un importante problema de salud en México y a nivel mundial.

El origen de la LLA es multifactorial, es decir, diversos factores genéticos, hereditarios y/o ambientales pueden incidir en el desarrollo de este tipo de malignidades hematopoyéticas. Alteraciones genéticas como polimorfismos, traslocaciones, hiperdiploidías y variantes genéticas en la línea germinal pueden dar origen a una susceptibilidad de desarrollar LLA. Los genes que con frecuencia suelen verse afectados en la LLA son aquellos involucrados en la diferenciación de células linfoides, supresores de tumor, reguladores del ciclo celular, reguladores de transcripción, entre otros<sup>[8-10]</sup>.

Algunos genes asociados con la predisposición de LLA son IKZF1<sup>[11-13]</sup>, PAX5<sup>[14, 15]</sup>, ETV6<sup>[16-21]</sup>, TP53<sup>[22]</sup>, RUNX1<sup>[23, 24]</sup>, entre otros. De hecho, se cree que algunas lesiones genéticas tienen origen prenatal y que condicionan a un estado preleucémico, donde alteraciones secundarias postnatales y generalmente aquellas derivadas de infecciones, aumentan el riesgo de desarrollar LLA<sup>[10, 25-31]</sup>.

Borkhardt y colaboradores demostraron que la exposición tardía a infecciones es un factor causal en la LLA de precursores de linfocitos B. En su modelo, Borkhardt y colaboradores observaron el desarrollo de LLA a partir de precursores de B en ratones Pax5<sup>+/-</sup> una vez que fueron expuestos a infecciones comunes que desencadenan mutaciones somáticas secundarias en genes como Jak3, lo cual conlleva a susceptibilidad de transformación maligna post infección <sup>[32]</sup>.

De manera similar, Borkhardt y colaboradores también demostraron, en un modelo murino, que ETV6-RUNX1 confiere riesgo (bajo) de desarrollar LLA a partir de precursores de células B, una vez que son expuestos a patógenos comunes. En congruencia con esto, ETV6-RUNX1 es una de las fusiones genéticas más comúnmente encontrada en malignidades hematopoyética y su presencia se asocia a LLA del tipo pre-B. De esta manera, esta alteración cromosómica parece conferir un riesgo bajo de desarrollar leucemia, por lo que se requieren eventos genéticos adicionales o secundarios para desarrollar LLA del tipo pre- B. Los estudios en gemelos monocigóticos con LLA concordante han revelado que la fusión del gen ETV6-RUNX1 representa el primer evento o “hit” en el proceso de leucemogénesis, creando un clon preleucémico, que requiere de aberraciones genéticas posnatales secundarias <sup>[33]</sup>. En otras palabras, variantes en la línea germinal de determinados factores de transcripción como IKZF1 <sup>[11-13]</sup>, PAX5 <sup>[14, 15]</sup>, ETV6 <sup>[16-21]</sup>, RUNX1 <sup>[23, 24]</sup> y sobre todo aquellos involucrados en el desarrollo de linfocitos, confieren susceptibilidad a tener mutaciones somáticas posterior a infecciones. Estas mutaciones somáticas a su vez promueven el reordenamiento génico y conlleva a mutaciones generalizadas del ADN como mecanismo de la respuesta inmune<sup>[9]</sup>.

## **DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN**

Las manifestaciones clínicas de la LLA incluyen: astenia, disnea, anorexia, pérdida de peso involuntario, palidez, anemia, petequias o hemorragias, infecciones, fiebre y dolor óseo. Para detectar organomegalia e infiltración de células leucémicas, los estudios se complementan con la medición de hígado, bazo, adenopatías y testículos <sup>[34-36]</sup>.

Posterior al examen físico el diagnóstico se confirma tomando un aspirado de médula ósea, con el cual se realiza el análisis morfológico, citoquímico, y el de inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica y citogenética <sup>[34-36]</sup>.

De acuerdo con la FAB (La clasificación Franco-Americana-Británica), basado en la morfología las leucemias linfoblásticas agudas se clasifican de la siguiente manera:

- L1: Células pequeñas con cromatina homogénea, escaso citoplasma.
- L2: Células grandes y heterogéneas, con núcleo irregular y citoplasma variable.
- L3: Células grandes y homogéneas, con más de 5% de mitosis y por lo menos 25% de células vacuoladas.

De acuerdo con el inmunofenotipo, el cual determina la estirpe de células malignas y el estadio de maduración<sup>[34-36]</sup>.

- Leucemias de linaje B son:

**Pro-B:** CD19<sup>++</sup>, CD79a<sup>++</sup>, CD22<sup>++</sup>, TdT<sup>++</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD34<sup>++</sup>, HLA DR<sup>++</sup>, CD20<sup>-</sup>, cIgM<sup>-</sup>, mIgM<sup>-</sup>.

**Pre- B común (CALLA):** CD19<sup>++</sup>, CD79a<sup>++</sup>, CD22<sup>++</sup>, TdT<sup>++</sup>, CD10<sup>++</sup>, CD20<sup>+/-</sup>, cIgM, mIgM<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>.

**Pre- B:** CD19<sup>++</sup>, CD79a<sup>++</sup>, CD22<sup>++</sup>, TdT<sup>++</sup>, CD10<sup>+/-</sup>, CD20, cIg<sup>++</sup>, mIg<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, cadena  $\mu$  citoplasmática<sup>+</sup>.

**B madura:** CD19<sup>++</sup>, CD79a<sup>++</sup>, CD22<sup>++</sup>, TdT<sup>-</sup>, CD10<sup>++</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD24, mIg<sup>++</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, cadenas pesadas  $\mu$ ,  $\kappa$  o  $\lambda$ <sup>+</sup>.

- Leucemias de linaje T son:

TdT<sup>+</sup> con expresión variable de CD1a, CD2, CD4, CD3 citoplasmático, CD5, CD7, CD8, TCR  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$ .

## **FACTORES PRONÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE RIESGO**

A través de los años, se han identificado diversas características clínicas, biológicas, genéticas y moleculares como factores que pueden pronosticar un resultado posible en los pacientes con LLA. En la actualidad, algunos factores pronósticos son utilizados para estratificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo que indica la probabilidad de recaída de la enfermedad (Tabla 1) La estratificación de pacientes en grupos de riesgo permite administrar un tratamiento de menor intensidad en pacientes con bajo riesgo y así minimizar la toxicidad, mientras que los pacientes con alto riesgo reciben un tratamiento más agresivo y prolongado, o bien que busca aplicar diferentes tipos de terapias<sup>[37]</sup>. De esta manera, los factores pronósticos juegan un papel crítico en la dirección de la terapia en pacientes con LLA.

**Tabla 1: Resultados (en 4 años SLE) para niños con LLA Pre-B tratados con los protocolos POG (ALinC-14) y CCG (-100 y -1800 series) por edad múltiple y categorías de cuenta leucocitaria.**

	Edad (años)			
Cuenta leucocitaria ( $\mu$ )	1.00-2.99	3.00-5.99	6.00-9.99	$\geq 10.00$
<10,000	82.9	84.7	82.0	69.6
<b>4 años de SLE (%)</b>				
<b>n de pacientes tratados</b>	490	937	437	406
<b>% pacientes Pre-B</b>	10.7	20.5	9.6	8.9
10,000-49,99	74.6	74.5	80.2	59.2
<b>4 años de SLE (%)</b>				
<b>n de pacientes tratados</b>	436	608	205	236
<b>% pacientes Pre-B</b>	9.5	13.3	4.5	5.2
$\geq 50,000$	68.3	73.9	47.5	41.1
<b>4 años de SLE (%)</b>				
<b>n de pacientes tratados</b>	278	280	122	140
<b>% pacientes Pre-B</b>	6.1	6.1	2.7	3.1

\*Nota: Los resultados son para todos los pacientes en esa categoría de edad/recuento leucocitario, independientemente del tratamiento recibido; POG: Pediatric Oncology Group; CCG: Children's Cancer Group; SLE: Sobrevida Libre de Enfermedad. Reproducido de [37-39].

La clasificación más utilizada para estratificar a los pacientes por grupo de riesgo es la del National Cancer Institute (NCI). Aquellos pacientes con una cuenta de leucocitos mayor ó igual a 50,000 leucocitos por  $\text{mm}^3$  o más de 10 años de edad son clasificados como de alto riesgo; mientras que los pacientes con una cuenta de leucocitos menor a 50,000  $\text{xmm}^3$  y entre 1 a 9.99 años son clasificados como de riesgo estándar [37, 38]. En la Tabla 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra la relación entre la edad, cuenta leucocitaria y el pronóstico de los niños tratados con los regímenes del Grupo de Oncología Pediátrica (POG, del inglés Pediatric Oncology Group) y del Grupo de Cáncer Infantil (CCG, del inglés Children's Cancer Group) a partir de 1993.



A pesar de que los dos factores predictivos más importantes son la edad y cuenta leucocitaria al momento del diagnóstico, estudios recientes sugieren que variables tales como el sexo, inmunofenotipo y los perfiles genéticos (traslocaciones e hiperdiploidías), la infiltración de células cancerígenas y la Enfermedad Mínima Residual (EMR), pueden influenciar en el factor de riesgo de la LLA (Tabla 2) <sup>[37]</sup>.

**Tabla 2: Factores pronóstico en leucemia linfoblástica aguda infantil.**

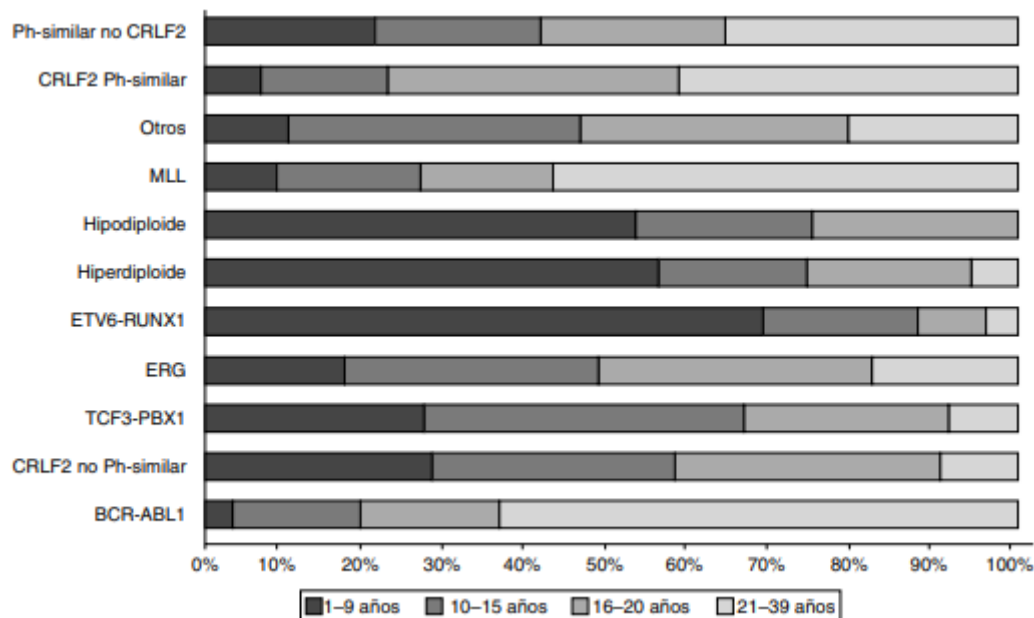
Factor de riesgo	Resultado		Determina la intensidad de tratamiento
	Favorable	Desfavorable	
Edad*	$\geq 1$ y $\leq 9$ años	$< 1$ o $> 9$ años	Sí
Cuenta leucocitaria*	$< 50,000/\text{mm}^3$	$\geq 50,000/\text{mm}^3$	Sí
Inmunofenotipo	Precursor de B	Células T, células B madura	Sí
Sexo	Mujer	Hombre	No
Infiltración al SNC	SNC I	SNC 2, SNC 3	Sí
Respuesta a la ventana esteroidea	$< 1,000/\text{mm}^3$ blastos en sangre periférica	$\geq 1000/\text{mm}^3$ blastos en sangre periférica	Sí
Enfermedad Mínima Residual	Negativa	Positiva	Sí
Índice de DNA	$> 1.16$	$\leq 1.16$	No
Número de cromosomas por célula leucémica	Hiperdiploidía $> 50$	Hipodiploidía $< 45$ , especialmente 24-28	No
Citogenética/ Traslocaciones	<i>t(12;21)/TEL-AML1 (ETV6-RUNX), t(1;19)E2A-PBX1</i>	<i>t(9;22)/BCR-ABL1, t(4;11)/MLL-AF4</i>	Sí
Raza/ grupo étnico	Caucásicos, asiáticos	Afroamericanos	No

\*: Los factores pronóstico más importantes son la edad y cuenta leucocitaria. SNC 1: Sin evidencia de compromiso del SNC ( $< 5$  células/ $\text{mm}^3$  y sin blastos); SNC 2:  $< 5$  células/ $\text{mm}^3$  y blastos detectables por citometría de flujo; SNC 3:  $> 5$  glóbulos blancos/ $\text{mm}^3$  morfológicamente blastos. Modificado de <sup>[37]</sup>.

Entre el 2006 y 2007 el 73.2% del total de leucemias infantiles diagnosticadas en la Ciudad de México pertenecieron al linaje Pre-B <sup>[7]</sup>. Las leucemias de linaje Pre-B son las más frecuentes y con un pronóstico favorable, especialmente si son CD10 + (CALLA).

En contraste, las leucemias de células B o T, son menos frecuentes y de mal pronóstico [36].

Uno de los 4 rearrreglos génicos más frecuentes en la LLA infantil, es la translocación ETV6-RUNX, que da origen al transcrito TEL-AML1. Está directamente asociado con el linaje pre-B y su detección es considerada un factor de pronóstico favorable [37, 38, 40]. Por el contrario, el cromosoma filadelfia (*BCR-ABL1*), producto de la traslocación t(9;22)(q34;q11), que se observa con mayor frecuencia en adultos que niños, está asociado con un mal pronóstico (Figura 2: Tipos de leucemia linfoblástica aguda basados en el **perfil de expresión génica (análisis del transcriptoma) y su distribución por rangos de edad**. Reproducido de Morales SJ, 2017 [8]). La LLA con cromosoma filadelfia es la más difícil de tratar, tienen tasas bajas de remisión de la enfermedad y por lo general se requiere aplicar de otras terapias [8].



**Figura 2: Tipos de leucemia linfoblástica aguda basados en el perfil de expresión génica (análisis del transcriptoma) y su distribución por rangos de edad.** Reproducido de Morales SJ, 2017 [8].

La respuesta al tratamiento también es un factor determinante, sobre todo en la reclasificación de grupo de riesgo. Por ejemplo, la ventana de esteroidea es parte inicial del tratamiento en la LLA y se utiliza para evaluar la respuesta al medicamento como factor pronóstico. En esta etapa, usualmente se utiliza prednisona a 40mgm<sup>2</sup>scdía x 7 días y una dosis de triple intratecal ajustada a la edad. Una respuesta a la ventana esteroidea con menos de 1,000/mm<sup>3</sup> blastos en sangre periférica tiene un pronóstico favorable,

mientras que mayor o igual a  $1000/\text{mm}^3$  blastos tiene un resultado desfavorable [41]. Por otro lado, la enfermedad residual mínima (ERM) es un factor de riesgo relevante que hace referencia a las células cancerosas residuales que quedan en el cuerpo después del tratamiento. Las investigaciones muestran que la evaluación de enfermedad residual mínima, después de la fase de inducción del tratamiento para la LLA, puede predecir la eficacia del tratamiento empleado. La ausencia de ERM está asociada a menores tasas de recaída y posiblemente a mayores tasas de supervivencia. Por lo tanto, una ERM negativa es favorable, mientras que una ERM positiva es indicador de que los pacientes corren un mayor riesgo de sufrir una recaída [38].

## **ETAPAS DEL TRATAMIENTO**

El tratamiento para pacientes con LLA consiste en 3 fases: inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento.

1. Inducción de la remisión. El propósito de esta fase es destruir la mayor parte de las células leucémicas, así como recuperar la hematopoyesis normal en un periodo aproximado de 6 semanas. Se prescriben medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de ADN, tales como vincristina, prednisona y L-asparaginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorrubicina, los cuales no producen daño a la médula ósea normal; sin embargo, no son eficaces para el tratamiento a largo plazo. Con tratamiento adecuado y cuidado de soporte efectivo, el grado de remisión actual es de 70 a 90%. Una respuesta medular temprana se correlaciona con un pronóstico favorable.

2. Consolidación o postremisión. Con la recuperación de la hematopoyesis se inicia el tratamiento de consolidación, que debe iniciarse al terminar la fase de inducción. Su objetivo es destruir las células malignas remanentes que han superado la etapa anterior, que podrían comenzar a crecer nuevamente y provocar una recaída. En esta etapa, se pueden emplear medicamentos que afectan la síntesis de ADN y que, además pueden destruir las células en reposo o fuera del ciclo G0 del ciclo celular. En esta etapa son administradas altas dosis de metotrexato, con o sin 6-mercaptopurina, Lasparginasa y citarabina, o bien una combinación de dexametasona, vincristina, Lasparginasa, doxorubicina y tioguanina, con o sin ciclofosfamida.

3. Tratamiento de mantenimiento. Este tratamiento es administrado a largo plazo (durante dos o tres años). El blanco de esta última fase son las últimas células residuales leucémicas, es decir, su destrucción total con medicamentos que intervienen en la síntesis de ADN. Los fármacos que se prescriben durante esta etapa son dosis diarias de

mercaptopurina y dosis semanales de metotrexato, que generan la mielosupresión y además son bien tolerados <sup>[42]</sup>.

## **BIOLOGIA DE LAS CÉLULAS NATURAL KILLER**

Las células Asesinas naturales (NK, del inglés Natural Killer) son linfocitos que representan del 5-20% de las células linfoides en sangre periférica, que también se encuentran en órganos linfoides y tejidos periféricos. Las células NK junto con los linfocitos T CD8, constituyen las principales células citotóxicas del sistema inmunológico y son responsables de la eliminación de células infectadas por virus y células malignas <sup>[43, 44]</sup>.

Fenotípicamente las células NK se identifican por carecer de la expresión de CD3, mientras que expresan la molécula de adhesión de células neuronales (NCAM, del inglés Neural Cell Adhesion Molecule), también conocida como CD56. A diferencia de otros linfocitos como lo son las células T y B, las NK no expresan receptores para antígenos específicos, en su lugar poseen un amplio y variado repertorio de receptores codificados en línea germinal con funciones activadoras e inhibidoras que median su activación citotóxica <sup>[43-45]</sup>.

## **FUNCIONES EFECTORAS DE LAS CÉLULAS NK**

Un balance entre las señales de activación e inhibición emitidas por los receptores de superficie es lo que determina la actividad citotóxica de las células NK.

Las células NK cuentan con distintas funciones efectoras que permiten llevar a cabo la inmunovigilancia. Estas funciones efectoras consisten en: la liberación de gránulos citotóxicos y la inducción de apoptosis mediada por receptores de muerte <sup>[46, 47]</sup>.

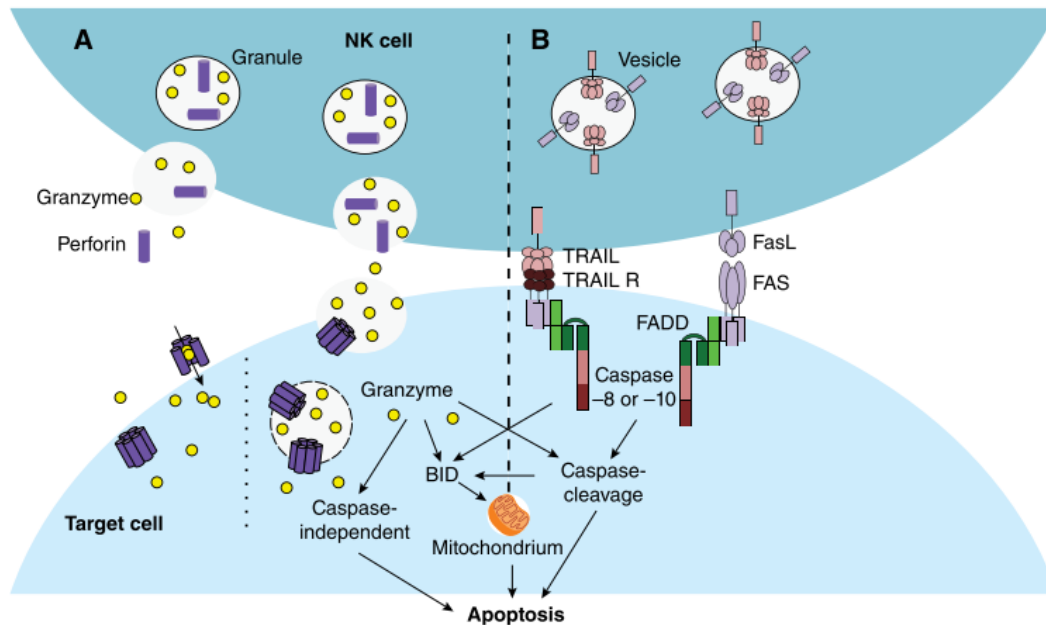
Las células NK se encuentran equipadas con gránulos citotóxicos precargados con perforina y granzimas, los cuales son liberados una vez que reconocen a una célula blanco. La perforina en el interior de los gránulos se encuentra en su forma inactiva, de manera tal que no representa riesgo para la célula efectora. Sin embargo, una vez que estos gránulos son secretados, la perforina adopta su forma activa y se ancla a la membrana de la célula blanco como parte de un complejo macromolecular. Una vez anclada a la membrana, la perforina genera poros que dan paso a las granzimas hacia el citosol. Sin embargo, la internalización de granzima no es dependiente de perforina, ya que es capaz de entrar en la célula blanco a través de endocitosis mediada por receptores,

como es el caso de la granzima B a través del receptor de manosa 6-fosfato (MPR, del inglés mannose 6-phosphate receptor). Una vez dentro de la célula blanco, las granzimas pueden inducir apoptosis a través de 3 vías distintas: mediante daño a la membrana mitocondrial, mediante la activación de caspasas o mediante vías independientes de caspasas. La apoptosis por permeabilización de la membrana mitocondrial ocurre cuando la granzima B escinde y activa la proteína Bid (del inglés, BH3-interacting domain death agonist). La forma trunca de esta proteína t(c)Bid (del inglés, C-terminal fragment), se transloca a la membrana mitocondrial externa y promueve su permeabilización, lo que conlleva a la liberación de varias proteínas mitocondriales proapoptóticas en el citoplasma que desencadenan vías de muerte dependientes e independientes de caspasa. Por otro lado, la apoptosis mediada por granzima a través de la vía dependiente de caspasas consiste en la escisión de caspasa-3 y caspasa-7, lo que permite su homodimerización, lo que a su vez da como resultado su activación. Posteriormente, estas caspasas inducen la muerte celular dependiente de caspasa mediante la escisión de diferentes sustratos celulares (Figura 3)<sup>[46, 48]</sup>.

Además de la liberación de gránulos citotóxicos, las NK pueden eliminar a las células blanco a través de la unión de ligandos a los receptores de muerte. Los receptores Fas (también conocido como CD95) y TRAIL-R (del inglés, TRAIL-receptor) se expresan en la superficie de células tumorales o infectadas por virus. Fas y TRAIL-R inducen muerte celular cuando se entrecruzan con sus respectivos ligandos, FasL (del inglés, Fas Ligand) y TRAIL (del inglés, TNF-related apoptosis-inducing ligand), que se expresan principalmente en la superficie de células citotóxicas como las células T y NK, aunque también pueden expresarse en monocitos, macrófagos y células dendríticas. TRAIL y FasL se expresan únicamente en células NK cuando estas se encuentran activadas. La estimulación con IL-2, IL-15, IL-12 e IFNs inducen la expresión de TRAIL en células NK<sup>[46, 47]</sup>.

Tanto FasL como TRAIL son proteínas transmembranales de tipo II que pertenecen a la superfamilia del TNF. Se han identificado cinco receptores TRAIL en humanos, y solo TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5) contienen un dominio citoplasmático completo que alberga un dominio de muerte intracelular (DD, del inglés death domain), por lo que son capaces de transducir señales apoptóticas. Los receptores TRAIL-R3 y TRAIL-R4, por otro lado, tienen una parte intracelular truncada y, al carecer de un dominio de muerte, funcionan como señuelos para regular la muerte celular mediada por TRAIL en ausencia de dicho dominio. El entrecruzamiento de Fas, TRAIL-R1 y TRAIL-R2 con sus ligandos

FasL y TRAIL, respectivamente, desencadenan una cascada de señalización apoptótica que comienza con la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC, del inglés, death-inducing signalling complex), lo que conduce a la activación de las caspasas 8 y 10, lo que resulta en una cascada de caspasas, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial y, finalmente, en la inducción de la apoptosis (Figura 3)<sup>[46, 47]</sup>.



**Figura 3: Funciones efectoras de las células NK:** (A) Las células NK se encuentran equipadas con gránulos citotóxicos precargados con perforina y granzimas, los cuales se liberan de manera dirigida una vez que reconocen a una célula blanco. Las granzimas pueden ingresar a la célula diana a través de los poros que realiza la perforina en la membrana plasmática (izquierda) o mediante endocitosis a través del MPR y escapando posteriormente de los endosomas con la ayuda de perforina (derecha). Las granzimas tienen tres mecanismos para inducir apoptosis: induciendo la activación de caspasas, disrupción de la membrana mitocondrial o apoptosis independiente de caspasas. (B) Otro mecanismo por el cual pueden ejercer citotoxicidad es a través del entrecruzamiento de los ligandos FasL y TRAIL con los receptores de muerte respectivos. Esto da como resultado la activación de caspasas, disfunción mitocondrial y apoptosis<sup>[46]</sup>.

Otro mecanismo que le permite a las células NK mediar la inmunovigilancia contra células infectadas por virus y células cancerígenas es la secreción de citocinas proinflamatorias como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , del inglés Tumor Necrosis Factor). Con la secreción de citocinas, las células NK desempeñan un rol principalmente inmunomodulador de las respuestas tanto innata como adaptativa,

regulando a las células presentadoras de antígeno y las células T<sup>[44]</sup>. Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  puede regular la vigilancia tumoral mediada por TRAIL, no solo regulando la expresión de TRAIL en las células efectoras, sino también sensibilizando las células tumorales a la citotoxicidad mediada por TRAIL. También, muchas células tumorales normalmente no expresan Fas, pero las células NK inducen directamente la expresión de Fas en las células cancerosas mediante la secreción de IFN- $\gamma$  y luego las destruyen de una manera dependiente de Fas. Si bien, la secreción de citocinas no conlleva a una lisis directa, contribuyen en gran medida a orquestar la respuesta inmune antitumoral y antiviral<sup>[46, 47]</sup>.

## **RECONOCIMIENTO DE CÉLULAS BLANCO**

Las células NK tienen la capacidad de diferenciar entre una célula blanco y una célula sana, en primera instancia, mediante el proceso llamado “missing-self”, en el cual las células malignas o infectadas por virus disminuyen la expresión de las moléculas de MHC clase I en su superficie. Las moléculas de MHC clase I funcionan como ligandos inhibiendo las respuestas efectoras de la célula NK, a través de los receptores tipo Ig de células asesinas (KIR, del inglés Killer-cell immunoglobulin-like receptors). De esta manera, a menor expresión de MHC, menor inhibición de la respuesta efectora mediada por células NK<sup>[49]</sup>.

Junto con la pérdida de MHC clase I las células malignas o infectadas por virus, comienzan a expresar ligandos para receptores de activación en su superficie, favoreciendo el balance de señales de activación en la respuesta efectora de las células NK<sup>[49]</sup>.

## **RECEPTORES DE LA CÉLULAS NK**

Las células NK poseen una maquinaria efectora sumamente compleja. Por consiguiente, su actividad citotóxica depende del balance entre las señales activadoras o inhibitoras que emanan los receptores de superficie anclados a membrana, los cuales se activan al entrecruzar con sus respectivos ligandos en las células blanco. El repertorio de receptores que poseen las células NK incluyen: receptores de activación, inhibición, marcadores de maduración y receptores con función dual o de interruptor<sup>[44, 49]</sup>.

## RECEPTORES DE ACTIVACIÓN

La actividad lítica de las células NK puede verse favorecida por los diferentes tipos de receptores de activación en cualquier mecanismo de acción sea: adhesión, polarización y/o degranulación<sup>[44]</sup>.

La familia de receptores de citotoxicidad natural (NCR, del inglés natural cytotoxicity receptors) está integrada por NKp30<sup>[50]</sup>, NKP46 y NKP44<sup>[51, 52]</sup>. A diferencia de NKp30 y NKp46 que se expresan de forma constitutiva en células NK, NKP44 se expresa únicamente en células NK activadas. El entrecruzamiento de NKp46 da como resultado la producción de citocinas y la actividad citolítica. Además, se ha demostrado que la citotoxicidad natural de las células NK contra células blanco MHC clase-1 negativos se correlaciona con el nivel de expresión de NKp46 en las células NK<sup>[53]</sup>. Por otra parte, Uzi Hadad y colaboradores, demostraron que NKP46 regula directamente la sinapsis inmunológica y favorece la polarización de los gránulos citotóxicos durante la sinapsis inmune<sup>[54]</sup>. La adquisición de NCRs durante la maduración de las células NK está correlacionada con la adquisición de actividad citotóxica contra células diana tumorales<sup>[55]</sup>. Asimismo, la disminución en la expresión de NKp30, NKp44 y NKp46 correlaciona con una actividad citotóxica baja<sup>[56]</sup>.

La familia de receptores CD94/NKG2 es una de las mejores vías descrita. Es una familia de receptores de lectina de tipo C que se expresan predominantemente en la superficie de las células NK y un subconjunto de linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>[57]</sup>. Esta familia involucra tanto a receptores de activación (NKG2C), cómo de inhibición (NKG2A). CD94 forma un heterodímero a través de un enlace disulfuro con el receptor NKG2C que, a su vez, se encuentra asociado de manera no covalente con DAP12<sup>[58, 59]</sup>. El heterodímero CD94-NKG2C reconoce moléculas no polimórficas de clase I del MHC (HLA-E en humanos).

Es bien sabido que las células NK tienen la capacidad de moldearse a su entorno. Con este tipo de adaptaciones se ve favorecida la funcionalidad de las células NK de acuerdo con los retos presentados. El ejemplo más claro de esta capacidad de adaptación es el que se ha reportado en humanos con historial de infección por citomegalovirus (HCMV, del inglés Human citomegalovirus), donde ha encontrado asociación con un mayor porcentaje de células NK que expresan niveles altos de NKG2C. Esta adaptación en su fenotipo le confiere mayor actividad efectora hacia células HCMV +<sup>[60, 61]</sup>.

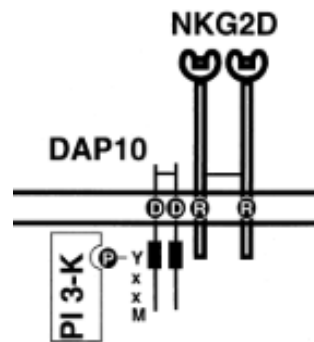
NKG2D es un receptor de lectina tipo C que se expresa en células NK y un subtipo de células T. Sin embargo, NKG2D difiere por estar presente como un receptor



homodimérico que reconoce una de varias moléculas de la superficie celular que solo están relacionadas de forma distante con las moléculas MHC de clase I. El gen que codifica para NKG2D se encuentra ubicado junto a los otros genes de la familia NKG2, formando un complejo llamado complejo de NK (NKC) [62].

NKG2D contiene un residuo básico dentro de su dominio transmembranal y requiere una asociación con DAP10 para la expresión de superficie. El ensamblaje de este complejo de receptores parece ser altamente específico, ya que in vivo DAP10 y DAP12 interactúan exclusivamente con NKG2D o NKG2C respectivamente, a pesar de las similitudes en sus regiones transmembranales [63].

Debido a que NKG2D no posee un dominio citoplasmático bien conservado, carece de motivos de señalización positiva propia. Sin embargo, las señales de activación están dadas por DAP10 a través de su dominio citoplasmático, funcionando así, como un adaptador de señalización de membrana que conduce a la activación de PI3 cinasa corriente abajo, lo que lleva a la activación de las funciones efectoras de células NK (Figura 4) [63].



**Figura 4: Activación de células NK mediante NKG2D.** DAP10, a través de la secuencia conservada YxxM, que se asemeja al motivo de unión SH2 de la subunidad p85 de la PI-3 cinasa, conduce a la activación corriente abajo de PI-3 cinasa y con ello desata la actividad efectora de las células NK [63].

NKG2D reconoce al menos 6 ligandos, los cuales tienen homología a MHC de clase I. Tres de ellas son proteínas transmembrana (MICA, MICB y ULBP4) [64, 65] y 3 proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol (ULBP1-3) [59]. Como resultado del entrecruzamiento receptor-ligando, NKG2D fosforila una proteína adaptadora que recluta y activa la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3), que a su vez da lugar a citotoxicidad dependiente de perforina [66]. De manera interesante, los ligandos de NKG2D no se expresan en tejidos

normales, sino que se inducen durante momentos de genotoxicidad o estrés celular como se ve con la transformación viral y maligna, por ejemplo, MICA se encuentra expresado en células de carcinoma de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata y colon <sup>[67]</sup>. Por consiguiente, aquellos tejidos normales que expresan moléculas de MHC clase-1, así como ligandos de al menos un receptor de inhibición de las células NK y carecen de expresión de ligandos para NKG2D, no son susceptibles a lisis mediada por células NK<sup>[68]</sup>.

La molécula accesoria DNAX (DNAM, del inglés DNAX accessory molecule) es un receptor de la familia de glicoproteínas tipo Ig que se expresa en la mayoría de las células NK humanas, monocitos y linfocitos T <sup>[69]</sup>. Lanier y colaboradores demostraron el papel crucial de DNAM-1 al bloquear con un anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 (DX11). Este estudio demostró la inhibición de la citotoxicidad de las células NK contra una gran variedad de líneas de células tumorales al inhibir el receptor <sup>[70]</sup>.

DNAM-1 se une al receptor de poliovirus CD155 y a la molécula de adhesión de nectina CD112, cuya expresión está regulada por estrés celular <sup>[71]</sup>. El mecanismo por el cual DNAM-1 media señales de activación en la célula NK está dado por un motivo citoplasmático denominado ITT por sus siglas en inglés que es responsable de mediar la asociación de DNAM-1 con GRB2 (del inglés, Growth factor receptor-bound protein 2) y con moléculas efectoras cascada abajo como Vav-1 <sup>[72]</sup>. Se ha reportado que CD155 y CD112 se expresan en una amplia gama tanto de tumores sólidos como hematológicos <sup>[73]</sup>. En pacientes con neuroblastoma, los niveles de expresión de CD155 y CD112 se correlaciona con la susceptibilidad de las células tumorales a la lisis mediada por células NK <sup>[74]</sup>. Sin embargo, los tumores han desarrollado mecanismos para disminuir la expresión de DNAM-1 en células NK, lo que conlleva a inmunosupresión <sup>[75]</sup>. Por consiguiente, DNAM-1 juega un rol crucial en la prevención de la formación espontánea de tumores, así como en el control del crecimiento tumoral <sup>[76, 77]</sup>.

CD69 es una molécula de activación de leucocitos expresada en sitios de inflamación crónica. El gen CD69 codifica una lectina de tipo C asignada a la familia de los receptores NK. Se expresa después de la activación en todas las células derivadas de médula ósea, excepto los eritrocitos <sup>[78]</sup>. Por lo anterior, CD69 no se expresa en células NK en reposo. La activación de células NK con IL-2, IFN- $\alpha$ , IL-7 e IL-12, PMA y el entrecruzamiento de CD16 inducen su expresión <sup>[79-81]</sup>.

La estructura, localización cromosómica, expresión y la función de CD69 sugieren que esta molécula es probable que sea un regulador inmunitario pleiotrópico, potencialmente importante no solo en la función de las células NK, sino también en la activación y diferenciación de una gran variedad de células de origen hematopoyético [82]. Estructuralmente, CD69 posee un dominio citoplasmático tan corto, que carece de un motivo asociado a alguna función identificable. Se ha demostrado que, CD69 activa Syk de forma dependiente de Src en células NK [83]. Estas cinasas de tirosina controlan la activación posterior de la fosfolipasa Cg2 (PLCg2) y de Vav-1 que, a su vez, activan la ruta Rac-ERK [84], la cual está implicada en la activación de las células NK. Algunos estudios han reportado la participación de una proteína G heterotrimérica acoplada a CD69 en su vía de señalización intracelular [85-87].

CD16 (FcγRIII) es un receptor de baja afinidad de la porción Fc de IgG y es el receptor responsable de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) la cual juega un rol importante en la destrucción de células tumorales y células infectadas por virus. Interesantemente, CD16 parece ser el único receptor capaz de promover funciones efectoras sin necesidad de la participación de receptores coestimuladores, aunque el mecanismo molecular aún no está bien descrito [88, 89]. CD16 se asocia con cadenas FcεRIγ o cadenas CD3ξ, ya sea como homodímeros o heterodímeros. Tanto FcεRIγ y CD3ξ presentan motivos ITAM. Tras el entrecruzamiento de FcγR, las tirosinas en los motivos ITAM se fosforilan por los miembros de familia Src, las cuales promueven el reclutamiento y la activación de las cinasas ZAP y Syk. Como consecuencia, se produce la activación de vías de señalización que involucran a PI3K, ERK y NFκB. En las células NK, la señalización a través de CD16 conduce a 3 funciones efectoras principales, incluida la liberación de gránulos citotóxicos, la activación de TNF-α familia de receptores de muerte, así como a la liberación de citocinas proinflamatorias como IFN-γ y TNF-α [47].

### RECEPTORES DE INHIBICIÓN

Es bien sabido que, la activación de células NK no depende de la participación exclusiva de un solo tipo de receptor. Cuando la sinergia de señales que emanan de las regiones citoplasmáticas de varios receptores logra superar un umbral de activación, entonces permite que se desencadene la función efectora de la célula NK mediante la secreción de citocinas y la liberación de gránulos citotóxicos. La combinación particular que se logra tanto de receptores de activación como de inhibición contribuye a modular la activación de las células NK y proporciona flexibilidad para detectar y responder a distintos tipos de

estímulos ambientales <sup>[90]</sup>. Por consiguiente, así como receptores de activación juegan un rol importante en la función citotóxica de las células NK, también los receptores de inhibición tienen un papel crucial ya que ayudan a restringir las funciones efectoras de las células NK en contextos en la que estas no son requeridas. Algunos receptores de inhibición encargados de modular la actividad citotóxica de las células NK son NKG2A, CD96, TIGIT, PD-1, SIGLEC-7, CD85j y los KIRs<sup>[90]</sup>.

Entre los miembros de la familia NKG2 se encuentran receptores tanto de activación como de inhibición. Investigaciones recientes revelaron que el complejo CD94 / NKG2A reconoce el HLA-E, que se une a los péptidos líderes originados en los alelos HLA-A, -B, -C o -G <sup>[91-93]</sup>. De este modo, HLA-E está encargado de monitorear el nivel de expresión general de moléculas MHC clase I en la superficie celular, lo que permite que las células NK examinen las moléculas HLA de clase I, utilizando un solo tipo de receptor <sup>[94]</sup>. La interacción de CD94 / NKG2A con HLA-E transmite señales negativas a través de la subunidad ad NKG2A la cual lleva consigo un dominio ITIM <sup>[95]</sup>, lo que suprime las funciones efectoras de las células NK. La alteración en la expresión de HLA-E y CD94 / NKG2A está reportada en numerosas patologías de tipo maligno y se asocia con un pronóstico desfavorable. En pacientes con cáncer colon-rectal, la expresión tumoral de HLA-E se asocia con un menor tiempo de supervivencia sin enfermedad <sup>[96]</sup>. En pacientes con cáncer de mama, la expresión de NKG2A por células NK infiltrantes de tumores aumenta con la progresión del cáncer y se correlaciona con funciones de las células NK alteradas <sup>[97]</sup>.

TIGIT (del inglés, T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) y CD96 (también conocido como TACTILE, del inglés: T cells-activated increased late expression) son receptores de inhibición que pertenecen a la familia de inmunoglobulinas. Mientras que DNAM-1 (del inglés, DNAX Accessory Molecule-1) media señales de activación, TIGIT y CD96 contrarrestan la activación al proporcionar señales de inhibición, (un sistema similar al de CD28/CTLA-4) <sup>[98]</sup>. Como se mencionó con anterioridad, DNAM-1 reconoce al receptor de poliovirus CD155, el cual es también ligando para CD96 y TIGIT mientras que la molécula de adhesión de nectina CD112 es reconocida solo por DNAM-1 y TIGIT.

Tanto TIGIT como CD96 contienen un motivo ITIM donde median las señales de inhibición en leucocitos. Sin embargo, aún no está bien descrito las moléculas que intervienen en la vía de señalización cascada abajo. Por otro lado, TIGIT posee un motivo

similar a ITT que puede ser responsable de la unión de GRB2, que media el reclutamiento de SHIP1 [98].

CD96 se expresa de forma constitutiva en células NK mientras que TIGIT aumenta su expresión en células NK activadas [99]. No hay evidencia hasta ahora del papel que desempeñan TIGIT y CD96 como moléculas inhibitorias, o si ambas median señales de inhibición por mecanismos de acción similares o diferentes. No obstante, está reportado que la unión de TIGIT a CD155 disminuye la citotoxicidad directa de las células NK, mientras que CD96 disminuye principalmente la secreción de IFN- $\gamma$  [100, 101]. Datos recientes han demostrado que el bloqueo de la interacción TIGIT mediante la ablación genética o el uso de anticuerpos monoclonales anti-TIGIT, conduce a una mayor inmunidad antitumoral mediada por células NK. Por consiguiente, se observa una mejoría en el control del crecimiento tumoral en un modelo murino de metástasis [102]. Por lo anterior, TIGIT y CD96 juegan un importante rol en la regulación de la actividad efectora de células NK al contrarrestar las señales activadoras de DNAM [90].

CD85j es un receptor de superficie de la superfamilia de Ig llamadas transcripciones similares a las Ig (ILT, del inglés Ig-Like Transcripts) o receptores similares a las inmunoglobulinas leucocitarias (LIR, del inglés Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors). CD85j se expresa en la superficie de las células B, plasmáticas, dendríticas, monocitos, subconjuntos de células NK y T. CD85j también es conocido como ILT2, LIR1 o LILRB1 y MIR7; contiene cuatro dominios Ig y motivos ITIM en su cola citoplasmática que proporcionan señales inhibitorias tras reclutar SHP-1. Los ligandos de CD85j incluyen una amplia gama de moléculas HLA-A, -B, algunas moléculas HLA-C y HLA-G, y la proteína UL18 del citomegalovirus humano [103, 104].

Dentro de toda variedad de receptores de inhibición que poseen las células NK, se encuentran los receptores tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIRs, del inglés killer-cell immunoglobulin-like receptors), que quizás sean los mejores descritos. Los receptores KIRs, contribuyen en gran medida a mantener el equilibrio inmunológico, debido que son los responsables de frenar la actividad citotóxica de las células NK, al reconocer “lo propio” en células sanas. Más aún, los KIRs son los receptores responsables de que durante el proceso denominado “missing-self”, las células NK en ausencia de las moléculas MHC-I puedan desencadenar su actividad citotóxica hacia las células blanco [49].

Además de participar con señales de inhibición, algunas moléculas de la familia KIR tienen actividades opuestas como los receptores KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 y KIR3DS1 y el receptor KIR2DL4 con función dual<sup>[105]</sup>.

De esta familia, son 8 los receptores con función de inhibición (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3). Los genes de la familia KIR son los genes más polimórficos que poseen las células NK. Hasta el 2020, se conocían más de 1110 alelos de esta familia<sup>[105]</sup>.

En general, los receptores KIRs con cola citoplasmática corta (S) contienen un motivo activador basado en tirosina (ITAM, del inglés immunoreceptor tyrosine-based activatory motif), mientras que los receptores KIRs con cola citoplasmática larga (L) contienen un motivo inhibidor basado en tirosina (ITIM, del inglés immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)<sup>[105]</sup>.

Los receptores KIR reconocen moléculas HLA clase I como ligandos (HLA-C y HLA-B). Cuando los receptores KIR de activación entrecruzan con sus respectivos ligandos, resulta en la fosforilación de los dominios ITAM contenidos en DAP12 de sus colas citoplasmáticas. La fosforilación de los sitios ITAM a su vez, resulta en el reclutamiento de Syk y ZAP70. En esta vía de señalización, también participan LAT, Shc, GRB2 y 3BP2. Syk interactúa con SLP76 y activa a Vav. Las vías de señalización ZAP70 y Syk dan lugar a que ERK y MAPK desencadenen la citotoxicidad de las células NK. Por otro lado, cuando los receptores KIR inhibitorios entrecruzan con moléculas HLA-I, las vías de activación son bloqueadas a través de la desfosforilación de Vav-1 por SHP-1 y SHP-2<sup>[105]</sup>.

## **SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS NK**

Las células NK humanas se dividen clásicamente en dos subconjuntos mayoritarios, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>hi</sup> y CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/lo</sup>, los cuales difieren en su estado de maduración y por ende en su capacidad funcional. El subconjunto CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>hi</sup> representan aproximadamente el 90% de la población total de células NK en sangre periférica, mientras que la población CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/lo</sup> representa solo el 10%. El subconjunto CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/lo</sup> posee mayor capacidad proliferativa y su función radica en la liberación de citocinas proinflamatorias tales como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , con lo que contribuye a regular la función de otras células inmunes. El subconjunto CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>hi</sup> posee una capacidad proliferativa considerablemente menor, pero cuenta con una maquinaria que le

proporciona llevar a cabo una actividad citolítica específica contra células blanco. Esta maquinaria depende de la liberación de gránulos citotóxicos precargados con perforina y granzima. Además, con la adquisición del receptor de baja afinidad por la fracción Fc de anticuerpos, CD16, las células NK adquieren un mecanismo adicional e independiente de la citotoxicidad natural, el cual depende del reconocimiento de células blanco previamente marcadas con anticuerpos. Este mecanismo se conoce como citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, del inglés Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)<sup>[43, 45]</sup>.

### MARCADORES DE MADURACIÓN

Dentro de la población total de células NK podemos encontrar estadios de maduración, cada uno con fenotipo y funciones específicas. Por ejemplo, la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> que proviene de la población CD56<sup>bright</sup>, se identifica por la densidad de expresión de CD56 y la expresión de CD16<sup>[106-109]</sup>. Durante el proceso de maduración, las células NK pierden los receptores de citotoxicidad natural (NCRs, del inglés Natural Cytotoxicity Receptors) en su superficie, mientras que a su vez, adquieren la expresión de CD16, receptores KIR, 2B4 y LIR-1<sup>[110]</sup>.

Por otro lado, Sandra Lopez y colaboradores reportan que CD57 define un subgrupo de células NK humanas maduras. Reportan que, el subgrupo de células NK CD56<sup>dim</sup> CD57<sup>+</sup> tiene capacidad proliferativa reducida pero no muestran incremento en la susceptibilidad a la muerte celular inducida por activación, lo que sugiere que es un subgrupo de células NK maduras, mas no exhaustas o senescentes cómo en el caso de células T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup><sup>[110-112]</sup>.

## **CÉLULAS NATURAL KILLER EN LA INMUNOVIGILANCIA CONTRA EL CÁNCER**

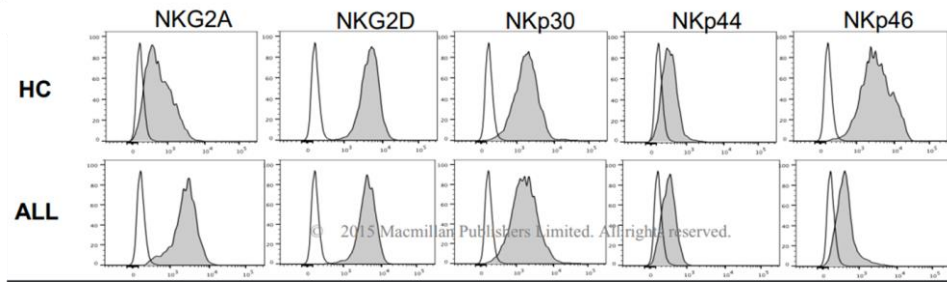
El sistema inmunológico se encuentra equipado con células capaces de reconocer y eliminar células malignas. Los linfocitos T y las células Natural Killer (NK, del inglés Natural Killer) juegan un rol importante en la defensa contra células cancerígenas. La capacidad efectora de las células NK está regulada por receptores activadores o inhibidores codificados en la línea germinal<sup>[43, 45]</sup>. En las últimas décadas, el papel de las células NK ha cobrado relevancia por su participación directa en la eliminación de células cancerosas. Por ejemplo, la evaluación de la frecuencia relativa, citotoxicidad, expresión

de receptores e infiltración en microambiente tumoral, son algunas de las características evaluadas en las células NK de pacientes con diversas malignidades <sup>[113]</sup>. Evidencia clínica sugiere que un mayor número de células NK infiltrantes en las biopsias de tumores sólidos se asocia con un mejor pronóstico en pacientes con cáncer <sup>[114]</sup>. Asimismo, también se ha demostrado en numerosos modelos *in vivo* el papel activo de las células NK en la protección y erradicación de neoplasias malignas hematopoyéticas <sup>[115]</sup>. Una evidencia clara del papel que juegan las células NK en la inmunovigilancia del cáncer está descrita en los trasplantes alogénicos haploidénticos de células progenitoras hematopoyéticas (HSCT, del inglés Haematopoietic Stem Cell Transplantation) utilizados en pacientes con leucemia, donde las células NK del donador desarrollan una función citotóxica antileucémica dirigida hacia las células malignas del hospedero. A pesar de que el trasplante de células progenitoras puede controlar la enfermedad de manera efectiva, este tipo de terapia se ha administrado solo en grupos limitados de pacientes debido al riesgo de toxicidad y de desarrollar enfermedad injerto contra huésped que pone en peligro la supervivencia del paciente <sup>[116]</sup>. En general, las terapias basadas en células NK ofrecen nuevas alternativas de terapias menos invasivas que las actuales. No obstante, aún falta mucha investigación básica por hacer para entender mejor la naturaleza de las células NK en los diferentes ambientes tumorales.

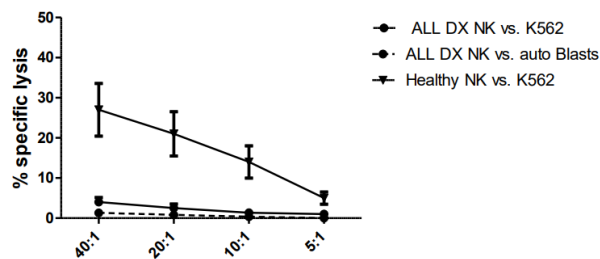
### **ANTECEDENTES DE CÉLULAS NK EN LEUCEMIAS**

Las células NK han demostrado ser cruciales en la inmunovigilancia contra el cáncer, tanto en tumores sólidos como hematopoyéticos. Específicamente en el contexto de las leucemias, existen precedentes acerca de un fenotipo inhibitorio de las células NK inducido por el microambiente leucémico, a través de TGF- $\beta$ 1. Por ejemplo, Rayne y colaboradores reportaron dicho fenotipo inhibitorio de células NK en pacientes pediátricos (en Texas) con LLA de linaje B al momento del diagnóstico, el cual consiste en la sobre expresión del receptor de inhibición NKG2A y una menor expresión del receptor de activación NKP46 (Figura 5). Dicho fenotipo inhibitorio correlacionó con la actividad citotóxica disminuida en pacientes pediátricos con B-ALL en comparación con controles pediátricos de la misma edad (Figura 6). Adicionalmente, Rayne y colaboradores, también mostraron la capacidad que tienen los blastos de pacientes con B-ALL de inducir dicho fenotipo inhibitorio en células NK sanas (Figura 7)<sup>[117]</sup>.

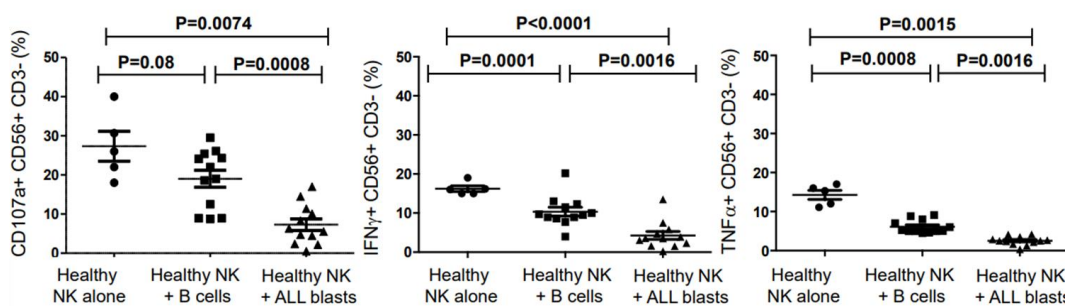




**Figura 5: Fenotipo inhibitorio en células NK de pacientes con LLA de linaje B vs controles pediátricos sanos (HC) pareados por edad.** Los histogramas representan el fenotipo de superficie de células NK en un paciente ALL representativo y control sano. Los histogramas sin sombra representan el control del isotipo y los histogramas sombreados representan tinción con los anticuerpos monoclonales específicos [117].



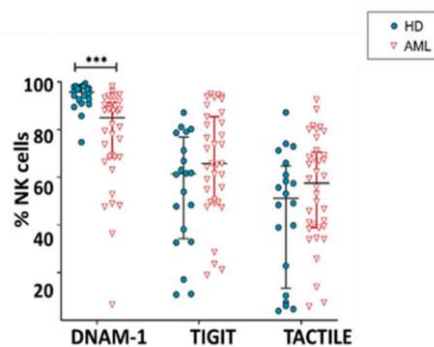
**Figura 6: Lisis específica.** Células blanco K562 (línea continua y círculo sólido) y blastos autólogos (línea punteada y círculo sólido) en co-cultivo con células NK de pacientes al DX, en comparación con células NK sanas contra K562 (triángulo invertido) (n = 5). Las barras de error indican el error estándar de la media [117].



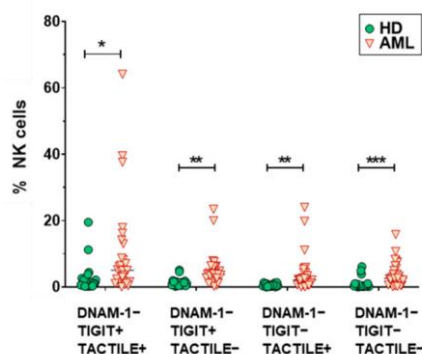
**Figura 7: Blastos de LLA suprimen las funciones efectoras de las células NK mediante la liberación de factores solubles, incluido el TGFβ1.** Medición de CD107a, IFN-γ y TNF-α de células NK de controles solas, células NK de controles co-cultivadas con células B sanas alogénicas, células NK co-cultivadas con blastos de LLA [117].

Estos datos sugieren que tanto NKP46 como NKG2A son receptores importantes en la regulación de la activación de células NK en el contexto leucémico.

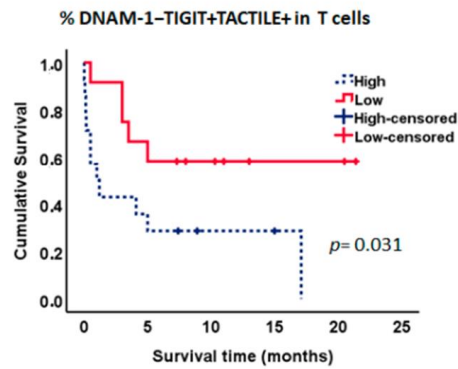
Por otro lado, el eje de receptores DNAM-TIGIT-CD96 han demostrado jugar un rol importante en el contexto de leucemia mieloide aguda, donde se ha reportado una clara disminución de la expresión de DNAM en células NK de pacientes adultos (Figura 8). Además, se ha encontrado que estos pacientes tienen un incremento de una subpoblación de células NK DNAM<sup>-</sup>TIGIT<sup>+</sup>TACTILE<sup>+</sup> (Figura 9). Los bajos porcentajes de esta subpoblación se asocia con una mejor sobrevida de los pacientes adultos con LMA (Figura 10)<sup>[118]</sup>.



**Figura 8: Expresión de DNAM, TIGIT y TACTILE en células NK de pacientes con LMA (n=36) y controles sanos (n=20).** Las líneas verticales indican rangos intercuartiles de las percentiles 25 a 75. Las líneas horizontales indican los valores de las medianas. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos a \* p=0.02 y \*\*\* p<0.0001<sup>[118]</sup>.



**Figura 9: Análisis de coexpresión de DNAM-TIGIT-CD96 en células NK en pacientes adultos con LMA y controles sanos.** Los valores de las medianas están indicados por la línea negra horizontal. \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001<sup>[118]</sup>.



**Figura 10: Análisis de sobrevida Kaplan-Meier en pacientes con LMA (n=26).**

Pacientes estratificados de acuerdo con la coexpresión de TIGIT y TACTILE en células NK DNAM<sup>-</sup>. La línea punteada azul corresponde a pacientes con porcentajes elevados de DNAM<sup>-</sup>TIGIT<sup>+</sup>TACTILE<sup>+</sup>. La línea roja corresponde a pacientes con bajos porcentajes de células DNAM<sup>-</sup>TIGIT<sup>+</sup>TACTILE<sup>+</sup> [118].

Los datos anteriores, proponen que el eje de DNAM-TIGIT-CD96 puede jugar un rol importante en las células NK en neoplasias malignas hematopoyéticas que no esté limitado a LMA.

En resumen, en las últimas décadas, la evaluación del papel pronóstico de las células NK, tanto en tumores sólidos como hematopoyéticos, ha cobrado relevancia. La evaluación de la frecuencia relativa, citotoxicidad, expresión de receptores e infiltración en microambiente tumoral, son algunas de las características evaluadas en las células NK de pacientes con diversas malignidades en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

## JUSTIFICACIÓN

La leucemia es el cáncer más frecuente en la población infantil a nivel mundial y México es uno de los países con mayor incidencia y mortalidad por leucemia en población infantil.

La principal defensa contra células malignas son los linfocitos T y las células NK. En las últimas décadas, se ha demostrado en numerosos modelos *in vivo*, el papel activo de las células NK en la protección y erradicación de neoplasias malignas hematopoyéticas. Una evidencia clara del papel que juegan las células NK en la inmunovigilancia del cáncer está descrita en los estudios de trasplantes alogénicos haploidenticos de células progenitoras hematopoyéticas utilizados en pacientes con cáncer, donde las células NK del donador desarrollan una función citotóxica antileucémica dirigida hacia las células malignas del huésped <sup>[114-116]</sup>. Esta función citotóxica de las células NK se define por un delicado balance entre las señales de activación e inhibición que recibe como resultado de la interacción con la célula blanco y su entorno. Sin embargo, se sabe que las células tumorales tienen diferentes mecanismos de evasión de la respuesta inmune influyendo en el fenotipo y afectando la capacidad citotóxica de las células NK. Por esa razón, la evaluación del papel pronóstico de las células NK, tanto en tumores sólidos como hematopoyéticos, ha cobrado relevancia en los últimos años. La evaluación de la frecuencia relativa, citotoxicidad, expresión de receptores e infiltración en microambiente tumoral, son algunas de las características evaluadas en las células NK de pacientes con diversas malignidades en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

En este estudio nos propusimos conocer la biología de las células NK, mediante la evaluación del fenotipo y capacidad citotóxica, en pacientes con LLA al momento del diagnóstico con la finalidad de identificar marcadores de tipo pronóstico.

## **HIPÓTESIS**

Las células NK de pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico presentan una disminución en la expresión de receptores de activación (NKG2D, NKG2C, NKP46, CD57, CD16, CD69 y DNAM), así como un aumento en la expresión de receptores de inhibición (NKG2A, TIGIT, CD85J y CD96) respecto a un grupo pediátrico control. La alteración en la expresión de receptores está asociada con la disminución en la actividad citotóxica de las células NK de los pacientes y con variables clínicas de tipo pronóstico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer el fenotipo y capacidad citotóxica de células NK de pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico así como su asociación con variables clínicas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Analizar la expresión de receptores de activación y de inhibición en células NK de pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico.
- 2.- Evaluar la función citotóxica de células NK de pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico.
- 3.- Evaluar asociación entre fenotipo y función con variables clínicas.

## METODOLOGÍA

### DISEÑO

Es un estudio de cohorte prospectivo analítico y multicéntrico, para realizar la caracterización inmunofenotípica y funcional de células NK en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda al momento del diagnóstico sin tratamiento quimioterapéutico.

### ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo se registró en la comisión nacional de la investigación científica y ética del IMSS y se obtuvo el número de registro: R-2016-785-042 a nombre del Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré miembro del comité tutor. Además, se presentó el protocolo de investigación y se aprobó por los comités de investigación y ética de los hospitales participantes. Se solicitó consentimiento a los padres de los menores y asentimiento informado en aquellos niños y niñas mayores a 18 años de edad de acuerdo con la declaración de Helsinki (Anexo 1 y Anexo 2).

### RECLUTAMIENTO DE MUESTRAS

El reclutamiento de muestras comenzó el 23 de noviembre del 2018 y finalizó el 13 de marzo del 2020 en hospitales pertenecientes a IMSS, ISSSTE y SS de la ciudad de México. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se enlista los hospitales participantes de obtención de muestra de pacientes y controles.

**Tabla 3: Centros hospitalarios participantes**

Hospitales de casos LLA	Hospitales de individuos controles
Hospital General de México, SS	Hospital General Regional Ignacio Zaragoza, ISSSTE
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE	Hospital General Dr. Gustavo Baz Prada, SS
Centro Médico Nacional Siglo XXI- Oncología, IMSS	Hospital General Las Américas, SS
Centro Médico Nacional Siglo XXI- Hematología, IMSS	Hospital General La Perla Nezahuacoyotl, SS
Hospital Pediátrico Moctezuma, SS	Hospital Pediátrico La Villa, SS
Hospital Juárez de México, SS	Hospital General de Zona 98, IMSS
Hospital Regional ISSSTE Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia, ISSSTE	Hospital General Regional Zona 72, IMSS
Hospital Regional Iero de Octubre, ISSSTE	

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social. ISSSTE: Sitio de Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. SS: Secretaría de Salud.

### CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS (PACIENTES):

#### Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 18 años, con diagnóstico de LLA.
- Que acepten participar en el estudio mediante consentimiento informado.
- Atendidos en los hospitales participantes.

#### Criterios de exclusión

- Genopatías que predispongan al desarrollo de Leucemia (Síndrome de Down, Anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom, etc.)
- Inmunodeficiencias congénitas o adquiridas.

#### Criterios de eliminación

- Pacientes cuya muestra sea insuficiente o no se haya podido obtener al momento del diagnóstico.
- Muestras procesadas en un intervalo de tiempo mayor a 48 horas.

### CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOS CONTROLES:

#### Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 18 años atendidos en hospitales de primero y segundo nivel, preferentemente de la misma institución (SS, IMSS, ISSSTE, GDF)
- Concurrentes  $\pm$  6 meses
- Que acepten participar en el estudio mediante consentimiento informado.

#### Criterios de exclusión

- Padecimientos genéticos
- Patología inmunoalérgica, cuadros infecciosos, enfermedades genéticas identificadas
- Enfermedades crónicas como cardiopatías, insuficiencia renal o diabetes.

#### Criterios de eliminación

- Muestra insuficiente
- Muestras procesadas en un intervalo de tiempo mayor a 48 horas.



## DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico de LLA fue establecido por hematólogos/oncólogos pediátricos de acuerdo con las características clínicas y los hallazgos del aspirado de médula ósea: morfología celular, inmunofenotipo y genética (las principales translocaciones en niños con LLA-B: ETV6-RUNX1; TCF3-PBX1; MLL-AFF1, BCR-ABL1), según la clasificación de neoplasias linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2008.

## SEGUIMIENTO DE MUESTRAS

Los pacientes tuvieron un seguimiento de hasta 4 años después del diagnóstico donde se monitoreó recaídas y defunciones.

## MUESTRAS

Se emplearon muestras de sangre periférica obtenidas en tubos vacutainer con EDTA y transportadas a temperatura ambiente desde la CDMX a Cuernavaca, Morelos, donde fueron procesadas en un periodo menor a 48 hrs a partir de la toma.

Las muestras de los pacientes con sospecha de LLA se obtuvieron junto con la muestra para hacer el diagnóstico clínico, por lo que el paciente no estaba en tratamiento quimioterapéutico y no se contaba con un diagnóstico confirmado, por lo que el análisis de las muestras biológicas se realizó en ciego.

## ANTICUERPOS

Para identificar la población de células NK se empleó el siguiente coctel de anticuerpos: anti-CD56 (clona: 5.1H11) acoplado al fluorocromo APC, anti-CD3 (clona: OKT3), anti-CD20 (clona: 2H7) y anti-CD14 (clona: 63D3) acoplados a FITC.

El análisis de caracterización fenotípica se realizó con cocteles, estandarizados en este proyecto, de los siguientes anticuerpos: anti-NKG2A (clona: REA110), anti-CD96 (clona: NK92.39) y anti-CD85j (clona: GHI/75) acoplados a PE; anti-NKG2C (clona: REA205) acoplado a PE/Vio 770; anti-NKG2D (clona: 1D11) y anti-TIGIT (clona: A15153G) acoplados a PerCP/Cy5.5; anti-NKP46 (clona: 9E2) y anti-CD57 (clona: HCD57) acoplados a Pacific Blue; anti-CD69 (clona: FN50) y anti-DNAM (clona: 11A8) acoplados a Brilliant Violet 510 y anti-CD16 (clona: 3G8) acoplados a APC/ Cy7.

En los ensayos funcionales se utilizó el mismo panel para la identificación de células NK que se describió líneas anteriores. Se utilizó anti-CD107a (clona: H4A3) acoplado a PE

para la detección de gránulos citotóxicos. En los ensayos de citotoxicidad dependiente de anticuerpo se utilizó el anticuerpo anti-CD16 Purified (cat: 302050) para incubar con la línea celular P815.

Todos los anticuerpos utilizados tanto en la fenotipificación como en los ensayos funcionales fueron de la marca Biolegend a excepción de anti-NKG2A y anti- NKG2C, cuya marca fue MILTENYI

### EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE SUPERFICIE

Para llevar a cabo la caracterización fenotípica se emplearon 3 diferentes paneles de anticuerpos previamente diseñados y estandarizados en este proyecto (Anexo 3) para la detección de las siguientes moléculas: NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKP46, CD69, TIGIT, CD96, DNAM, CD57, CD85j y CD16. Se utilizó 75uL de sangre total por panel, se incubaron con los anticuerpos previamente descritos por 30 minutos en frío y cubiertos de la luz. Posteriormente se lisaron los eritrocitos con buffer de lisis (BD Pharm lyse cat: 555899) incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1 X y, posteriormente, fijadas con PFA al 2% para su posterior adquisición. Las muestras fueron adquiridas en citómetro FACS Canto II y analizadas con los programas flowjo e Infinicyt.

### ENSAYOS FUNCIONALES

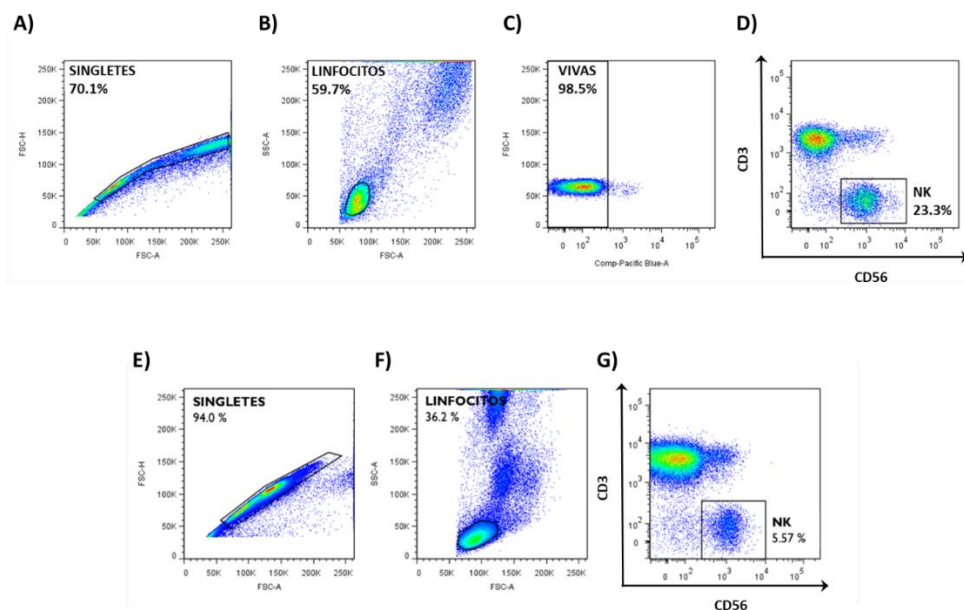
Inicialmente las células mononucleares se aislaron por gradiente de Ficoll Paque (PREMIUM) y se confirmó su viabilidad por conteo celular con azul tripano. Una vez aisladas las células mononucleares de sangre periférica estas se emplearon para evaluar dos mecanismos de la función efectoras: 1) citotoxicidad natural, utilizando como blanco la línea celular K562 y 2) citotoxicidad mediada por anticuerpo reversa a través de CD16, empleando como blanco la línea celular P815.

Los ensayos de degranulación se realizaron con PBMC's y se pusieron en co-cultivos independientes con las líneas celulares K562 y P815. Previo al ensayo, únicamente las células P815 se incubaron 30 min con anti-CD16 (2.5ug- $1 \times 10^6$  células) y fueron lavadas para su posterior uso. Para ambos ensayos se utilizaron  $2 \times 10^6$  células / mL y se incubaron en una concentración 1:1 (célula blanco: PBMC's) durante 3 horas a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> (STIK) con medio RPMI enriquecido con FBS al 10% en placas de 96 pozos fondo U.

Posterior a la incubación, las células fueron lavadas y teñidas con los anticuerpos respectivos para la identificación de células NK, colorante de viabilidad (LIVE/DEAD Fixable Violet Dead cell Stain Kit cat: L34955) y anti-CD107a. Las muestras fueron adquiridas en citómetro FACS Canto II y analizadas con los programas flowjo e Infinicyt.

### ANÁLISIS DE CITOMETRÍA

El protocolo de adquisición de eventos y análisis de citometría de flujo consistió en lo siguiente: 1) Inicialmente, se excluyeron agregados y células muertas graficando FSC-A (tamaño en área) versus FSC-H (tamaño en altura) partiendo del principio de que dobletes y células agregadas tienen un área o altura mayor a las células individuales (Figura 11 A y E). 2) Posteriormente, se identificó y seleccionó la población tipo linfocitaria mediante criterios de FSC (tamaño) y SSC (granularidad celular), como se observa en la Figura 11 B y F. 3) En el caso de los ensayos funcionales, se evaluó la viabilidad celular con ayuda del colorante LIVE/DEAD Fixable Violet Dead cell (Figura 11; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** C). 4) A continuación, se identificaron las células con fenotipo NK, de acuerdo con los marcadores  $CD56^+$ ,  $CD3^-$ ,  $CD14^-$ ,  $CD20^-$ , como se muestra en la Figura 11 D y G. 5) Con ayuda de los marcadores CD3, CD14, CD20 y colorante de viabilidad (en ensayos funcionales) se excluyeron del análisis poblaciones linfocitarias no deseadas como células T, células B, monocitos, y células muertas (Figura 11). Una vez ubicadas la población de células NK se procedió al análisis de fenotipificación y ensayos de funcionalidad.



**Figura 11: Estrategia de análisis de citometría.** A-D) Estrategia de análisis para ensayos funcionales. E-G) Estrategia de análisis para fenotipificación de receptores de superficie. El protocolo de adquisición de eventos y análisis de citometría de flujo consistió en: 1) La exclusión de agregados y células muertas graficando FSC-A (tamaño en área) versus FSC-H (tamaño en altura). 2) Posteriormente, se identificó y seleccionó la población tipo linfocitaria mediante criterios de FSC (tamaño) y SSC (granularidad celular). 3) En el caso de los ensayos funcionales, se evaluó la viabilidad celular con ayuda del colorante LIVE/DEAD Fixable Violet Dead cell. 4) A continuación, se identificaron las células con fenotipo NK, de acuerdo con los marcadores CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se evaluó la distribución con respecto a la normalidad para las variables cuantitativas utilizando la prueba de Shapiro-Wilk considerando un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo para rechazar la hipótesis nula de que la distribución de las variables era de tipo paramétrico. Tras evaluar dicha distribución en nuestras variables de estudio de tipo continuas, estas mostraron una distribución no paramétrica y por tanto los datos fueron analizados con la prueba estadística no paramétrica para valores independientes, U de Mann-Whitney con hipótesis de una cola. Se graficó y analizó con programa Graphpad prism 5.01. Las barras de las gráficas indican el promedio y la desviación estándar.

Se realizaron análisis bivariados y regresiones logísticas con variables categóricas utilizando la percentil 50 de los inmunoreceptores del grupo control como punto de corte para identificar una menor o mayor expresión de dichos marcadores (Anexo 4). La razón de momios se ajustó por variables confusoras como: edad, sexo, infecciones durante el primer año de vida y antecedente de alergias y los Intervalos de Confianza (IC) fueron del 95 %. Dichos análisis fueron realizados en el programa SPSS. Simbología de significancia estadística: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### ANÁLISIS BOOLEANO

Mediante análisis booleanos se evaluó la coexpresión de DNAM, NKG2D y 2B4; así como el eje de DNAM-TIGIT-CD96. Los pacientes se distribuyeron en dos categorías de acuerdo con el percentil 50 de los inmunoreceptores del grupo control como punto de

corte para identificar una menor o mayor expresión de dichos marcadores (Anexo 4). Los perfiles de fenotipos se analizaron con el paquete R versión 6.1.0. software.

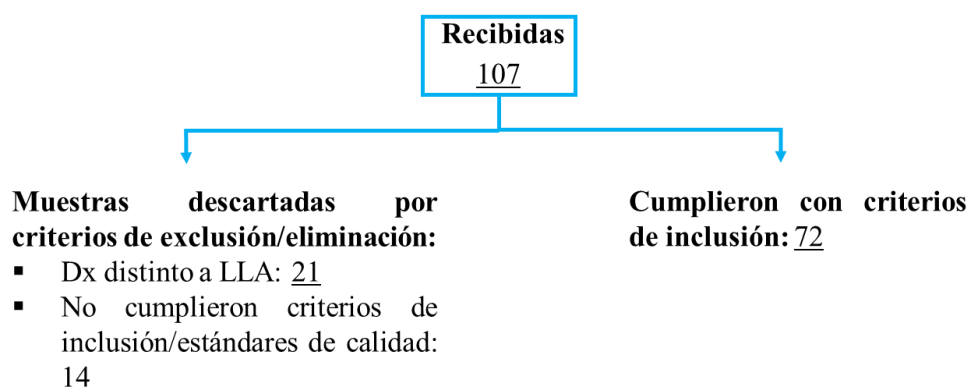
## **RESULTADOS**

### **DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN**

Originalmente se recibieron 107 muestras de posibles casos de LLA, las cuales se analizaron por igual sin tener un diagnóstico confirmado, por lo tanto, el análisis de las muestras biológicas se realizó en ciego. De las 107 muestras procesadas, se descartaron del análisis 21 pacientes que no pertenecieron al diagnóstico de LLA y 14 muestras que no cumplieron otros criterios de inclusión o estándares de calidad, dejando un total de 72 muestras de pacientes de LLA al momento del diagnóstico que cumplen con los criterios de inclusión (Figura 12). El grupo control se conformó por 21 individuos pediátricos pareados por edad con los pacientes.

Del grupo control, diez individuos fueron del sexo femenino (47.6%) y once de sexo masculino (52.4%), mientras que treinta y dos pacientes con LLA fueron del sexo femenino (44.4%) y cuarenta del sexo masculino (55.5%). El 61.90 % de los controles y 63.88 % de los pacientes presentaron infecciones durante primer año de vida, mientras que el 38.09 % de los controles y 16.66 % de los pacientes presentaron antecedentes de alergias. En la Tabla 4 se muestra que no hubo diferencias significativas entre la población de controles vs pacientes, salvo en antecedentes de alergias. Lo anterior puede explicarse con la hipótesis que algunos autores apoyan de que las alergias están asociadas como un factor protector ante la leucemia y por ende, una baja frecuencia de pacientes con LLA tienen historial alérgico<sup>[119]</sup>.

## Muestras de pacientes al momento del Dx



**Figura 12: Universo de muestras de pacientes procesadas.** Se recibió y procesó un total de 107 muestras de posibles casos de LLA, de las cuales se descartaron del análisis 21 pacientes que no pertenecieron al diagnóstico y 14 muestras que no cumplieron otros criterios de inclusión o estándares de calidad. Mientras que, 72 muestras de pacientes de LLA al momento del diagnóstico sí cumplieron con todos los criterios de inclusión.

**Tabla 4: Características generales de controles y pacientes**

Variables de estudio	Controles	LLA	P*
	n=21 n (%)	n=72 n (%)	
<b>Sexo</b>			
Femenino	10 (47.6)	32 (44.4)	0.80
Masculino	11 (52.4)	40 (55.6)	
<b>Grupos de edad (años)</b>			
< 1	1 (4.7)	1 (1.4)	0.61
1-9	11 (52.4)	42 (58.3)	
≥ 10	9 (42.9)	29 (40.3)	
<b>Infecciones en el primer año de vida</b>			
No	8 (38.1)	26 (36.1)	0.87
Si	13 (61.9)	46 (63.9)	
<b>Alergias</b>			
No	13 (61.9)	60 (83.3)	0.03
Si	8 (38.1)	12 (16.7)	

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; \*: Ji cuadrada o prueba exacta de Fisher cuando fue apropiada.

En este grupo de pacientes la leucemia que predominó fue Pre-B (97.2%), catorce tuvieron una cuenta leucocitaria por arriba de 50,000 (19.4%), y en cinco de ellos, solamente fue posible identificar la presencia de rearrreglos genéticos (6.9%). Siete pacientes

presentaron recaída durante el tratamiento (9.7%) y hasta el 2022 se registraron ocho decesos (11.1%) (Tabla 5).

**Tabla 5: Características clínicas de tipo pronóstico y desenlace de los pacientes.**

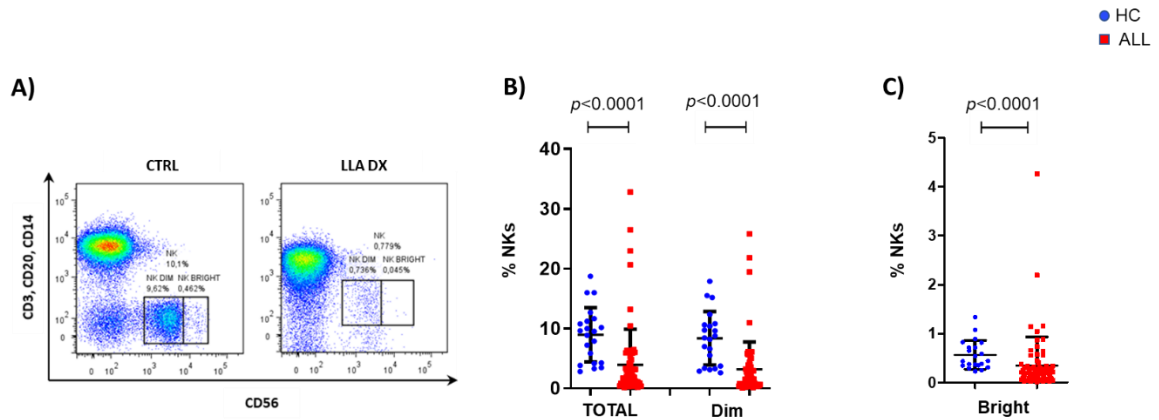
<i>n=72</i>	
ALL	
<i>N=72</i>	<i>n (%)</i>
Cuenta leucocitaria	
< 50,000	58 (80.55)
≥ 50,000	14 (19.44)
Rearreglo	
No Detectado	67 (93.05)
Detectado	5 (6.94)
Inmunofenotipo	
Pre-B	70 (97.22)
Células T	2 (2.78)
Recaída	
No	65 (90.27)
Sí	7 (9.72)
Defunción	
No	64 (88.88)
Sí	8 (11.11)

Con el objeto de conocer si existen asociaciones entre el fenotipo y función de células NK con distintas variables clínicas de la enfermedad, se realizaron regresiones logísticas entre controles y pacientes con razón de momios ajustada por variables confusoras (edad, sexo, infecciones durante el primer año de vida e historial alérgico), así como análisis bivariados entre pacientes con distintas características clínicas (edad mayor a 10 años, sexo masculino, infecciones durante el primer año de vida, historial alérgico, cuenta leucocitaria por arriba de 50,000, detección de rearreglo, inmunofenotipo de células T, recaída y defunción). En ambos casos se utilizaron intervalos de confianza (IC) del 95%.

## FENOTIPIFICACIÓN DE CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA

En la búsqueda de alteraciones fenotípicas se analizó el porcentaje de células NK totales de sangre periférica, así como las subpoblaciones de células NK CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup>. Del análisis del fenotipo se obtuvieron las frecuencias de expresión, así como de la intensidad media de fluorescencia de receptores de superficie de activación (NKG2D, NKG2C, NKP46, CD57, CD16, CD69 y DNAM), así como de inhibición (NKG2A, CD85j, TIGIT y CD96). Además, se analizó la distribución y fenotipo de células NK en 4 estadios de maduración de acuerdo con la expresión de NKG2A y CD57.

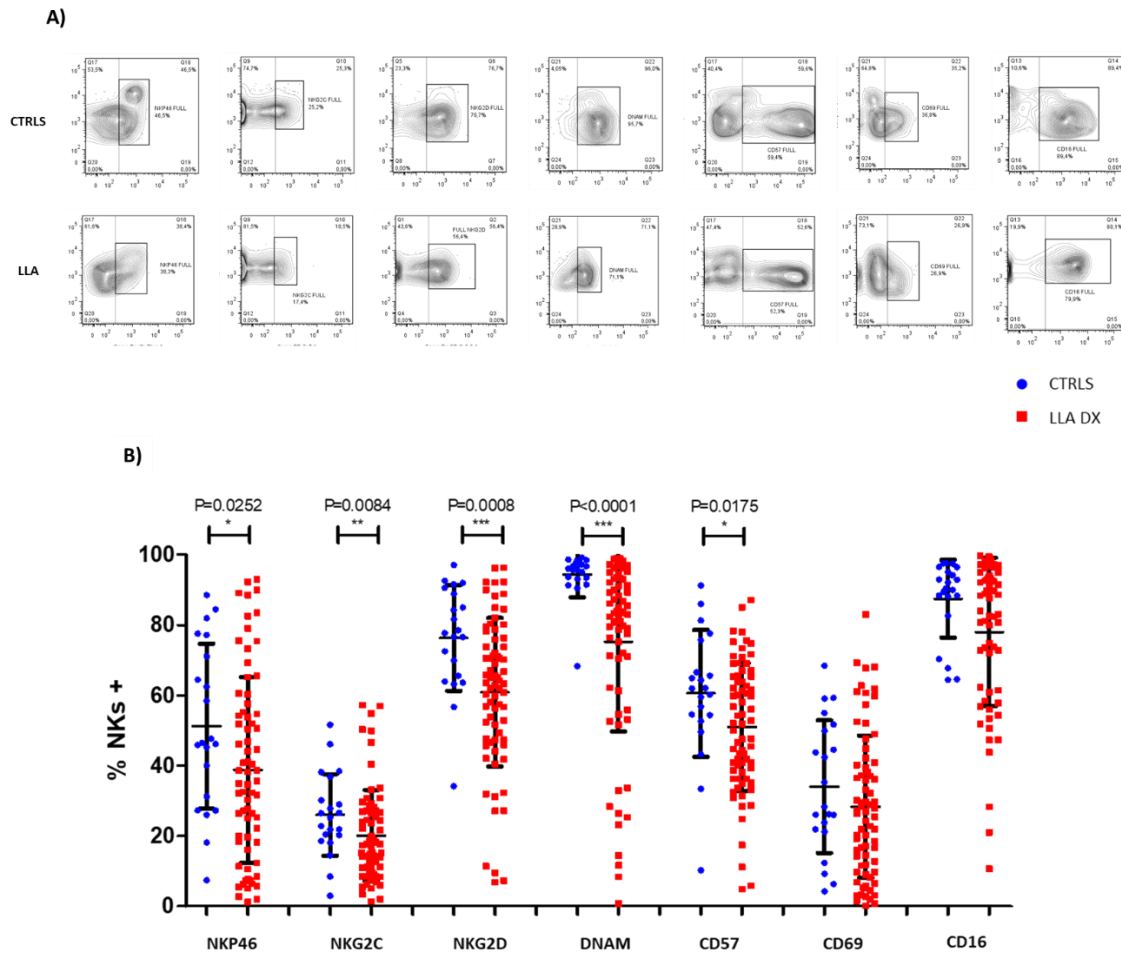
Los pacientes mostraron una menor frecuencia de células NK totales, así como en las subpoblaciones CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup> ( $p < 0.0001$ ) que el grupo control (Figura 13).



**Figura 13: Porcentaje de células NK totales, subpoblaciones  $CD56^{dim}$  y  $CD56^{bright}$  en sangre periférica de controles y pacientes pediátricos con LLA.** A) Imagen representativa de población total y subpoblaciones de células NK  $CD56^{dim}$  y  $CD56^{bright}$  en controles y pacientes. B) Porcentajes de población total de células NK y subpoblaciones  $CD56^{dim}$  y  $CD56^{bright}$  en controles (n=21) y pacientes (n=72).

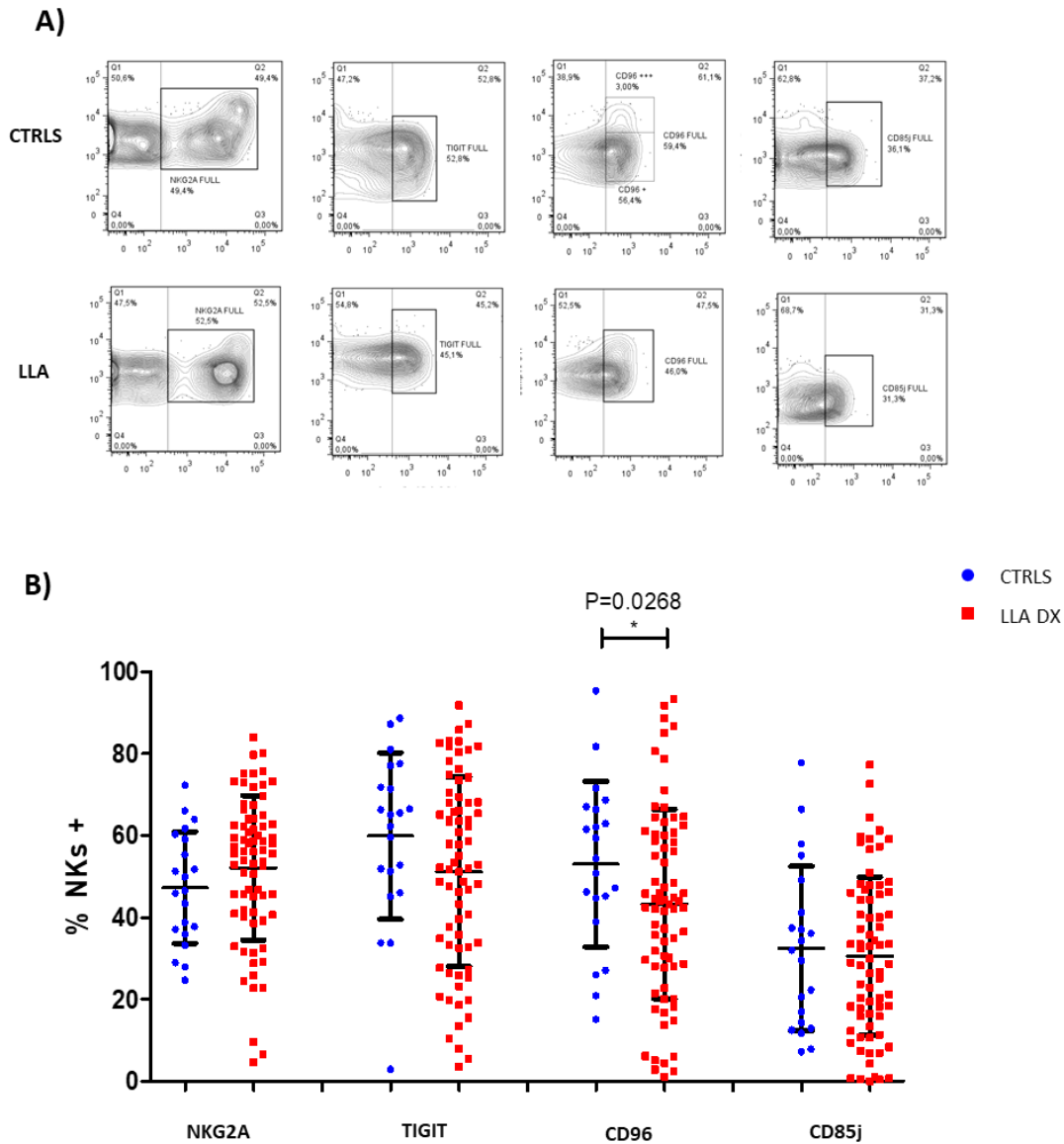
Una vez conocidas las frecuencias de células NK en sangre periférica, se evaluó el porcentaje de células NK que expresan receptores de activación. Nuestros resultados mostraron que los pacientes pediátricos con LLA, al momento del diagnóstico, cursan con una menor frecuencia de células NK que expresan diferentes receptores de activación en contraste del grupo control: NKP46 ( $p = 0.0252$ ), NKG2C ( $p = 0.0084$ ), NKG2D ( $p = 0.0008$ ), DNAM ( $p < 0.0001$ ) y CD57 ( $p = 0.0175$ ) (Figura 14).





**Figura 14: Evaluación del porcentaje de expresión de receptores de activación en población total de células NK de controles y pacientes pediátricos con LLA.** A) Imágenes representativas del porcentaje de expresión de receptores de activación en células NK de controles y pacientes. B) Porcentaje de células NK positivas para receptores de activación (NKP46, NKG2C, NKG2D, DNAM, CD57, CD69 y CD16) de controles (n=21) y pacientes (n=72).

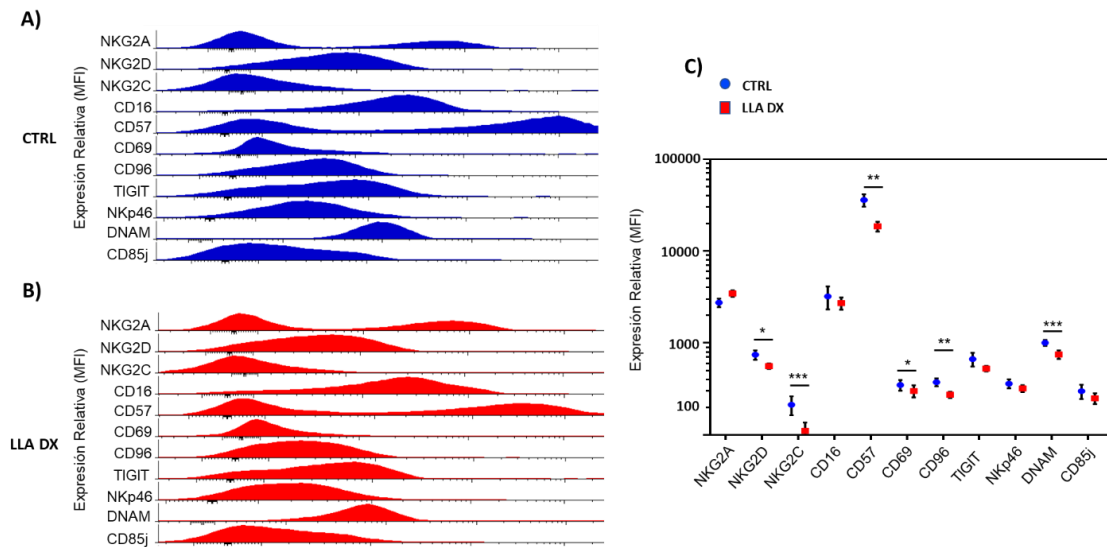
Adicionalmente evaluamos las frecuencias relativas de células NK que expresan distintos tipos de receptores de inhibición. Interesantemente, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias relativas de células NK positivas para receptores de inhibición entre pacientes y controles sanos. Sin embargo, encontramos una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de células NK totales CD96<sup>+</sup> ( $p = 0.0268$ ) (Figura 15). El receptor CD96 fue el único receptor de inhibición cuya proporción difirió entre controles y pacientes.



**Figura 15: Evaluación del porcentaje de expresión de receptores de inhibición en población total de células NK de controles y pacientes pediátricos con LLA. A)** Imágenes representativas de la expresión de receptores de inhibición en células NK de controles y pacientes. **B)** Porcentaje de células NK positivas para receptores de inhibición (NKG2A, TIGIT, CD96 y CD85j) de controles (n=21) y pacientes (n=72).

Dado que la actividad lítica de las células NK está regulada por un balance entre las señales de activación e inhibición, además del porcentaje de células que expresan los receptores, evaluamos sus niveles de expresión. Interesantemente, encontramos que las células NK de pacientes con LLA al momento del diagnóstico tienen menor expresión relativa (MIF) de los receptores de activación NKG2D ( $p=0.0170$ ), NKG2C ( $p=0.0040$ ), CD57 ( $p=0.0011$ ), CD69 ( $p=0.0127$ ) y DNAM ( $p=0.0005$ ). Por otro lado, también

encontramos una menor expresión relativa del receptor de inhibición CD96 ( $p= 0.0045$ ) (Figura 16 y Anexo 5).

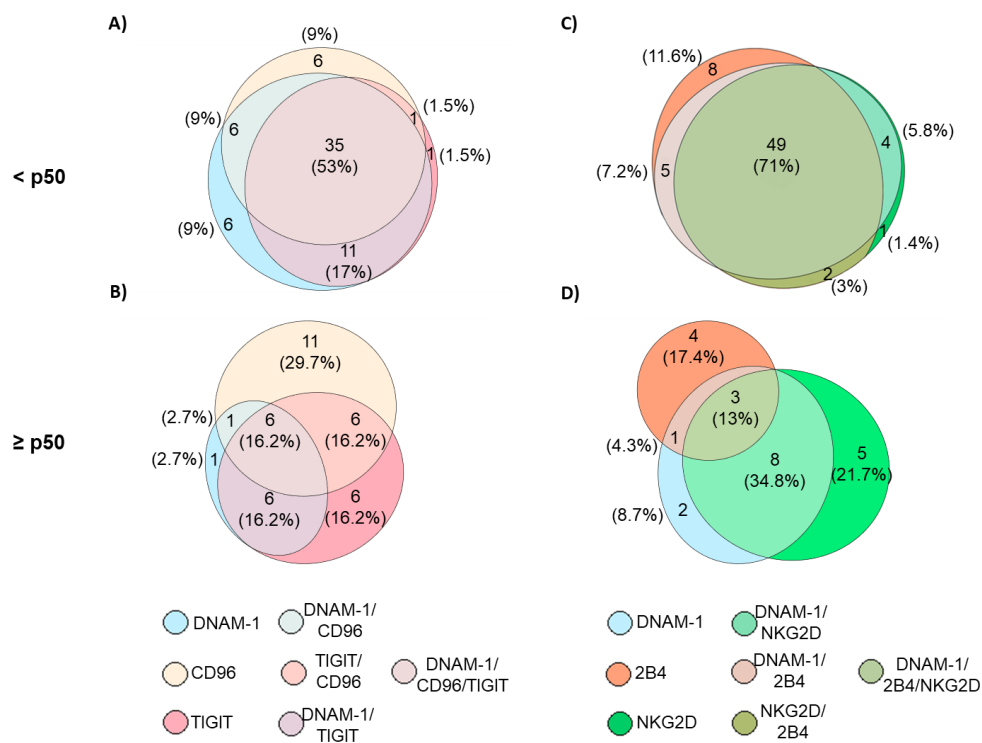


**Figura 16: Evaluación de la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de receptores en población total de células NK de controles y pacientes pediátricos con LLA.** A) Histogramas representativos de MFI de receptores de activación e inhibición evaluados en población total de células NK en controles (escala logarítmica). B) Histogramas representativos de MFI de receptores de activación e inhibición evaluados en población total de células NK en pacientes (escala logarítmica). C) Gráfica (en escala logarítmica) de MFI de receptores de activación e inhibición evaluados en población total de células NK en controles y pacientes. Prueba U de Mann-Whitney 1 cola. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## EVALUACIÓN DE COEXPRESIÓN DE MARCADORES

Teniendo en cuenta que se observó menor frecuencia de células que expresan varios receptores de activación en células NK en pacientes con LLA en comparación con los individuos controles, se analizaron los patrones de expresión concurrentes para tales receptores en las células NK de pacientes con LLA mediante un análisis booleano. Los pacientes se distribuyeron en dos categorías según el percentil 50 (Anexo 4). De acuerdo con este percentil, se encontró una menor frecuencia simultánea en la expresión concurrente para los receptores DNAM-1, TIGIT y CD96 en las células NK en el 53% ( $n= 35$ ) de los pacientes con LLA (Figura Figura 17 A), mientras que en el 16.2% ( $n=6$ ) de los pacientes con LLA, las frecuencias de células NK con expresión concurrente para DNAM-1, TIGIT y CD96 fueron normales (Figura 17 B). Además, se analizó la expresión concurrente para DNAM-1, 2B4 y NKG2D, encontramos que en el 71% ( $n= 49$ ) de los

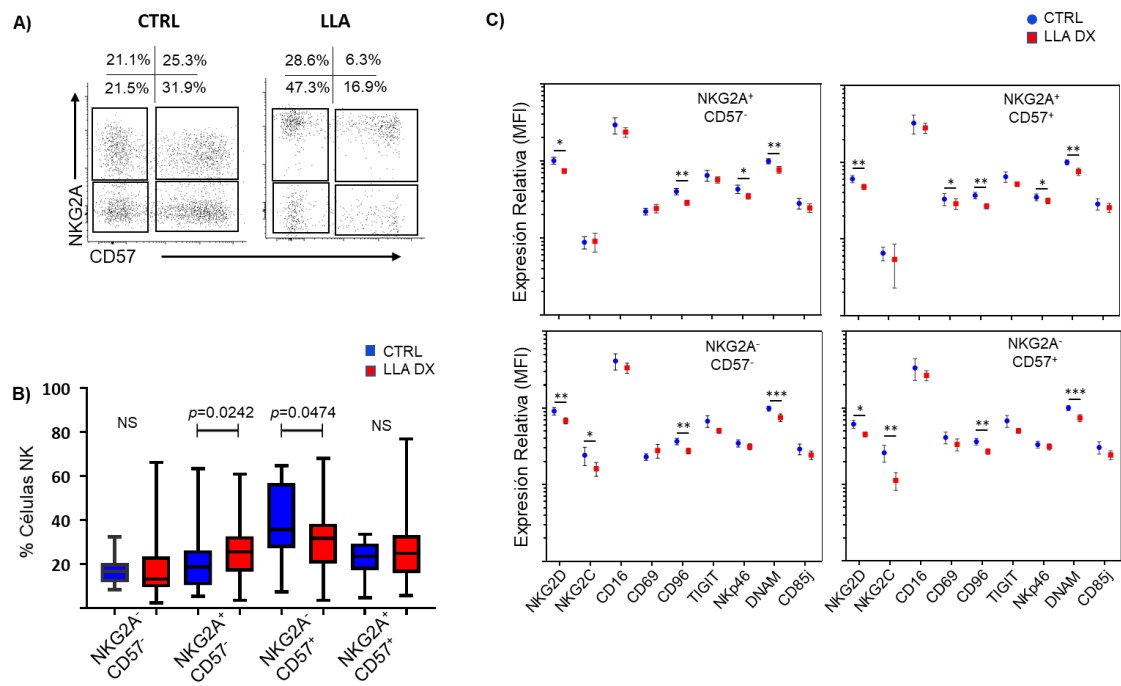
pacientes con LLA mostraron menor frecuencia de células NK con expresión concurrente para DNAM-1, 2B4 y NKG2D (Figura 17 C), mientras que solo el 13% (n= 3) de los pacientes con LLA presentaron una expresión simultánea normal para estos receptores de activación (Figura 17 D). Los datos anteriores sugieren que, el fenotipo dominante en términos de expresión concurrente es aquel en el que existen menores frecuencias de células NK positivas para distintas clases de receptores de activación.



**Figura 17: Evaluación de coexpresión de marcadores de superficie en células NK de pacientes con LLA.** A) Coexpresión de DNAM, TIGIT y CD96 en células NK de pacientes con expresión por debajo de p50. B) Coexpresión de DNAM, TIGIT y CD96 en células NK de pacientes con expresión por arriba de p50. C) Coexpresión de DNAM, 2B4 y NKG2D en células NK de pacientes con expresión por debajo de p50. D) Coexpresión de DNAM, 2B4 y NKG2D en células NK de pacientes con expresión por arriba de p50.

Se conoce que el ambiente leucémico puede afectar el correcto desarrollo y/o diferenciación de otros linajes celulares, por lo cual decidimos evaluar cuatro estadios de maduración con base en la expresión de NKG2A y CD57 en superficie. Interesantemente, nosotros encontramos que los pacientes con LLA muestran mayor proporción de la subpoblación de células NK que son NKG2A<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> ( $p=0.0242$ ), mientras que existe menor frecuencia de células NK que son NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> ( $P=0.0474$ ) (Figura 18A y B). Así mismo, dentro de estas subpoblaciones evaluamos la expresión relativa de receptores

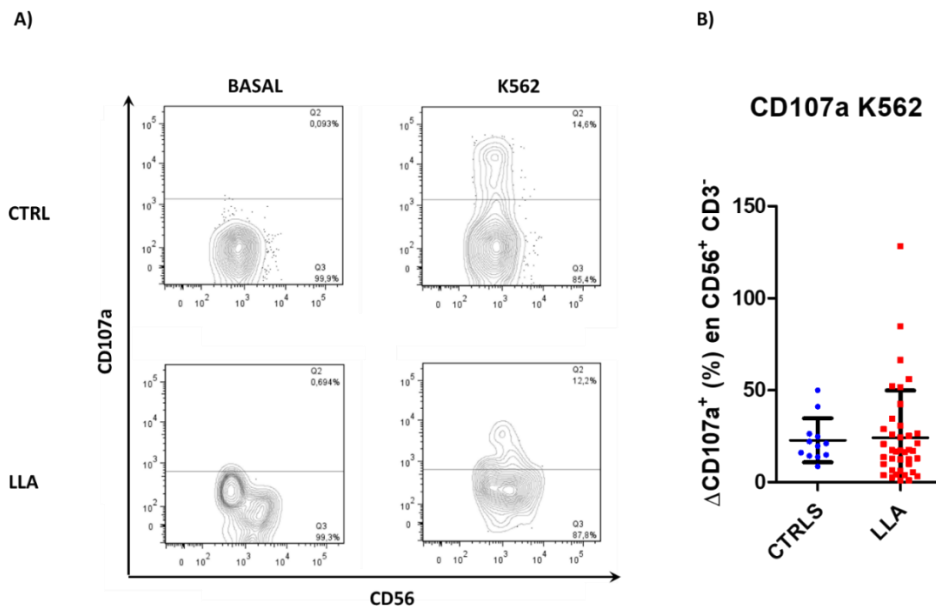
de activación e inhibición y encontramos consistencia en menor expresión para NKG2D, DNAM y CD96 en cada una de las cuatro subpoblaciones de células NK analizadas. Además, encontramos diferencias estadísticamente significativas en menor expresión de NKG2C en las subpoblaciones NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> y NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup>; y menor expresión de NKP46 en las subpoblaciones NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> y NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> (Figura 18 C). Ver también Anexo 6.



**Figura 18: Evaluación de subpoblaciones de células NK en estadios de maduración de acuerdo con los niveles de expresión de NKG2A y CD57, en controles y pacientes pediátricos con LLA.** A) Imagen representativa de la distribución de subpoblaciones de células NK en diferentes estadios de maduración en controles y pacientes. B) Gráfica de caja y bigote de la distribución de subpoblaciones de células NK en diferentes estadios de maduración en individuos controles y pacientes. C) Evaluación de MFI de receptores de activación e inhibición en subpoblaciones de células NK de controles y pacientes de acuerdo con el estadio de maduración. Prueba U de Mann-Whitney 1 cola. \*:p<0.05; \*\*: p <0.01; \*\*\*: p <0.001.

## EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD NATURAL DE CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA

La alteración en el fenotipo de células NK en pacientes con LLA sugiere alteraciones en su función citotóxica. Para probar esta hipótesis evaluamos la capacidad citotóxica de las células NK en 39 pacientes con LLA y en 12 individuos controles mediante ensayos de degranulación contra la línea celular K562, un tipo de célula sensible a la muerte por NK [117]. Los resultados mostraron menor capacidad efectora de las células NK de algunos pacientes con LLA, pero no en la mayoría de ellos, careciendo así, de significancia estadística (Figura 19).

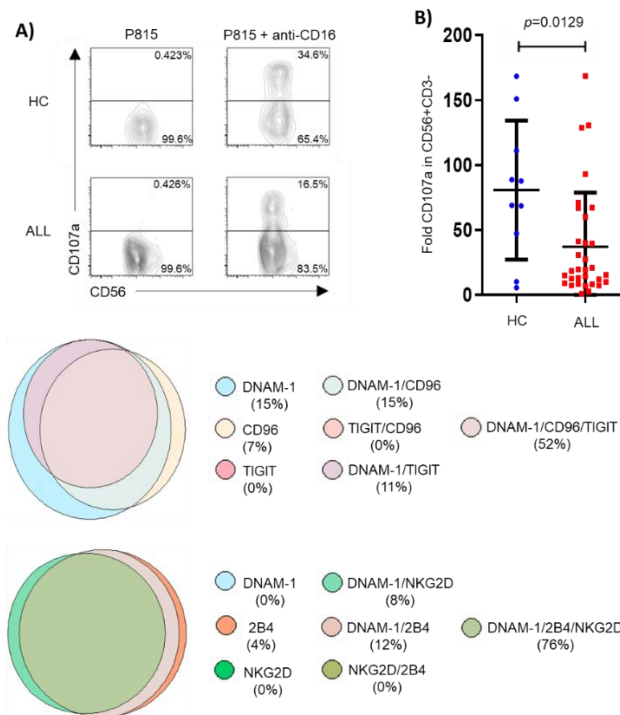


**Figura 19: Evaluación de citotoxicidad natural de células NK de controles y pacientes pediátricos con LLA contra células blanco K562.** A) Imagen representativa de ensayos de degranulación con K562. B)  $\Delta$ CD107a de ensayos de degranulación con células NK de controles (n=12) y pacientes (n=39). Prueba U de Mann-Whitney 1 cola. \*:p<0.05; \*\*: p <0.01; \*\*\*: p <0.001.

## DISMINUCIÓN CONCOMITANTE DE RECEPTORES DE ACTIVACIÓN EN PACIENTES CON ADCC-R DISMINUIDA

Adicionalmente evaluamos la citotoxicidad dependiente del receptor CD16. Estos ensayos se realizaron con las células NK de 32 pacientes con LLA y de 10 individuos controles mediante el reto contra la línea celular P815, recubierta o no con un anticuerpo anti-CD16 acoplado. Nuestros resultados mostraron que las células NK de pacientes pediátricos con LLA, tienen una desgranulación significativamente menor que los individuos controles ( $p = 0.0129$ ) en respuesta al entrecruzamiento de CD16 (Figura 20 A y B).

Una vez observados los patrones de coexpresión en células NK de pacientes con LLA, nos cuestionamos si existía un fenotipo característico en aquellos pacientes que presentaron una capacidad citotóxica disminuida de acuerdo con los ensayos de degranulación dependiente de anticuerpo. Por ello, analizamos los patrones de expresión concurrentes de receptores activadores en células NK de aquellos pacientes con una degranulación por debajo de la p50, mediante análisis booleano. Interesantemente, encontramos que más del 50 % de los pacientes con degranulación disminuida, mostraron una disminución simultánea en el porcentaje de células NK que expresan el eje de receptores DNAM-TIGIT-CD96 y DNAM-NKG2D-2B4 (Figura 20 C).



**Figura 20: Evaluación de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo redirigida y análisis booleano del fenotipo de células NK en pacientes con citotoxicidad disminuida.** A) Imagen representativa de ensayo de degranulación dependiente de

anticuerpo con células P815. B)  $\Delta$ CD107a en células NK de controles (n=10) y pacientes (n=32). C) Análisis booleano de la coexpresión de receptores de superficie en células NK de pacientes con degranulación por debajo de la p50. Prueba U de Mann-Whitney 1 cola. \*:p<0.05; \*\*: p <0.01; \*\*\*: p <0.001.

## **EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS NK Y SU**

### **ASOCIACIÓN CON LA LEUCEMIA.**

Se realizaron análisis de regresión logística para identificar asociaciones entre características de células NK (fenotipo, subpoblaciones y función) y la leucemia linfoblástica aguda ajustando la razón de momios con posibles variables confusoras como sexo, edad, infecciones durante el primer año de vida e historial alérgico

En los análisis de regresiones logísticas y análisis bivariados, las variables de frecuencia de células NK positivas para cada receptor, densidad de expresión de receptores (MIF), frecuencia de subpoblaciones y las unidades de medición de citotoxicidad en los ensayos funcionales ( $\Delta$ CD107), fueron categorizadas de acuerdo con el percentil 50 ( $\geq$  y  $<$ ) de los individuos controles. En el (Anexo 4) se encuentra la tabla con los valores de p50 para cada variable.

Encontramos que una mayor expresión de DNAM (MIF  $\geq$  937,4500) (OR =0.34; IC: 0.12-0.95) y CD57 (MIF  $\geq$  26387,0500) (OR =0.32; IC: 0.11-0.88) en células NK se asocia negativamente con LLA, aun cuando la razón de momios fue ajustada por variables confusoras. Lo que sugiere que los pacientes tienen una menor expresión de DNAM y CD57 en células NK que los controles. Interesantemente, la expresión de CD69 en células NK no había mostrado asociación con LLA (OR = 0.37; IC: 0.13-1.03), sino hasta que se ajustó la razón de momios con variables confusoras, encontrando que una elevada expresión de CD69 (MIF  $\geq$  295,3500) en células NK se asocia negativamente con LLA. Es decir, que las células NK de los pacientes tienen menor expresión de CD69 que los controles. También encontramos que un elevado porcentaje de células NK que expresan NKG2D ( $\geq$  77.7%) (OR = 0.26; IC: 0.09-0.72) y DNAM ( $\geq$  96%) (OR = 0.22; IC: 0.08-0.62) se asoció negativamente con LLA, aun cuando la razón de momios fue ajustada por variables confusoras. Lo que indica que los pacientes tienen menor porcentaje de células NK DNAM<sup>+</sup> y NKG2D<sup>+</sup> que los controles. Interesantemente, no se encontró algún tipo de asociación con el porcentaje de células NK NKG2C<sup>+</sup> (OR = 0.37; IC:0.14-1.01) y la



LLA, hasta que la razón de momios fue ajustada por edad, sexo y alergias (OR = 0.30; IC: 0.10-0.88). Encontrando que un elevado porcentaje de células NK NKG2C+ ( $\geq 25.20\%$ ) se asocia negativamente con LLA e identificando a las alergias como una variable relevante en el porcentaje de expresión de NKG2C. Por otro lado, también se encontró que un elevado porcentaje de población total de células NK ( $\geq 9.53$ ) (OR = 0.10; IC: 0.03-0.33), así como de subpoblaciones CD56<sup>dim</sup> ( $\geq 8.45$ ) (OR = 0.05; IC: 0.01-0.20) y CD56<sup>bright</sup> ( $\geq 0.43$ ) (OR = 0.27; IC: 0.09-0.75) se asocia negativamente con LLA, aun cuando la razón de momios se ajustó por variables confusoras. Por lo tanto, independientemente de la edad, sexo, infecciones o alergias, los pacientes con LLA muestran menor porcentaje tanto en la población total de células NK, como en las subpoblaciones CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup>. No obstante, no se encontró ningún tipo de asociación con el porcentaje de subpoblaciones de acuerdo con la expresión de NKG2A y CD57 con la LLA. Por otro lado, en cuanto a los ensayos funcionales, se encontró que una elevada R-ADCC ( $\Delta CD107 \geq 78.42$ ) se asocia negativamente con la LLA (OR = 0.14; IC: 0.03-0.72). Sin embargo, se identificó a las alergias como variable confusora de este tipo de ensayos mediados a través de CD16 ya que cuando la razón de momios fue ajustada con el historial alérgico, la asociación fue nula (OR = 0.24; IC: 0.04-1.63). Ver Tabla 6.

**Tabla 6: Análisis de regresión logística para la asociación entre características de células NK (como variable categórica) y leucemia linfoblástica aguda.**

Características de células NK	OR	Sexo y edad	Sexo, edad e infecciones	Sexo, edad y alergias
		aOR (95% IC)	aOR (95% IC)	aOR (95% IC)
<b>MIF de Inmunoreceptores <math>\geq</math>p50<sup>1</sup></b>				
NKG2D	0.47 (0.17-1.27)	0.42 (0.15-1.21)	0.43 (0.15-1.23)	0.51 (0.17-1.50)
NKG2A	1.65 (0.61-4.50)	1.64 (0.60-4.48)	1.60 (0.58-4.43)	1.82 (0.64-5.17)
NKG2C	0.54 (0.20-1.46)	0.53 (0.19-1.47)	0.52 (0.19-1.44)	0.45 (0.16-1.31)
NKP46	0.54 (0.20-1.46)	0.52 (0.19-1.44)	0.53 (0.19-1.45)	0.53 (0.19-1.50)
<b>CD69</b>	0.37 (0.13-1.03)	<b>0.32 (0.11-0.95)*</b>	<b>0.29 (0.10-0.90)*</b>	<b>0.27 (0.09-0.85)*</b>
TIGIT	0.50 (0.18-1.36)	0.46 (0.16-1.30)	0.46 (0.16-1.30)	0.54 (0.18-1.58)
CD96	0.40 (0.15-1.10)	0.38 (0.13-1.08)	0.38 (0.13-1.11)	0.42 (0.14-1.24)
<b>DNAM</b>	<b>0.34 (0.12-0.95)*</b>	<b>0.30 (0.10-0.89)*</b>	<b>0.29 (0.10-0.86)*</b>	<b>0.31 (0.10-0.94)*</b>
<b>CD57</b>	<b>0.32 (0.11-0.88)*</b>	<b>0.31 (0.11-0.88)*</b>	<b>0.32 (0.11-0.89)*</b>	<b>0.34 (0.12-0.99)*</b>
CD85j	0.54 (0.20-1.46)	0.48 (0.17-1.40)	0.49 (0.17-1.44)	0.41 (0.13-1.25)
CD16	0.80 (0.30-2.15)	0.80 (0.29-2.19)	0.81 (0.30-2.21)	0.99 (0.35-2.85)
<b>% Células NK positivas para Inmunoreceptores <math>\geq</math>p50<sup>2</sup></b>				
<b>NKG2D</b>	<b>0.26 (0.09-0.72)*</b>	<b>0.23 (0.08-0.67)**</b>	<b>0.23 (0.08-0.67)**</b>	<b>0.26 (0.09-0.81)*</b>
NKG2A	1.71 (0.64-4.57)	1.73 (0.64-4.66)	1.74 (0.64-4.70)	2.17 (0.76-6.22)
<b>NKG2C</b>	0.37 (0.14-1.01)	0.37 (0.13-1.00)	0.37 (0.13-1.01)	<b>0.30 (0.10-0.88)*</b>
NKP46	0.51 (0.19-1.37)	0.48 (0.17-1.34)	0.48 (0.17-1.33)	0.54 (0.19-1.55)
CD69	0.77 (0.29-2.04)	0.74 (0.27-2.05)	0.72 (0.26-2.03)	0.79 (0.28-2.24)
TIGIT	0.45 (0.17-1.22)	0.43 (0.16-1.18)	0.43 (0.16-1.19)	0.43 (0.15-1.22)
CD96	0.45 (0.17-1.22)	0.43 (0.16-1.18)	0.43 (0.16-1.18)	0.45 (0.16-1.27)
<b>DNAM</b>	<b>0.22 (0.08-0.62)**</b>	<b>0.18 (0.06-0.56)**</b>	<b>0.18 (0.06-0.56)**</b>	<b>0.22 (0.07-0.72)*</b>
CD57	0.43 (0.16-1.15)	0.43 (0.16-1.15)	0.43 (0.16-1.15)	0.45 (0.16-1.25)
CD85	0.86 (0.32-2.28)	0.82 (0.30-2.26)	0.82 (0.30-2.27)	0.77 (0.27-2.17)
CD16 <sup>1</sup>	0.61 (0.23-1.66)	0.61 (0.23-1.67)	0.61 (0.23-1.67)	0.73 (0.26-2.07)
<b>% Subpoblaciones <math>\geq</math>p50</b>				
<b>NK Dim<sup>2</sup></b>	<b>0.05 (0.01-0.20)***</b>	<b>0.05 (0.01-0.18)***</b>	<b>0.04 (0.01-0.16)***</b>	<b>0.04 (0.01-0.18)***</b>
<b>NK Bright<sup>2</sup></b>	<b>0.27 (0.09-0.75)*</b>	<b>0.25 (0.09-0.72)*</b>	<b>0.25 (0.09-0.72)*</b>	<b>0.28 (0.09-0.83)*</b>
<b>NK Total<sup>2</sup></b>	<b>0.10 (0.03-0.33)***</b>	<b>0.08 (0.02-0.29)***</b>	<b>0.07 (0.02-0.26)***</b>	<b>0.07 (0.02-0.29)***</b>
NKG2A- CD57 <sup>1</sup>	0.61 (0.23-1.66)	0.60 (0.22-1.64)	0.60 (0.22-1.65)	0.64 (0.23-1.80)
NKG2A+ CD57- <sup>1</sup>	1.54 (0.57-4.19)	1.53 (0.56-4.17)	1.56 (0.57-4.28)	1.49 (0.53-4.16)
NKG2A+ CD57+ <sup>1</sup>	1.03 (0.38-2.79)	1.03 (0.38-2.78)	1.03 (0.38-2.79)	1.13 (0.40-3.17)
NKG2A- CD57+ <sup>1</sup>	0.61 (0.23-1.66)	0.61 (0.22-1.67)	0.61 (0.22-1.68)	0.55 (0.19-1.57)

OR: odds ratio/ razón de momios; aOR: razón de momios ajustada; MIF: Intensidad Media de Fluorescencia; IC: intervalo de confianza;  $\geq$ p50: por arriba de la percentil 50; NK: células natural killer; <sup>1</sup> 62 pacientes y 21 controles; <sup>2</sup> 72 pacientes y 21 controles; <sup>3</sup> 39 pacientes y 12 controles; <sup>4</sup> 32 pacientes y 10 controles. p<0.05; \*\*: p <0.01; \*\*\*: p <0.001. Los valores en negritas representan resultados estadísticamente significativos.

Se realizaron análisis bivariados en pacientes con LLA al momento del diagnóstico, evaluando la asociación entre variables de fenotipo y función de células NK vs factores de riesgo de recaída y/ muerte, tales como edad mayor a 10 años; sexo masculino; infecciones durante el primer año de vida; historial alérgico; cuenta leucocitaria mayor a 50.000; identificación de rearreglo; inmunofenotipo de células T; así como recaída y defunción. Nosotros encontramos una asociación negativa, entre tener más de 10 años y el porcentaje de células NK que expresan CD69 (OR = 0.32; IC: 0.12-0.87). Lo que

significa que los pacientes mayores de 10 años tienen un menor porcentaje de células NK CD69<sup>+</sup> que los pacientes de 1 a 9 años. Por otro lado, también se encontró asociación positiva entre el porcentaje de células NK DNAM<sup>+</sup> y el historial alérgico. Es decir, los pacientes con antecedentes de alergias tienen mayor porcentaje de células NK DNAM<sup>+</sup> que los pacientes que no presentaron alergias (Tabla 7)

**Tabla 7: Análisis bivariado entre expresión de receptores y factores de riesgo en pacientes con leucemia linfoblástica aguda.**

Características de células NK	Edad >= 10 n=29 OR (IC 95%)	Sexo masculino n=40 OR (IC 95%)	Infecciones durante el primer año de vida n=46 OR (IC 95%)	Historial alérgico n=12 OR (IC 95%)	Cuenta leucocitaria >=50,000 n=14 OR (IC 95%)	Rearreglos n=5 OR (IC 95%)	Inmunofenotipo de células T n=2 OR (IC 95%)	Recaidas n=7 OR (IC 95%)	Muerte n=8 OR (IC 95%)
<b>MIFde Inmunoreceptores ≥p50</b>									
NKG2D	0.51 (0.16-1.58)	1.90 (0.64-5.69)	0.67 (0.22-2.04)	2.25 (0.57-8.87)	1.52 (0.42-5.53)	0.97 (0.08-11.41)	NC	1.33 (0.20-8.67)	0.36 (0.04-3.30)
NKG2A	0.87 (0.30-2.51)	1.13 (0.40-3.21)	1.33 (0.44-4.01)	0.79 (0.20-3.18)	0.47 (0.13-1.69)	1.10 (0.09-12.92)	0.54 (0.03-9.05)	0.81 (0.12-5.26)	0.24 (0.04-1.41)
NKG2C	1.83 (0.64-5.26)	1.33 (0.47-3.80)	1.59 (0.51-4.95)	0.37 (0.07-1.91)	0.28 (0.05-1.39)	0.84 (0.07-9.82)	NC	0.40 (0.04-3.79)	0.31 (0.03-2.83)
NKP46	1.03 (0.36-2.96)	0.76 (0.27-2.14)	1.14 (0.38-3.47)	1.89 (0.48-7.40)	0.28 (0.05-1.39)	0.84 (0.07-9.82)	1.73 (0.10-29.01)	0.40 (0.04-3.79)	0.31 (0.03-2.83)
CD69	0.72 (0.23-2.28)	1.83 (0.58-5.74)	3.15 (0.79-12.52)	0.56 (0.11-2.95)	0.18 (0.02-1.48)	NC	NC	1.71 (0.26-11.20)	1.25 (0.21-7.51)
TIGIT	0.46 (0.15-1.41)	2.95 (0.96-9.08)	1.03 (0.34-3.15)	1.26 (0.31-5.05)	0.30 (0.06-1.52)	3.90 (0.33-45.66)	NC	1.23 (0.19-8.00)	NC
CD96	1.68 (0.56-5.03)	2.93 (0.90-9.58)	0.74 (0.24-2.31)	0.96 (0.22-4.22)	0.39 (0.08-1.98)	1.14 (0.10-13.38)	2.33 (0.14-39.39)	NC	0.42 (0.05-3.88)
<b>DNAM</b>	<b>2.25 (0.72-7.01)</b>	<b>5.33 (1.34-21.15)*</b>	1.79 (0.50-6.42)	1.16 (0.26-5.13)	0.86 (0.20-3.64)	NC	NC	4.61 (0.70-30.44)	1.37 (0.23-8.25)
CD57	0.43 (0.12-1.55)	0.99 (0.31-3.11)	0.51 (0.16-1.64)	3.73 (0.91-15.22)	0.51 (0.10-2.65)	NC	3.00 (0.18-50.98)	0.70 (0.07-6.77)	1.50 (0.25-9.09)
<b>CD85j</b>	<b>2.45 (0.85-7.11)</b>	<b>3.31 (1.07-10.17)*</b>	0.83 (0.28-2.49)	0.37 (0.07-1.91)	1.27 (0.35-4.59)	NC	NC	2.77 (0.43-18.01)	0.83 (0.14-4.95)
CD16	0.94 (0.34-2.62)	0.53 (0.19-1.47)	0.83 (0.28-2.40)	1.89 (0.48-7.51)	1.78 (0.50-6.38)	NC	1.14 (0.07-19.13)	0.74 (0.11-4.77)	0.54 (0.09-3.17)
<b>% Células NK positivas para Inmunoreceptores ≥p50</b>									
NKG2D	0.38(0.11-1.34)	3.0 (0.86-10.44)	1.32 (0.040-4.33)	2.00 (0.51-7.77)	0.94 (0.23-3.90)	0.87 (0.09-8.35)	3.67(0.22-62.13)	0.56 (0.06-4.98)	NC
NKG2A	0.67 (0.25-1.79)	0.76 (0.28-2.03)	0.99 (0.36-2.73)	1.74 (0.42-7.10)	0.95 (0.28-3.21)	0.78 (0.12-5.03)	0.52 (0.03-8.71)	3.51 (0.40-30.95)	0.27 (0.06-1.25)
NKG2C	0.61 (0.21-1.76)	1.44 (0.51-4.08)	0.67 (0.23-1.89)	0.43 (0.09-2.16)	0.61 (0.15-2.44)	0.59 (0.06-5.59)	NC	0.37 (0.04-3.32)	0.31 (0.04-2.73)
NKP46	0.48 (0.18-1.34)	1.89 (0.70-5.10)	1.45 (0.52-4.02)	1.33 (0.37-4.70)	0.41 (0.10-1.65)	NC	1.80 (0.11-30.04)	0.68 (0.12-3.80)	0.56 (0.10-2.98)
<b>CD69</b>	<b>0.32 (0.12-0.87)*</b>	1.84 (0.71-4.75)	2.68 (0.97-7.39)	1.22 (0.35-4.23)	0.40 (0.11-1.42)	0.27 (0.03-2.58)	NC	0.44 (0.08-2.43)	0.68 (0.15-3.09)
TIGIT	0.77 (0.28-2.10)	2.00 (0.72-5.55)	0.70 (0.25-1.92)	1.00 (0.27-3.72)	0.27 (0.06-1.33)	0.48 (0.05-4.53)	2.04 (0.12-34.16)	0.78 (0.14-4.36)	0.25 (0.03-2.20)
CD96	1.67 (0.62-4.49)	1.53 (0.56-4.18)	0.91 (0.33-2.52)	1.00 (0.27-3.72)	0.76 (0.21-2.73)	1.36 (0.21-8.76)	NC	0.78 (0.14-4.36)	1.23 (0.27-5.64)
<b>DNAM</b>	0.31 (0.08-1.24)	2.33 (0.66-8.30)	1.02 (0.30-3.45)	<b>4.05 (1.05-15.59)*</b>	0.64 (0.13-3.25)	1.04 (0.11-10.09)	NC	NC	0.56 (0.06-4.97)
CD57	0.65 (0.23-1.83)	1.06 (0.39-2.87)	0.63 (0.23-1.74)	1.67 (0.47-5.96)	0.29 (0.06-1.44)	NC	NC	0.33 (0.04-2.88)	2.37 (0.54-10.47)
CD85	1.74 (0.68-4.49)	1.79 (0.70-4.58)	0.92 (0.35-2.40)	0.71 (0.20-2.50)	1.07 (0.33-3.44)	1.64 (0.26-10.46)	NC	7.45 (0.85-65.41)	1.89 (0.42-8.58)
CD16	0.86 (0.35-2.08)	0.83 (0.35-1.98)	1.39 (0.46-4.20)	1.60 (0.41-6.23)	0.42 (0.10-1.76)	NC	NC	NC	0.72 (0.12-4.25)

OR: odds ratio/ razón de momios; MIF: Intensidad Media de Fluorescencia; IC: intervalo de confianza; ≥p50: por arriba de la percentil 50; NK: células Natural Killer; <sup>1</sup> 62 pacientes y 21 controles; <sup>2</sup> 72 pacientes y 21 controles; <sup>3</sup> 39 pacientes y 12 controles; <sup>4</sup> 32 pacientes y 10 controles. \*p<0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001. Los valores en negritas representan resultados estadísticamente significativos. p<0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001. Los valores en negritas representan resultados estadísticamente significativos.

Continuación de Tabla 7

Características de células NK	Edad ≥ 10	Sexo masculino	Infecciones durante el primer año de vida	Historial alérgico	Cuenta leucocitaria ≥ 50,000	Rearreglo	Inmunofenotipo de células T	Recaída	Defunción
	n=29	n=40	n=46	n=12	n=14	n=5	n=2	n=7	n=8
	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
<b>% Subpoblaciones ≥p50</b>									
NK Dim <sup>2</sup>	1.43 (0.19-10.75)	2.51 (0.25-25.40)	NC	NC	1.41 (0.14-14.68)	NC	NC	NC	NC
NK Bright <sup>2</sup>	1.52 (0.47-4.91)	3.67 (0.93-14.52)	0.70 (0.21-2.30)	2.50 (0.63-9.93)	0.64 (0.13-3.25)	3.06 (0.46-20.33)	NC	0.67 (0.07-6.03)	0.56 (0.06-4.97)
NK Total <sup>2</sup>	0.68 (0.12-3.97)	4.43 (0.49-40.00)	NC	NC	0.81 (0.09-7.59)	3.10 (0.29-33.27)	NC	NC	NC
NKG2A- CD57 <sup>-1</sup>	0.82 (0.29-2.35)	0.97 (0.35-2.70)	0.75(0.26-2.21)	0.98 (0.25-3.92)	1.07 (0.30-3.85)	3.13 (0.27-36.52)	NC	0.99 (0.15-6.37)	1.54 (0.29-8.36)
NKG2A+ CD57 <sup>-1</sup>	1.30 (0.45-3.80)	0.75 (0.26-2.14)	0.63 (0.20-1.97)	0.53 (0.13-2.07)	1.23 (0.32-4.63)	1.19 (0.10-13.89)	0.58 (0.03-9.72)	0.87 (0.13-5.67)	0.26 (0.04-1.53)
NKG2A+CD57 <sup>+1</sup>	1.06 (0.38-2.96)	1.44 (0.52-3.94)	0.67 (0.23-1.96)	1.39 (0.35-5.50)	0.56 (0.16-2.01)	1.81 (0.15-21.02)	NC	1.35 (0.21-8.70)	0.40 (0.07-2.38)
NKG2A- CD57 <sup>+1</sup>	1.92 (0.68-5.46)	1.68 (0.59-4.77)	1.02 (0.34-3.02)	0.98 (0.25-3.92)	0.69 (0.18-2.60)	NC	1.50 (0.09-25.15)	2.39 (0.37-15.44)	9.00 (0.98-82.50)
<b>ΔCD107 de ensayos funcionales ≥p50</b>									
K562 <sup>3</sup>	1.78 (0.47-6.71)	1.53 (0.42-5.61)	2.31 (0.57-9.36)	1.54 (0.27-8.82)	0.40 (0.07-2.33)	0.44 (0.04-4.71)	NC	NC	NC
P815 <sup>4</sup>	2.19 (0.49-9.74)	0.37 (0.08-1.73)	2.25 (0.21-24.40)	2.78 (0.21-35.95)	1.00 (0.09-11.24)	NC	NC	NC	NC

OR: odds ratio/ razón de momios; MIF: Intensidad Media de Fluorescencia; IC: intervalo de confianza; ≥p50: por arriba de la percentil 50; NK: células Natural Killer; <sup>1</sup> 62 pacientes y 21 controles; <sup>2</sup> 72 pacientes y 21 controles; <sup>3</sup> 39 pacientes y 12 controles; <sup>4</sup> 32 pacientes y 10 controles. p<0.05; \*\*: p <0.01; \*\*\*: p <0.001. Los valores en negritas representan resultados estadísticamente significativos.

## DISCUSIÓN

Nuestro estudio muestra que los pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico tienen menores frecuencias y expresión relativa (MIF) de receptores de activación en células NK en comparación con el grupo control. En contraste, nuestro estudio no registró un aumento de la expresión de receptores de inhibición como se ha demostrado en otro tipo de cánceres, principalmente sólidos. Adicionalmente, el fenotipo dominante de pacientes fue aquel en el que existió una disminución simultánea en las frecuencias de células NK positivas para receptores de activación. Finalmente, también encontramos diversas asociaciones entre la expresión de receptores de activación y variables clínicas de la LLA, independientemente de la edad, sexo y de otras variables confusoras, como fueron las infecciones durante el primer año de vida e historial alérgico.

Es bien sabido que el microambiente tumoral a través de distintos mecanismos aún no esclarecidos en su totalidad, son capaces de inhibir las funciones efectoras de las células NK, lo cual favorece la evasión de células inmunes. Rayne H. y colaboradores demuestran, que los blastos de pacientes pediátricos con LLA de linaje B, inducen un fenotipo inhibitorio en células NK al disminuir la frecuencia y densidad de expresión de receptores de activación como NKP46, así como el incremento en la expresión de receptores de inhibición como NKG2A, ambos mediados por efectos de la secreción TGB- $\beta$ 1<sup>[117]</sup>. La evasión de la inmunovigilancia no solo se ha observado en neoplasias hematopoyéticas, sino también en tumores sólidos, como es el caso de cáncer de pulmón y colorrectal donde también reportan la disminución de NKG2D en células NK a través de TGF- $\beta$ 1<sup>[120]</sup>. De manera similar, nosotros hemos encontrado que las células NK de los pacientes pediátricos con LLA de linaje Pre-B al momento del diagnóstico, muestran menores frecuencias y expresión relativa de NKp46 respecto el grupo control. A diferencia de lo que reportan Rayne H. y colaboradores, nosotros encontramos una menor expresión de NKG2D (tanto en frecuencia como expresión relativa) y que además se asoció con el fenómeno de la LLA independientemente de la edad, sexo, infecciones o historial alérgico de controles y pacientes. Esta diferencia puede deberse, entre otros factores, a la población de pacientes estudiada, principalmente a las diferencias clínicas que hay entre estos dos grupos. Por ejemplo, Rayne H. y colaboradores analizaron pacientes de linaje- B, mientras que en nuestro estudio evaluamos pacientes de linaje Pre-B. Las diferencias en el linaje de la leucemia influye en el desenlace de la leucemia, por lo tanto es posible que también influye en las características fenotípicas de las células NK. Por otro lado, en nuestro estudio el 51.4 % de los pacientes se clasificaron con alto

riesgo de recaída, mientras que en el estudio de Rayne H. el 32 % se clasificó con este criterio. Es posible que al tener una mayor proporción de pacientes clasificados con alto riesgo de recaída se haya hecho evidente la disminución en NKG2D en nuestra cohorte de pacientes. Además, en nuestra cohorte analizamos 72 paciente mientras que en el estudio de Rayne la n es de 50 pacientes. Finalmente, a diferencia de la cohorte de Rayne, nuestra cohorte de pacientes se compuso exclusivamente de población mexicana, la cual presenta tasas de recaída mucho mayores a las reportadas para otras etnias <sup>[121]</sup>. En conjunto de estas diferencias clínicas, así como raciales añaden variabilidad en resultados entre estos dos grupos comparados.

NKG2C es un receptor de activación en células NK que reconoce moléculas de HLA-E en humanos. La expresión de NKG2C juega un papel importante en la adaptación de la célula NK a las infecciones virales. En humanos, el historial de infecciones por HCMV está asociado con un incremento en el porcentaje de células NK que expresan altos niveles de NKG2C <sup>[61]</sup>. En nuestro estudio, encontramos que los pacientes con LLA muestran una disminución tanto en el porcentaje de células NK que expresan NKG2C, así como en su expresión en superficie. En contraste, Line Petersen y colaboradores demuestran que en pacientes con leucemia linfoblástica crónica de células B HCMV+, existe un aumento en el porcentaje de células NK que expresan NKG2C. Lo anterior sugiere, que NKG2C juega un rol importante no solo en infecciones por HCMV, sino también en las leucemias. En contraste a estos estudios, nosotros no evaluamos seropositividad de HCMV, por lo que hará falta determinar si la disminución tanto en porcentaje como en la expresión de NKG2C en pacientes con LLA está relacionado al historial de infecciones por HCMV+ o algún otro patógeno. Adicionalmente, nosotros encontramos que la disminución en el porcentaje de células NK que expresan NKG2C, se asocia con el fenómeno de la LLA cuando se comparan pacientes con controles de la misma edad, sexo e historial alérgico (presencia o ausencia). Lo anterior sugiere que NKG2C podría también tener una función importante en las alergias. Sin embargo, el papel de estas células NK en alergias todavía no es muy claro. Cabe destacar que este es el primer estudio donde se evidencia una disminución en NKG2C en células NK en pacientes con LLA, por lo que hacen falta más estudios para entender a profundidad su participación.

DNAM-1 es un receptor de activación que se une al receptor de poliovirus (CD155) y la molécula de adhesión de nectina (CD112), las cuales están reguladas por el estrés celular <sup>[59]</sup>. Se ha reportado que CD155 y CD112 se expresan en una amplia gama tanto de

tumores sólidos como hematopoyéticos [73]. En pacientes con neuroblastoma, los niveles de expresión de CD155 y CD112 correlacionan con la susceptibilidad de las células tumorales a ser lisadas por células NK [74]. Sin embargo, los tumores han desarrollado mecanismos para disminuir la expresión de DNAM-1 en células NK y con ello evitar su lisis [75]. Además, DNAM-1 juega un rol crucial en la prevención de la formación espontánea de tumores, así como en el control del crecimiento tumoral [76, 77]. Diversos estudios han demostrado, que las células NK de pacientes adultos con leucemia mieloide aguda (LMA), muestran una disminución en la expresión de DNAM-1, comparado con individuos sanos [118, 122]. Además, se ha demostrado que los blastos leucémicos de LMA muestran alta expresión de CD155 y CD112. A su vez, experimentos *in vitro* han demostrado que la expresión de DNAM-1 en células NK de donadores sanos, disminuye después del contacto con blastos leucémicos que expresan sus ligandos, CD155 y CD112 [122]. En este estudio, demostramos que pacientes pediátricos con LLA muestran una disminución tanto en el porcentaje de células NK que expresan DNAM-1 como su densidad de expresión (MIF). Interesantemente, también encontramos que la disminución de DNAM-1 está asociada con el fenómeno de la leucemia independientemente de variables confusoras (regresiones logísticas ajustadas). Por otro lado, también encontramos asociación entre el porcentaje elevado de células NK DNAM+ y los pacientes con historial alérgico. Dado que hay estudios que sustentan a las alergias como factor protector de la leucemia, sería importante evaluar si frecuencias altas de células NK DNAM+ se asocia como factor protector de la leucemia como resultado de manifestaciones alérgicas. Todo lo anterior, sugiere que DNAM-1 y sus ligandos CD155 y CD112 juegan un rol importante no solo en la inmunovigilancia de tumores sólidos y hematopoyéticos, sino también en las alergias. El papel que juegan CD155 y CD112 en la LLA aún o ha sido estudiado, por lo que su entendimiento puede ser materia para entender las leucemias.

CD69 es una molécula de activación de leucocitos que se expresa después de la activación en todas las células derivadas de médula ósea [78] por lo que no se expresa en células NK en reposo. Interesantemente, en este trabajo encontramos que las células NK de pacientes con LLA muestran una disminución en la expresión de CD69 y dicha disminución se asocia con el fenómeno de la leucemia cuando comparamos pacientes y controles del mismo sexo y edad. Adicionalmente, nosotros encontramos una asociación entre un bajo porcentaje de células NK CD69+ y pacientes mayores de 10 años lo que significa, que



los pacientes mayores de 10 años tienen menor porcentaje de células NK CD69+ que aquellos pacientes de 1-9 años. Si consideramos que CD69 se expresa únicamente en células NK activadas y teniendo en cuenta que los pacientes mayores de 10 años son considerados con un alto riesgo de recaída, podemos pensar que los pacientes con LLA mayores de 10 años tienen menor proporción de células NK activadas identificadas con CD69+ y con ello contribuir a un mal pronóstico. No obstante, no se conoce mucho acerca del rol de CD69 en células NK en las leucemias por lo que precisa indagar a mayor profundidad el impacto de estos hallazgos.

Respecto a las moléculas inhibitorias de las células NK se ha reportado un incremento en diferentes ambientes tumorales. Por ejemplo, se ha reportado un incremento en la expresión de receptores inhibitorios como TIGIT y PD-1 en células linfoides de pacientes con varios tipos de cáncer, tanto sólidos como hematopoyéticos y a menudo son asociados con la disfunción de linfocitos. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en la expresión de TIGIT. Sin embargo, es posible que con la disminución de la expresión de DNAM-1 en las células NK de pacientes pediátricos con LLA, se favorezca una señalización inhibitoria, ya que TIGIT compite eficazmente con DNAM por la unión con su receptor en común que es CD155 <sup>[117, 123]</sup>. Por otro lado, CD96 también representa competencia por el entrecruzamiento con CD155 <sup>[123-125]</sup>. A diferencia de TIGIT, nosotros observamos que los pacientes con LLA muestran una disminución tanto en el porcentaje de células NK CD96+ como en los niveles de expresión de CD96 por célula (MIF), comparado con individuos controles. Hasta ahora, no hay evidencia de si TIGIT y CD96 median la inhibición a través del mismo o diferentes mecanismos. Sin embargo, se sabe que CD96 se expresa de forma constitutiva en células NK, mientras que TIGIT aumenta su expresión en células NK una vez que han sido activadas <sup>[99]</sup>. No obstante, está reportado que la unión de TIGIT a CD155 disminuye la citotoxicidad directa de las células NK, mientras que CD96 disminuye principalmente la secreción de IFN- $\gamma$ . Evidentemente, es necesario determinar la relevancia funcional del entrecruzamiento de CD96 con CD155. Por lo anterior, nuestros resultados sugieren que CD96 puede desempeñar un papel importante en el reconocimiento de blastos leucémicos y contribuir en el delicado equilibrio establecido entre el eje DNAM-1-TIGIT-CD96. Adicionalmente, no encontramos diferencias significativas en la expresión de CD85j en las células NK de pacientes con LLA. Sin embargo, es necesario evaluar la expresión de sus ligandos en los blastos de LLA. Los ligandos de CD85j incluyen una amplia gama de moléculas HLA-A, -B, algunas moléculas HLA-C y HLA-G, y la proteína UL18 del citomegalovirus humano. Existe evidencia de la expresión de HLA-G en cánceres no

hematopoyéticos, por lo cual resulta importante realizar más estudios para abordar el papel de CD85j en las células NK en neoplasias malignas hematológicas como la LLA.

Si bien, el análisis individual de la expresión de receptores, tanto de activación como de inhibición, nos ayuda a conocer el fenotipo de las células NK en el ambiente leucémico, no hay que dejar de lado que la actividad citotóxica de las células NK se rige por un fino equilibrio entre todas las señales que emanan los receptores de superficie. Dado lo anterior, fue indispensable realizar un análisis de coexpresión de receptores tales como el trinomio DNAM-TIGIT-CD96 y DNAM-NKG2D-2B4. Estudios previos revelan que, las células NK de pacientes adultos con leucemia mieloide aguda muestran un perfil de coexpresión predominante de DNAM-1- TIGIT+ CD96+, DNAM-1- TIGIT+ CD96-, DNAM-1- TIGIT- CD96+ y DNAM-1- TIGIT- CD96-, en comparación con individuos sanos<sup>[118]</sup>. Además, Isabel Valhondo y colaboradores, demostraron que pacientes con bajos porcentajes de células NK que coexpresan DNAM-1- TIGIT+ CD96+ presentan una mayor sobrevida que aquellos que muestran un porcentaje alto de células NK con dicho perfil de coexpresión. De manera similar, en el presente estudio hemos encontrado que el 53% de los pacientes que mostraron una disminución en la expresión de dichos marcadores, muestran una disminución simultánea en el porcentaje células NK DNAM-1-TIGIT-CD96 positivas. Del mismo modo, encontramos que el 71% de los pacientes mostraron una disminución simultánea de DNAM-1-2B4-NKG2D lo cual indica que la mayoría de los pacientes que muestran una afección en el porcentaje de células NK positivas para determinados marcadores, muestran el mismo comportamiento en otros receptores de activación de manera simultánea, lo que posiblemente tiene un impacto en la activación de la célula NK y en sus funciones de inmunovigilancia contra células tumorales.

En un individuo sano, las células NK representan en promedio, del 5 al 20% de las células linfoides en sangre periférica. Sin embargo, se sabe que en pacientes con LLA tanto la proporción como el número absoluto de células NK se ve disminuido <sup>[117]</sup>. Esta disminución en la proporción y números absolutos de células NK no es un evento aislado. En otras neoplasias hematopoyéticas también se ha reportado este fenómeno, como en leucemia mieloide crónica (LMC) <sup>[126]</sup> y leucemia mieloide aguda (LMA) <sup>[127]</sup>. Nuestros resultados concuerdan con lo ya antes reportado, en cuanto a la disminución en el porcentaje de células NK. Por otro lado, en humanos se han caracterizado subconjuntos mayoritarios de células NK de acuerdo con la densidad de CD56 en su superficie y la expresión de CD16, que correlaciona con el grado de maduración y capacidades efectoras

distintas. CD56<sup>bright</sup> define una subpoblación de células NK inmaduras con capacidad proliferativa y producción IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-12. Mientras que, CD56<sup>dim</sup> identifica células NK maduras con una mayor capacidad citotóxica y una elevada secreción de citocinas cuando sus receptores de activación se entrecruzan [68, 128]. Por lo anterior, decidimos evaluar subpoblaciones de células NK comenzando con los dos subconjuntos mayoritarios CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup>, y encontramos que ambos subconjuntos mayoritarios se encuentran disminuidos por igual en pacientes con LLA. Se sabe que la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> se diferencia a partir de CD56<sup>bright</sup> [106, 107, 109] y que, durante el proceso de maduración, las células NK van perdiendo la expresión de NKp46, NKG2D, NKp30 y NKG2A, mientras que a su vez, adquieren la expresión de CD16, receptores KIR, 2B4 y LIR-1 [110]. Se ha identificado a CD57 como un marcador que identifica un subgrupo de células NK humanas maduras con fenotipo CD56<sup>dim</sup> CD57<sup>+</sup> cuya capacidad proliferativa es reducida pero no muestran incremento en la susceptibilidad a la muerte celular inducida por activación, lo que sugiere que es un subgrupo de células NK maduras, mas no exhaustas o senescentes como en el caso de células T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> [110, 111, 129]. Por otro lado, es bien sabido que el ambiente leucémico puede afectar el correcto desarrollo de distintos linajes celulares hematopoyéticos comprometiendo su correcto funcionamiento. Por lo anterior, decidimos hacer un análisis más profundo de subpoblaciones de células NK de acuerdo con su maduración y evaluamos 4 subpoblaciones más específicas de acuerdo con la expresión de NKG2A y CD57. Nosotros encontramos que los pacientes con LLA muestran una disminución en el porcentaje de una subpoblación madura de células NK (NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>) y a su vez, un aumento en una subpoblación inmadura (NKG2A<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>). Lo anterior, sugiere que los blastos de LLA o el ambiente leucémico en general, pueden impactar en diferentes aspectos a la biología de la célula NK, incluyendo su diferenciación. Adicionalmente, dentro de estas subpoblaciones evaluamos la expresión relativa de receptores de activación e inhibición y encontramos consistencia en la disminución de la expresión de NKG2D, DNAM y CD96 en las cuatro subpoblaciones de células NK.

Las células NK distinguen a una célula sana de una célula transformada por el entrecruzamiento e integración dinámica de múltiples vías de señalización, y un balance entre las señales recibidas de su entorno define su actividad lítica. En este trabajo, se ha encontrado que la principal alteración en el fenotipo de células NK de pacientes con LLA, es la disminución en la expresión de receptores de activación y no un aumento de receptores de inhibición. Lo anterior, aunado a la evidente disminución en la proporción de células NK circulantes en sangre periférica nos lleva a cuestionar: ¿En qué medida, las

alteraciones en la expresión de diferentes receptores de activación, pueden obstaculizar la inmunovigilancia mediada por células NK y promover la progresión de la enfermedad?. NKP46 por ejemplo, se sabe que regula directamente la sinapsis inmunológica y favorece la polarización de los gránulos citotóxicos durante la sinapsis inmune<sup>[54]</sup>. Por lo tanto, una disminución en su expresión correlaciona y compromete en cierta medida con una actividad citotóxica baja <sup>[56]</sup>. Por todo lo anterior, decidimos evaluar dos tipos de citotoxicidad independientes entre sí que son: la citotoxicidad natural, dada por el balance entre señales de activación e inhibición; y la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, dada exclusivamente por el entrecruzamiento de CD16. En este trabajo encontramos que los pacientes con LLA muestran una disminución en la citotoxicidad natural cuando se retan contra la línea celular K562, aunque carece de significancia estadística, puede apreciarse una tendencia hacia una citotoxicidad disminuida como se ha reportado en pacientes pediátricos con LLA <sup>[117]</sup>. Adicionalmente, hemos encontrado que las células NK de los pacientes con LLA también muestran una R-ADCC disminuida cuando se retan contra la línea celular p815 (con CD16 acoplado) comparado con los controles, lo que sugiere que las células NK de los pacientes pueden estar afectadas en más de una vía de activación para su citotoxicidad. Naturalmente, es preciso realizar más estudios para entender la relación entre el fenotipo que hemos encontrado y la disminución en la capacidad efectora de las células NK en pacientes pediátricos con LLA.

#### LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las limitantes de este proyecto fue el tamaño de muestra del grupo control. Todas las muestras biológicas se reclutaron a partir del 23 de noviembre del 2018 y finalizó de manera inesperada el 13 de marzo del 2020 debido a la cuarentena por contingencia de la pandemia por COVID-19. El tamaño de muestra del grupo control, que fue inferior al de grupo de pacientes, dificulta suponer que los resultados son representativos de esta población. El enriquecimiento de muestras de individuos controles pudo haber fortalecido las significancias estadísticas encontradas, así como dar lugar nuevas diferencias significativas que por el tamaño de muestra no fue posible identificar.

Otra limitación de este estudio fue que en un inicio se planteó la evaluación de muestras de pacientes con LLA al diagnóstico y en las etapas de tratamiento de inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento. Dicha planeación también se vio afectada por la interrupción de muestras causada por la contingencia por COVID-19.

## CONCLUSIONES

- La principal alteración en el fenotipo de las células NK de pacientes pediátricos con LLA recae en la disminución de la expresión de receptores de activación (NKP46, NKG2C, NKG2D, DNAM, CD57 y CD69) y no en un aumento en la expresión de receptores de inhibición.
- La proporción de subpoblaciones de células NK, de acuerdo con la expresión de NKG2A y CD57, se encuentra alterada en pacientes pediátricos con LLA.
- Se encontró asociación entre un bajo porcentaje de células NK que expresan NKG2D, NKG2C, y DNAM con la leucemia.
- Se identificó que los pacientes mayores a 10 años poseen menor porcentaje de células NK CD69<sup>+</sup>, lo cual puede tener un impacto en la evolución de la leucemia.
- La mayoría de los pacientes que muestran disminución en la expresión de un receptor en células NK, muestran disminución simultánea de otros receptores de activación.
- Los pacientes con una degranulación por debajo de la p50, muestran una disminución concomitante en los receptores DNAM-TIGIT-CD96 y DNAM-NKG2D-2B4.

## **PERSPECTIVAS**

Aunque la disminución del porcentaje de células NK NKG2D+ puede contribuir a una deficiencia en la inmunovigilancia ante la presencia de células leucémicas, no hay que dejar de lado la importancia de evaluar la expresión de los ligandos de NKG2D, en blastos de pacientes pediátricos con LLA, cuya expresión se induce en momentos de genotoxicidad o estrés celular, tal como ocurre en las leucemias. Por lo anterior, estamos trabajando en el diseño de la identificación de blastos leucémicos para evaluar ligandos de NKG2D y DNAM en pacientes con LLA. A su vez, también estamos evaluando distintos ensayos funcionales para determinar el rol que juega CD155 en el eje DNAM-1-TIGIT-CD96.

## ANEXOS

### Anexo 1: Copia de formato de consentimiento informado.

	<p>INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL</p> <p>UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN</p> <p>Y POLÍTICAS DE SALUD</p> <p>COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD</p> <p><b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b> <b>(PARA LOS PADRES DE LOS NIÑOS)</b></p> <p>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN</p>
Nombre del estudio:	"Regulación epigenética de las funciones efectoras de las células NK en niños con leucemia linfoblástica aguda"
Patrocinador externo (si aplica):	
Lugar y fecha:	
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	<p>Le estamos invitando a participar en este estudio de investigación porque sabemos que su hijo(a) fue recientemente diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda. Al igual que a usted, se invitará a participar a otros padres de niños con esta enfermedad que son atendidos en ocho hospitales públicos de la Ciudad de México.</p> <p>La leucemia es el cáncer más común que afecta a los niños, y en la Ciudad de México se ha reportado que este cáncer es aún más común que en otras ciudades del mundo. Hasta el momento no se conocen las causas de esta enfermedad.</p> <p>El objetivo de la presente investigación es evaluar si los niños mexicanos con leucemia tienen alteraciones en el funcionamiento de las células llamadas asesinas naturales (Natural Killer, NK) que son las encargadas de eliminar células cancerígenas, lo cual podría estar relacionado con el origen de la leucemia y ayudaría a mejorar el conocimiento actual que se tiene de la enfermedad y en un futuro poder encontrar nuevos tratamientos.</p>
Procedimientos:	<p>Si usted autoriza que su hijo participe se realizará lo siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>Usted y su pareja responderán a un cuestionario que tiene una duración de una hora. El cuestionario incluye preguntas acerca de sus nombres completos, fecha de nacimiento, características de su vivienda, escolaridad, ocupación, ingreso económico y número de hijos, etc. También se le preguntarán datos de enfermedades recientes y pasadas de su niño (a) como peso al nacimiento, vacunas, infecciones, y hospitalización por infecciones. Le comentamos además que usted es libre de decidir si responde a las preguntas que le realicemos.</li><li>En segundo lugar, tomaremos 5 ml extra de la sangre (que equivalen a una cucharadita) que a su hijo(a) le es tomada como parte de los exámenes de laboratorio que de rutina se le realizarán durante las diferentes fases del tratamiento y que forman parte de los estudios que indica su médico.</li><li>En caso de que usted autorice que la muestra de su hijo(a) sea guardada para estudios futuros, dichas muestras se almacenarán durante al menos 5 años en el Laboratorio</li></ol>

de Biología Molecular de las Leucemias del Servicio de Hematología Pediátrica, del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Dichas muestras podrían ser utilizadas para estudios futuros sobre genética de la leucemia.

Posibles riesgos y molestias:	Las molestias de la toma de sangre serán mínimas y éstas consistirán en dolor y rara vez sangrado y podría formarse un pequeño moretón en la zona de la toma de muestra.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Usted(es) no obtendrá(n) un beneficio directo al participar en este estudio. Los resultados del presente estudio podrían contribuir a que se conozca más acerca de la enfermedad. Además, usted ni su hijo recibirán un pago por participar en esta investigación.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Los resultados se les darán a los médicos tratantes de su hijo para que ellos tomen las medidas necesarias de acuerdo con su juicio clínico en beneficio de su paciente. Ustedes podrán contactar a los investigadores principales cuyos datos se encuentran al final de esta carta de consentimiento informado en cualquier momento, si usted (es) quisieran conocer más información acerca de la investigación que ellos llevan a cabo.
Participación o retiro:	Queremos hacer de su conocimiento, el compromiso que tenemos de dar respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación. Su participación en este estudio es completamente voluntaria y sin costo. Si usted decide que su hijo(a) no participe en este estudio, de cualquier manera, su hijo(a) recibirá la atención médica que suele recibir en esta Institución Hospitalaria. Esto es, no afectará su relación con este hospital y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios a los que tiene derecho. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento, es decir puede solicitar que se destruya y no se analice la muestra de su hijo(a), y puede también solicitar que los datos de la entrevista no se utilicen en la investigación. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como paciente de esta Institución, solo tendría que ponerse en contacto con los investigadores principales a los teléfonos o en la dirección que aparecen al final de este documento.
Privacidad y confidencialidad:	Cabe mencionar que no revelaremos por ningún motivo los resultados de las pruebas genéticas ni de los datos de la entrevista a ninguno de sus parientes ni a ninguna otra persona.
En caso de colección de material biológico (si aplica):	
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros.
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):	_____
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	Si usted(es) tiene(n) dudas, preguntas o quieren tener contacto con los investigadores principales del presente estudio, ustedes podrán comunicarse con el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré, que es el investigador responsable del estudio al teléfono: 5556276900 ext 21963, quien se encuentra en el 4º. piso de la Torre de la Academia Nacional de Medicina, Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, ubicada en Avenida Cuauhtémoc 330, 06720. Ciudad de México, México.
Colaboradores:	_____

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4º piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de ambos padres o tutores o representante legal

Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810-009-013



## Anexo 2: Copia de carta asentimiento informado.

### Carta de Asentimiento Informado (para niños mayores de 8 años)

**Nombre del Estudio: “Regulación epigenética de las funciones efectoras de las células NK en niños con leucemia linfoblástica aguda”.**

Hola, mi nombre es \_\_\_\_\_  
(*nombre de quien solicita el asentimiento*). Quiero invitarte a participar en una investigación en donde buscamos estudiar los genes en tu sangre. Los genes son lo que heredamos de nuestros abuelos y de nuestros padres y que nos hace diferentes a otras personas, son los que tienen que ver además, con nuestro color de ojos, cabello, entre otras cosas. Estos genes están en nuestra sangre, y en todo nuestro cuerpo.



Si tú quieres puedes estar en nuestro estudio, el cual se trata de tomarte un poco de tu sangre, lo cual será rápido y de la forma como se muestra en los siguientes dibujos:



Paso 1



Paso 2



Paso 3

Después de tomar un poco de tu sangre nosotros revisaremos en un laboratorio tu sangre. De esta forma tú ayudarás a que se conozca más acerca de la leucemia. Debo decirte que solamente a tu doctor se le dará el resultado del estudio de tu sangre.

Tu(s) papás (papá/mamá) saben que te estamos invitando a que seas parte de este estudio y a ellos también se les preguntará si nos dejarían tomarte sangre en el momento que te pongan suero o te tomen una muestra de laboratorio. Si ellos dicen que SI, y tú también dices que SI, entonces te tomaremos un poco de tu sangre como te mostramos en los dibujos.

Si tú no deseas participar en el estudio no se te tomará muestra de sangre, pero se te seguirá atendiendo por tu enfermedad y nadie se enojará contigo. En caso de que primero si quieras y después ya no quieras participar en el estudio también te respetaremos.

\_\_\_\_\_  
Nombre del niño

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Fecha

### Anexo 3: Paneles de caracterización fenotípica en células NK

Tubo #	Anticuerpo	Clona	Marca	Cantidad de anticuerpo
1	anti-NKG2D acoplado a PerCP / Cy5.5-	1D11	Biolegend	200ng
	anti-NKG2A acoplado a PE	REA110	Miltenyi	*2uL
	anti-NKG2C acoplado a PE / Vio 770	REA205	Miltenyi	*2uL
	anti-CD57 acoplado a Pacific Blue	HCD57	Biolegend	500ng
	anti-CD69 acoplado a Brilliant Violet 510	FN50	Biolegend	100ng
	anti-CD16 acoplado a APC / Cy7	3G8	Biolegend	200ng
2	anti-TIGIT acoplado a PerCP / Cy5.5	A15153G	Biolegend	200ng
	anti-CD96 acoplado a PE	NK92.39	Biolegend	600ng
	anti-DNAM acoplado a Brilliant Violet 510	11A8	Biolegend	200ng
	anti-NKP46 acoplado a Pacific Blue	9E2	Biolegend	500ng
3	anti-CRACC acoplado a PerCP / Cy5.5	162.1	Biolegend	400ng
	anti-2B4 acoplado a Pacific Blue	C1.7	Biolegend	1200ng
	anti-NTB-A acoplado a PE / Vio 770	REA339	Miltenyi	*2uL
	anti-CD85j acoplado a PE	GHI/75	Biolegend	600ng

\*Concentración de anticuerpo no especificada por el fabricante, se utilizó la cantidad de anticuerpo recomendada en el inserto. La cantidad de anticuerpo señalada fue por muestra de 75uL de sangre total.

### Anexo 4: Valor de percentil 50 de receptores de células NK en controles

Características de células NK	p50
<b>MIF de Inmunoreceptores</b>	
NKG2D	639,5300
NKG2A	2417,3800
NKG2C	131,1600
NKP46	340,5500
CD69	295,3500
TIGIT	551,4200
CD96	331,1600
DNAM	937,4500
CD57	26387,0500
CD85j	234,8300
CD16	1839,6100
<b>% Células NK positivas para inmunoreceptores</b>	
NKG2D	77.7000
NKG2A	46.50000
NKG2C	25.20000
NKP46	46.50000
CD69	28.30000
TIGIT	65.00000
CD96	54.40000
DNAM	96.00000
CD57	62.00000
CD85	32.00000
CD16	90.40000
<b>% Subpoblaciones</b>	
NK Dim %	8.4533
NK Bright %	0.4397
NK Total %	9.5367
NKG2A- CD57-	16,8300
NKG2A+ CD57-	18,8900
NKG2A+ CD57+	23,5500
NKG2A- CD57+	35,7400
<b>ΔCD107 de ensayos funcionales</b>	
K562 <sup>1</sup>	20.41045
P815 <sup>2</sup>	78.42979

Controles evaluados= 21; 112 individuos controles; 2 10 individuos controles;

**Anexo 5: Tabla con valores  $p$  de expresión relativa (MIF) de receptores, evaluados en población total de células NK en pacientes con LLA y controles, obtenidos de la prueba Mann-Whitney.**

INMUNORECEPTOR	VALOR P
NKG2A	NS
NKG2D	0.0170 *
NKG2C	0.0040 ***
CD16	NS
CD57	0.0011 **
CD69	0.0127 *
CD96	0.0045 **
TIGIT	NS
NKP46	NS
DNAM	0.0005 ***
CD85j	NS

**Anexo 6: Tabla con valores  $p$  de expresión relativa (MIF) de receptores, evaluados en subpoblaciones de células NK en pacientes con LLA y controles, obtenidos de la prueba Mann-Whitney.**

	NKG2A- CD57-	NKG2A+CD57-	NKGA+ CD57+	NKG2A-CD57+
NKG2A	NS	NS	NS	NS
NKG2D	0.0031 **	0.0123 *	0.007 **	0.0165 *
NKG2C	0.0149 *	NS	NS	0.0026 **
CD16	NS	NS	NS	NS
CD57	0.0322 *	NS	0.0062 **	0.0008 ***
CD69	NS	NS	0.0479 *	NS
CD96	0.0051 **	0.0025 **	0.0062 **	0.0081 **
TIGIT	NS	NS	NS	NS
NKP46	NS	0.0406 *	0.0484 *	NS
DNAM	0.0004 ***	0.0022 **	0.0015 **	0.0005 ***
CD85	NS	NS	NS	NS

## BIBLIOGRAFÍA

1. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=3&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=3&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0).
2. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=3&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=3&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0).
3. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=36&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=3&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=36&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=3&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0).
4. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=36&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=3&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=36&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=3&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0).
5. Hurtado Monroy, R., B. Solano Estrada, and P.J.R.d.I.F.d.M. Vargas Viveros, *Leucemia para el médico general*. 2012. **55**(2): p. 11-25.
6. DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA, A. and D.C.C. DE SANTIAGO, *GUÍA DE MANEJO PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO*.
7. Pérez-Saldivar, M.L., et al., *Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology*. 2011. **11**: p. 1-11.
8. Jiménez-Morales, S., A. Hidalgo-Miranda, and J.J.B.M.d.H.I.d.M. Ramírez-Bello, *Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica*. 2017. **74**(1): p. 13-26.
9. Gocho, Y. and J.J.J.B. Yang, *The Journal of the American Society of Hematology, Genetic defects in hematopoietic transcription factors and predisposition to acute lymphoblastic leukemia*. 2019. **134**(10): p. 793-797.
10. Hein, D., et al., *Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia*. 2020. **39**: p. 161-171.
11. Hoshino, A., et al., *Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations*. 2017. **140**(1): p. 223-231.
12. Churchman, M.L., et al., *Germline genetic IKZF1 variation and predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia*. 2018. **33**(5): p. 937-948. e8.
13. Boutboul, D., et al., *Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency*. 2018. **128**(7): p. 3071-3087.
14. Shah, S., et al., *A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia*. 2013. **45**(10): p. 1226-1231.
15. Auer, F., et al., *Inherited susceptibility to pre B-ALL caused by germline transmission of PAX5 c. 547G> A*. 2014. **28**(5): p. 1136-1138.

16. Moriyama, T., et al., *Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study*. 2015. **16**(16): p. 1659-1666.
17. Zhang, M.Y., et al., *Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy*. 2015. **47**(2): p. 180-185.
18. Noetzli, L., et al., *Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia*. 2015. **47**(5): p. 535-538.
19. Topka, S., et al., *Germline ETV6 mutations confer susceptibility to acute lymphoblastic leukemia and thrombocytopenia*. 2015. **11**(6): p. e1005262.
20. Melazzini, F., et al., *Clinical and pathogenic features of ETV6-related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia*. 2016. **101**(11): p. 1333.
21. Poggi, M., et al., *Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+ progenitors*. 2017. **102**(2): p. 282.
22. Qian, M., et al., *TP53 germline variations influence the predisposition and prognosis of B-cell acute lymphoblastic leukemia in children*. 2018. **36**(6): p. 591.
23. Sood, R., Y. Kamikubo, and P.J.B. Liu, *The Journal of the American Society of Hematology, Role of RUNX1 in hematological malignancies*. 2017. **129**(15): p. 2070-2082.
24. Preudhomme, C., et al., *High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder*. 2009. **113**(22): p. 5583-5587.
25. Mori, H., et al., *Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development*. 2002. **99**(12): p. 8242-8247.
26. Schäfer, D., et al., *Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening*. 2018. **131**(7): p. 821-826.
27. Cazzaniga, G., et al., *Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph+ acute lymphoblastic leukemia*. 2011. **118**(20): p. 5559-5564.
28. Hein, D., et al., *The preleukemic TCF3-PBX1 gene fusion can be generated in utero and is present in ≈ 0.6% of healthy newborns*. 2019. **134**(16): p. 1355-1358.
29. Ford, A.M., et al., *In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias*. 1993. **363**(6427): p. 358-360.
30. Ford, A.M., et al., *Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia*. 1998. **95**(8): p. 4584-4588.
31. Yagi, T., et al., *Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. 2000. **96**(1): p. 264-268.
32. Martin-Lorenzo, A., et al., *Infection exposure is a causal factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of Pax5-inherited susceptibility*. 2015. **5**(12): p. 1328-1343.
33. Rodríguez-Hernández, G., et al., *Infection exposure promotes ETV6-RUNX1 precursor B-cell leukemia via impaired H3K4 demethylases*. 2017. **77**(16): p. 4365-4377.
34. EL CONSEJO, D.S.G., L. INSTITUTOS, and P.S.E. SALUD, *PROTOCOLO DE LA ATENCIÓN PARA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA. GUÍA CLÍNICA Y ESQUEMA DE TRATAMIENTO*.
35. Salud, M.S.d., *Guía práctica clínica, Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda en Adultos*. 2008.

36. México, I.M.d.S.S., *Diagnóstico y Tratamiento Leucemia Linfoblástica Aguda en el Adulto Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica*. . 2018.
37. Friedmann, A.M. and H.J.J.T.o. Weinstein, *The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia*. 2000. **5**(4): p. 321-328.
38. Carroll, W.L., et al., *Pediatric acute lymphoblastic leukemia*. 2003. **2003**(1): p. 102-131.
39. Smith, M., et al., *Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia*. 1996. **14**(1): p. 18-24.
40. Papaemmanuil, E., et al., *RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia*. 2014. **46**(2): p. 116-125.
41. Mizia-Malarz, A. and G.J.D.M. Sobol-Milejska, *NK cells as possible prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia*. 2019. **2019**.
42. Sánchez, M.A.O., M.L.O. Ortega, and J.V.R.J.M.i.d.M. Barrientos, *Leucemia linfoblástica aguda*. 2007. **23**(1): p. 27-33.
43. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A.J.T.i.i. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. 2001. **22**(11): p. 633-640.
44. Long, E.O., et al., *Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition*. 2013. **31**: p. 227-258.
45. Montaldo, E., et al., *Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function*. 2013. **83**(8): p. 702-713.
46. Prager, I. and C.J.J.o.l.b. Watzl, *Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity*. 2019. **105**(6): p. 1319-1329.
47. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity*. 2005. **42**(4): p. 501-510.
48. Rousalova, I. and E.J.I.j.o.o. Krepela, *Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation*. 2010. **37**(6): p. 1361-1378.
49. Lanier, L.L.J.A.R.I., *NK cell recognition*. 2005. **23**: p. 225-274.
50. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. 1999. **190**(10): p. 1505-1516.
51. Cantoni, C., et al., *NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily*. 1999. **189**(5): p. 787-796.
52. Vitale, M., et al., *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis*. 1998. **187**(12): p. 2065-2072.
53. Sivori, S., et al., *NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells*. 1999. **29**(5): p. 1656-1666.
54. Hadad, U., et al., *NKp46 clusters at the immune synapse and regulates NK cell polarization*. 2015. **6**: p. 495.
55. Sivori, S., et al., *IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors*. 2003. **33**(12): p. 3439-3447.
56. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. 2001. **19**(1): p. 197-223.
57. Raulat, D.H., et al., *Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor*. 2013. **31**: p. 413-441.

58. Braud, V.M., D.S. Allan, and A.J.J.C.o.i.i. McMichael, *Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules*. 1999. **11**(1): p. 100-108.
59. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. 2001. **14**(2): p. 123-133.
60. Gumá, M., et al., *Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire*. 2004. **104**(12): p. 3664-3671.
61. Rölle, A. and P.J.T.i.i. Brodin, *Immune adaptation to environmental influence: the case of NK cells and HCMV*. 2016. **37**(3): p. 233-243.
62. Brown, M.G., et al., *A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6*. 1997. **42**(1): p. 16-25.
63. Bakker, A.B., et al., *NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals*. 2000. **61**(1): p. 18-27.
64. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. 1999. **285**(5428): p. 727-729.
65. Chalupny, N.J., et al., *ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D*. 2003. **305**(1): p. 129-135.
66. Hayakawa, Y., et al., *Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin*. 2002. **169**(10): p. 5377-5381.
67. Colonna, M. and J.J.S. Samaridis, *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells*. 1995. **268**(5209): p. 405-408.
68. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset*. 2001. **97**(10): p. 3146-3151.
69. De Andrade, L.F., et al., *DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins*. 2014. **92**(3): p. 237-244.
70. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. 1996. **4**(6): p. 573-581.
71. Sakisaka, T. and Y.J.C.o.i.c.b. Takai, *Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules*. 2004. **16**(5): p. 513-521.
72. Zhang, Z., et al., *DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif*. 2015. **212**(12): p. 2165-2182.
73. Tahara-Hanaoka, S., et al., *Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor*. 2006. **107**(4): p. 1491-1496.
74. Castriconi, R., et al., *Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction*. 2004. **64**(24): p. 9180-9184.
75. Carlsten, M., et al., *Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells*. 2009. **183**(8): p. 4921-4930.
76. Iguchi-Manaka, A., et al., *Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor*. 2008. **205**(13): p. 2959-2964.
77. Gilfillan, S., et al., *DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors*. 2008. **205**(13): p. 2965-2973.
78. Testi, R., et al., *The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells*. 1994. **15**(10): p. 479-483.
79. Borrego, F., J. Peña, and R.J.E.j.o.i. Solana, *Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases*. 1993. **23**(5): p. 1039-1043.



80. Gerosa, F., et al., *Different sensitivity to interleukin 4 of interleukin 2-and interferon  $\alpha$ -induced CD69 antigen expression in human resting NK cells and CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> lymphocytes.* 1992. **141**(2): p. 342-351.
81. Gerosa, F., et al., *Differential effects of tyrosine kinase inhibition in CD69 antigen expression and lytic activity induced by rIL-2, rIL-12, and rIFN- $\alpha$  in human NK cells.* 1993. **150**(2): p. 382-390.
82. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R.J.S.c. Alderson, *The activation antigen CD69.* 1994. **12**(5): p. 456-465.
83. Pisegna, S., et al., *Src-dependent Syk activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells.* 2002. **169**(1): p. 68-74.
84. Zingoni, A., et al., *CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94/NKG2-A inhibitory receptor.* 2000. **30**(2): p. 644-651.
85. Risso, A., et al., *CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression.* 1991. **146**(12): p. 4105-4114.
86. Bikah, G., et al., *Regulating T helper cell immunity through antigen responsiveness and calcium entry.* 2000. **1**(5): p. 402-412.
87. Sancho, D., et al., *Functional analysis of ligand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors.* 2000. **165**(7): p. 3868-3875.
88. Bryceson, Y.T., H.-G. Ljunggren, and E.O.J.B. Long, *The Journal of the American Society of Hematology, Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors.* 2009. **114**(13): p. 2657-2666.
89. Bryceson, Y.T., et al., *Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells.* 2005. **202**(7): p. 1001-1012.
90. Cruz-Muñoz, M.E., et al., *From the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance.* 2019. **105**(5): p. 955-971.
91. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.* 1998. **391**(6669): p. 795-799.
92. Borrego, F., et al., *Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis.* 1998. **187**(5): p. 813-818.
93. Lee, N., et al., *HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A.* 1998. **95**(9): p. 5199-5204.
94. Chester, C., K. Fritsch, and H.E.J.F.i.i. Kohrt, *Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy.* 2015. **6**: p. 601.
95. Le Dréan, E., et al., *Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases.* 1998. **28**(1): p. 264-276.
96. Levy, E.M., et al., *Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer.* 2008. **32**(3): p. 633-641.
97. Mamessier, E., et al., *Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity.* 2011. **121**(9): p. 3609-3622.
98. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells.* 2009. **10**(1): p. 48-57.
99. Martinet, L. and M.J.J.N.R.I. Smyth, *Balancing natural killer cell activation through paired receptors.* 2015. **15**(4): p. 243-254.

100. Bernhardt, G.J.N.i., *TACTILE becomes tangible: CD96 discloses its inhibitory peculiarities*. 2014. **15**(5): p. 406-408.
101. Chan, C.J., et al., *The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions*. 2014. **15**(5): p. 431-438.
102. Zhang, Q., et al., *Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity*. 2018. **19**(7): p. 723-732.
103. Navarro, F., et al., *The ILT2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells*. 1999. **29**(1): p. 277-283.
104. Shiroishi, M., et al., *Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G*. 2003. **100**(15): p. 8856-8861.
105. Dębska-Zielkowska, J., et al., *KIR receptors as key regulators of NK cells activity in health and disease*. 2021. **10**(7): p. 1777.
106. Lanier, L.L., et al., *The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes*. 1986. **136**(12): p. 4480-4486.
107. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. 2007. **179**(1): p. 89-94.
108. Huntington, N.D., et al., *IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo*. 2009. **206**(1): p. 25-34.
109. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16<sup>-</sup> killer Ig-like receptor<sup>-</sup> NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. 2007. **178**(8): p. 4947-4955.
110. Lopez-Vergès, S., et al., *CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16<sup>+</sup> NK-cell subset*. 2010. **116**(19): p. 3865-3874.
111. Kern, F., et al., *The enigma of CD57<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>T cell expansion—anergy or activation?* 1996. **104**(1): p. 180-184.
112. Sze, D.M.-Y., et al., *Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> compartment*. 2001. **98**(9): p. 2817-2827.
113. Chiossone, L., et al., *Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer*. 2018. **18**(11): p. 671-688.
114. Eckl, J., et al., *Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging*. 2012. **90**: p. 55-66.
115. Frishman-Levy, L., et al., *Central nervous system acute lymphoblastic leukemia: role of natural killer cells*. 2015. **125**(22): p. 3420-3431.
116. Vivier, E., et al., *Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer*. 2012. **12**(4): p. 239-252.
117. Rouce, R.H., et al., *The TGF- $\beta$ /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia*. 2016. **30**(4): p. 800-811.
118. Valhondo, I., et al., *Characterization of the DNAM-1, TIGIT and TACTILE axis on circulating NK, NKT-like and T cell subsets in patients with acute myeloid leukemia*. 2020. **12**(8): p. 2171.
119. Schüz, J., et al., *Association of childhood leukaemia with factors related to the immune system*. 1999. **80**(3): p. 585-590.
120. Lee, J.-C., et al., *Elevated TGF- $\beta$ 1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients*. 2004. **172**(12): p. 7335-7340.

121. Facundo, N.L., J.T. Piña, and I.T.J.G.M.d.O. Romero, *Mortalidad temprana en niños con leucemia linfoblástica aguda en un país en vías de desarrollo; factores asociados con el pronóstico*. 2008. **7**(3): p. 93-102.
122. Sanchez-Correa, B., et al., *Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients*. 2012. **90**(1): p. 109-115.
123. Lepletier, A., et al., *The immune checkpoint CD96 defines a distinct lymphocyte phenotype and is highly expressed on tumor-infiltrating T cells*. 2019. **97**(2): p. 152-164.
124. Wang, P.L., et al., *Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily*. 1992. **148**(8): p. 2600-2608.
125. by Interacting, C.-T.C.A.J.J.o.I., *Cutting Edge: CD96 (Tactile) Promotes NK*. 2004. **172**: p. 3994-3998.
126. Pierson, B.A. and J.S. Miller, *CD56+ bright and CD56+ dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis*. 1996.
127. Aggarwal, N., et al., *Natural killer cell (NK) subsets and NK-like T-cell populations in acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes*. 2016. **90**(4): p. 349-357.
128. Carson, W.E., T.A. Fehniger, and M.A.J.E.j.o.i. Caligiuri, *CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand*. 1997. **27**(2): p. 354-360.
129. Champagne, P., et al., *Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes*. 2001. **410**(6824): p. 106-111.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Sherif Farag,  
Indiana University School of Medicine,  
United States

## REVIEWED BY

W. Scott Goebel,  
Indiana University School of Medicine,  
United States  
Toshihiro Onishi,  
Indiana University School of Medicine,  
United States

## \*CORRESPONDENCE

Juan Manuel Mejía-Aranguré  
jmejia@inmegen.gob.mx  
Mario Ernesto Cruz-Munoz  
mario.cruz@uaem.mx

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Hematologic Malignancies,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

RECEIVED 19 August 2022

ACCEPTED 17 October 2022

PUBLISHED 07 November 2022

## CITATION

Valenzuela-Vázquez L,  
Nuñez-Enriquez JC, Sánchez-Herrera J,  
Medina-Sanson A, Pérez-Saldivar ML,  
Jiménez-Hernández E, Martiín-Trejo JA,  
Del Campo-Martínez MdLA,  
Flores-Lujano J, Amador-Sánchez R,  
Mora-Ríos FG, Peñaloza-González JG,  
Duarte-Rodríguez DA, Torres-Nava JR,  
Espinoza-Elizondo RM, Cortés-Herrera B,  
Flores-Villegas LV, Merino-Pasaye LE,  
Almeida-Hernández C,  
Ramírez-Colorado R, Solís-Labastida KA,  
Medrano-López F, Pérez-Gómez JA,  
Velázquez-Aviña MM, Martínez-Ríos A,  
Aguilar-De los Santos A,  
Santillán-Juárez JD, Gurrola-Silva A,  
García-Velázquez AJ, Mata-Rocha M,  
Hernández-Echáurregui GA,  
Sepúlveda-Robles OA,  
Rosas-Vargas H, Mancilla-Herrera I,  
Jimenez-Morales S, Hidalgo-Miranda A,  
Martinez-Duncker I, Waight JD,  
Hance KW, Madauss KP,  
Mejía-Aranguré JM and  
Cruz-Munoz ME (2022) NK cells with  
decreased expression of multiple  
activating receptors is a dominant  
phenotype in pediatric patients with  
acute lymphoblastic leukemia.  
*Front. Oncol.* 12:1023510.  
doi: 10.3389/fonc.2022.1023510

# NK cells with decreased expression of multiple activating receptors is a dominant phenotype in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia

Lucero Valenzuela-Vázquez<sup>1,2†</sup>, Juan Carlos Nuñez-Enriquez<sup>3†</sup>,  
Jacqueline Sánchez-Herrera<sup>1,2</sup>, Aurora Medina-Sanson<sup>4</sup>,  
María Luisa Pérez-Saldivar<sup>3</sup>, Elva Jiménez-Hernández<sup>5</sup>,  
Jorge Alfonso Martiín-Trejo<sup>6</sup>,  
María de Los Ángeles Del Campo-Martínez<sup>5</sup>,  
Janet Flores-Lujano<sup>3</sup>, Raquel Amador-Sánchez<sup>7</sup>,  
Félix Gustavo Mora-Ríos<sup>8</sup>, José Gabriel Peñaloza-González<sup>9</sup>,  
David Aldebarán Duarte-Rodríguez<sup>3</sup>, José Refugio Torres-Nava<sup>10</sup>,  
Rosa Martha Espinosa-Elizondo<sup>11</sup>, Beatriz Cortés-Herrera<sup>11</sup>,  
Luz Victoria Flores-Villegas<sup>12</sup>, Laura Elizabeth Merino-Pasaye<sup>12</sup>,  
Carolina Almeida-Hernández<sup>13</sup>, Rosario Ramírez-Colorado<sup>14</sup>,  
Karina Anastacia Solís-Labastida<sup>6</sup>, Francisco Medrano-López<sup>15</sup>,  
Jessica Arleet Pérez-Gómez<sup>15</sup>, Martha Margarita Velázquez-Aviña<sup>9</sup>,  
Annel Martínez-Ríos<sup>8</sup>, Antonio Aguilar-De los Santos<sup>16</sup>,  
Jessica Denisse Santillán-Juárez<sup>17</sup>, Alma Gurrola-Silva<sup>18</sup>,  
Alejandra Jimena García-Velázquez<sup>17</sup>, Minerva Mata-Rocha<sup>3</sup>,  
Gabriela Alicia Hernández-Echáurregui<sup>10</sup>,  
Omar Alejandro Sepúlveda-Robles<sup>19</sup>, Haydeé Rosas-Vargas<sup>19</sup>,  
Ismael Mancilla-Herrera<sup>20</sup>, Silvia Jimenez-Morales<sup>21</sup>,  
Alfredo Hidalgo-Miranda<sup>21</sup>, Ivan Martinez-Duncker<sup>22</sup>,  
Jeremy D. Waight<sup>23</sup>, Kenneth W. Hance<sup>23</sup>, Kevin P. Madauss<sup>23</sup>,  
Juan Manuel Mejía-Aranguré<sup>19,21,24\*</sup>  
and Mario Ernesto Cruz-Munoz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico, <sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico, <sup>3</sup>Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional (CMN) "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico, <sup>4</sup>Servicio de Oncología Pediátrica, Hospital Infantil de México, "Dr. Federico Gómez Santos", Secretaría de Salud, Ciudad de México, Mexico, <sup>5</sup>Servicio de Hematología Pediátrica,

Hospital General "Gaudencio González Garza", Centro Médico Nacional (CMN) "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico, <sup>6</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional (CMN) "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico, <sup>7</sup>Hospital General Regional No. 1 "Carlos McGregor Sánchez Navarro", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico, <sup>8</sup>Departamento de Hematología, Hospital General Regional Ignacio Zaragoza del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Mexico City, Mexico, <sup>9</sup>Servicio de Onco-Pediatría, Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud (SS), Mexico City, Mexico, <sup>10</sup>Servicio de Oncología, Hospital Pediátrico de Moctezuma, Secretaría de Salud de la Ciudad de México (CDMX), Mexico City, Mexico, <sup>11</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital General de México, Secretaría de Salud (SS), Mexico City, Mexico, <sup>12</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Centro Médico Nacional (CMN) "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Mexico City, Mexico, <sup>13</sup>Hospital General de Ecatepec "Las Américas", Instituto de Salud del Estado de México (ISEM), Mexico City, Mexico, <sup>14</sup>Hospital Pediátrico La Villa, Secretaría de Salud de la Ciudad de México (SSCDMX), Mexico City, Mexico, <sup>15</sup>Hospital General Regional (HGR) No. 72 "Dr. Vicente Santos Guajardo", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico, <sup>16</sup>Hospital General de Zona 98, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico, <sup>17</sup>Servicio de Hemato-oncología Pediátrica, Hospital Regional No. 1º de Octubre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Mexico City, Mexico, <sup>18</sup>Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia, Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado, Mexico City, Mexico, <sup>19</sup>Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional (CMN) "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico, <sup>20</sup>Departamento de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City, Mexico, <sup>21</sup>Laboratorio de Genómica del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico, <sup>22</sup>Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico, <sup>23</sup>Oncology R&D, GlaxoSmithKline, Collegeville, PA, United States, <sup>24</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

NK cells have unique attributes to react towards cells undergoing malignant transformation or viral infection. This reactivity is regulated by activating or inhibitory germline encoded receptors. An impaired NK cell function may result from an aberrant expression of such receptors, a condition often seen in patients with hematological cancers. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer worldwide and NK cells have emerged as crucial targets for developing immunotherapies. However, there are important gaps concerning the phenotype and behavior of NK cells during emergence of ALL. In this study we analyze the phenotype and function of NK cells from peripheral blood in pediatric patients with ALL at diagnosis. Our results showed that NK cells exhibited an altered phenotype highlighted by a significant reduction in the overall expression and percent representation of activating receptors compared to age-matched controls. No significant differences were found for the expression of inhibitory receptors. Moreover, NK cells with a concurrent reduced expression in various activating receptors, was the dominant phenotype among patients. An alteration in the relative frequencies of NK cells expressing NKG2A and CD57 within the mature NK cell pool was also observed. In addition, NK cells from patients displayed a significant reduction in the ability to sustain antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Finally, an aberrant expression of activating receptors is associated with the phenomenon of leukemia during childhood.

#### KEYWORDS

**NK cells, acute lymphoblastic leukemia, immunooncology, cancer, immune system**

## Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer worldwide and follows a lethal course if an effective treatment is not provided (1). Whereas the causal mechanisms of ALL are not well known, the whole series of intrinsic and extrinsic factors that contribute or influence the course of the disease, are neither fully explored. A link between immune system and cancer is based on the ability of immune cells to recognize and eliminate cancer cells (2, 3). A failure in the mechanisms by which immune cells recognize and eliminate malignant cells may favor the emergence of cancer. Whereas this condition is well described and documented in solid tumors, much less is known in liquid cancers such as ALL (4). Relative to other immune populations, NK cells play a dominant role in recognizing and eliminating leukemia cells (5). In agreement with this idea, improved cure rates of high-risk pediatric ALL patients have been observed following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from donors with alloreactive NK cells (6–8). Furthermore, NK cells arising from the grafted hematopoietic precursors, were found to be responsible for a favorable clinical outcome (9). Therefore, NK cells are key mediators of immunosurveillance and they have emerged as an important immune population targeted for cancer immunotherapy (10–12). Despite the potential for NK cells in the treatment of acute leukemia (13), several studies have documented that ALL blast are not effectively eliminated by NK cells (14–17). Whereas the precise mechanisms underlying this phenomenon remain poorly understood, it is proved that the numbers and function of NK cells are compromised (17–20).

NK cells recognize and destroy malignant cells by surveying for a lack of cell surface major histocompatibility complex (MHC) class I molecules ('missing-self'), as well as *de novo* appearance of molecules on target cells ('induced-self') (21). NK cell recognition and reactivity are mediated by various germline encoded receptors that either stimulate or restrain NK cell effector functions (21, 22). Among receptors with activating functions for NK cells are those belonging to the Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) family, Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) family, Natural Killer Group (NKG) (23), and Immunoglobulin (Ig)-like receptors such as DNAM-1 (CD226) (24, 25). By contrast, receptors grouped in the NK cell Ig-like receptors (KIR) family, are responsible for recognizing "self", and to provide inhibitory signals to prevent unsolicited NK cell activation (26). In addition to inhibitory KIRs, others receptors have been shown to dampen NK cell function, including TIGIT, CD96, TIM-3, and PD-1 (27, 28). The expression density of activating and inhibitory receptors may also influence NK cell reactivity. Indeed, defective NK cell effector functions may result from aberrant expression of

receptors, a phenomenon often seen in patients with various types of cancers and other pathologies (29–33). Recent studies, have also suggested a role for inhibitory checkpoints in mediate immune suppression (34), however their contribution in an abnormal NK cell function during ALL remains elusive.

In this study, we demonstrate for the first time that in a cohort of 72 pediatric ALL patients, NK cells from peripheral blood exhibited a reduced overall expression of various activating receptors at diagnosis relative to age-matched healthy controls. By contrast, we did not find any significant difference between patients and controls regarding the expression of inhibitory receptors. Moreover, among ALL patients, the frequencies of NK cells with a decreased expression in more than one single-type of activating receptors was dominant over NK cells with a decreased expression in just a single-type of activating receptors. In addition, a significant change in the relative proportions of NK cells expressing NKG2A and CD57 in the mature NK-cell pool was observed in ALL patients compared to healthy controls. Moreover, NK cells from patients displayed a significant reduction in reverse antibody dependent cell cytotoxicity (rADCC) compared to healthy controls. Finally, a logistical regression analysis demonstrated that an abnormal expression of activating receptors in NK cells is associated with an increased risk of developing childhood ALL, suggesting a protective role of activating receptors against acute leukemia.

## Materials and methods

### Patients and study design

This study was conducted under two different designs. The first, is a case-control study that included 72 patients with newly diagnosed ALL, and 21 age-matched healthy controls (Table 1). A second cohort study, that included the same 72 ALL patients, was designed for identifying possible associations between the NK cell phenotype and the risk of acute lymphoblastic leukemia. Peripheral blood samples were collected from incident cases of ALL treated in public hospitals in Mexico City under 18 years of age. Diagnosis of ALL was based on the morphologic and immunophenotypic features of leukemic cells. Peripheral blood samples (2–3 ml) from patients were obtained at diagnosis and before treatment initiation. Healthy controls were matched with cases according to gender frequencies and age. The exclusion criteria for controls were neoplasms, hematological diseases, and congenital malformations. Allergies and infections were an exclusion criteria if they were the reason for the hospital admission at the time of recruitment. An approval by National Scientific Research and Ethics Committee was obtained with the number R-2016-785-042.

TABLE 1 Clinical characteristic of the validation cohort.

Study variables	Controls n=21 n (%)	ALL cases n=72 n (%)
<b>Child's sex</b>		
Female	10 (47.6)	32 (44.4)
Male	11 (52.4)	40 (55.6)
<b>Age group (years)</b>		
< 1	1 (4.7)	1 (1.4)
1-9	11 (52.4)	42 (58.3)
≥ 10	9 (42.9)	29 (40.3)
<b>Infections in the first year of life</b>		
No	8 (38.1)	26 (36.1)
Yes	13 (61.9)	46 (63.9)
<b>Allergies</b>		
No	13 (61.9)	60 (83.3)
Yes	8 (38.1)	12 (16.7)
<b>Leukocyte Count</b>		
< 50,000	----	58 (80.6)
≥ 50,000	----	14 (19.4)
<b>Rearrangement</b>		
Not Detected	----	67 (93.1)
Detected	----	5 (6.9)
<b>Immunophenotype</b>		
Pre-B	----	70 (97.2)
T cell	----	2 (2.8)
<b>NCI Risk</b>		
High Risk		37 (51.4)
Standard Risk		35 (48.6)
<b>Relapse</b>		
No	----	65 (90.3)
Yes	----	7 (9.7)
<b>Death</b>		
No	----	64 (88.9)
Yes	----	8 (11.1)

ALL, acute lymphoblastic leukemia.

The median follow-up time of the patient cohort was 10 months (4-19 months) after confirmation of the diagnosis.

## Clinical data collection and risk classification

Risk classification at diagnosis was based on the National Cancer Institute risk criteria. All patients were treated according to the chemotherapy protocol used in each hospital where patients received medical care. For the case-control study, variables as infection during the first year of age and allergies during the infancy were registered as confounding variables. The medical history of cases and controls regarding common infections in the first year of life and allergies was explored as it has been recommended and used in previous studies (35, 36). In relation to common infections, we interrogated for any

infections (including routine childhood viral infections, non-severe infections such as acute otitis, serious infections causing hospitalization, among other common infections). Concerning the allergies, the cases' parents were required to indicate whether their children had any allergy for at least 1 year before the diagnosis of ALL, whereas the control children's parents were asked about the occurrence of any allergy at least 1 year before the interview. The parents were questioned about the specific type of allergy (asthma, rhinitis, skin allergy, and other allergies such as seasonal, food, drug, etc.).

## Antibodies and reagents

The antibodies used in this study are listed in [Supplementary Table 1](#).

## NK cell phenotyping

Peripheral blood was collected in EDTA-containing vacutainers. Then, 50 µl of blood was aliquoted in three different tubes and incubated with a different combination of primary antibodies (Ab) for 30 min at 4°C ([Supplementary Table 1](#)). Then, cells were washed, red blood cells lysed with 1X lysis buffer (BD Pharm Lyse™ Cat: 555899) and, fixed with 2% paraformaldehyde for subsequent acquisition. Autofluorescence was used as a negative control, previously validated with isotype controls using the same combination of fluorochromes. The samples were acquired in a FACSCanto II cytometer (BD bioscience). NK cells were defined as CD3-CD20-CD14-CD56+ cells. Final analysis of the expression for each NK cell marker was performed using FlowJo 7.6.5 software (Tree Star, Ashland, OR) and Infinicyt 2.0.4.

## NK cell degranulation assays

NK cell degranulation assays were performed as elsewhere described (37, 38). Briefly, PBMCs ( $1 \times 10^6$ /ml) were incubated with P815 cells ( $2 \times 10^6$ /ml) in a total volume of 200 µl in a 96 well plate. P815 cells were supplemented with 5mg/ml of anti-CD16 mAb (Clone 3G8, eBiosciences). After 3 hours of incubation at 37°C, cells were recovered and stained using following antibodies: anti-CD3 FITC, anti-CD56 APC, and anti-CD107 PE (Biolegend, clone H4A3). GolgiStop was not included in these assays. Cells were acquired on FACSCanto II (BD bioscience) and analyses with the use of FlowJo 7.6.5 software (Tree Star, Ashland, OR). Gates were set to exclude CD3+ lymphocytes. Thereafter, the percentage of cells positive for CD107a was obtained after gating in CD3-CD56+ lymphocytes. The basal percentages for CD107a were obtained from PBMCs incubated with P815 cells with no agonist mAb.

Degranulation was represented as the fold increase for CD107a, which is the difference between the percentage of NK cells expressing CD107a at surface after stimulation with P815 cells supplemented with agonist mAb, and the percentage of NK cells expressing CD107a at NK cell surface after incubation with P815 cells with no agonist mAb. NK cell degranulation assays were performed in 32 acute leukemia patients and 10 age-matched healthy controls.

## Statistical analysis

The analysis was conducted using SPSS software (version 21; IBM Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL). A descriptive analysis was performed calculating frequencies and percentages for the categorical variables. Likewise, the distribution of continuous variables was evaluated using Shapiro-Wilk. The percentages on NK cells expressing a given surface marker and its relative expression displayed a non-parametric distribution. The difference in the expression of each receptor between cases and controls was evaluated using the Mann Whitney U one-tailed test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Furthermore, the expression of the immunoreceptors was categorized into two groups according to the 50th percentile of the expression observed in the control group. Subsequently, the 95% confidence interval (CI), the unadjusted odds ratios (OR) and adjusted odds ratios (aOR), were calculated using unconditional logistic regression analysis. Adjusting variables were the child's age, gender, infections during the first year of life, and a history of allergies. In this study, infections and allergies were considered as confounding variables since an early life exposure to infectious agents and allergies are two well-known proxies of the immune stimulation process that have been associated with acute lymphoblastic leukemia during childhood (36, 39). Additionally, associations between immunoreceptors and clinical characteristics (age >10 years, male sex, history of allergies, >50,000xmm<sup>3</sup> leukocyte count and T cell immunophenotype) and outcomes (relapse, death) were explored in the group of cases with ALL. For Venn diagrams we use the Eulerr package for R version 6.1.0.

## Results

### Demographic and clinical features of pediatric ALL patients

In this study, we characterized peripheral blood NK cells from 72 ALL patients, collected at diagnosis, along 21 age-matched healthy controls. In the present study no significant difference was observed between cases and controls regarding child's sex and age (Table 1). B cell (B)-ALL was the

predominant disease subtype, accounting for 97.2% of all patient samples analyzed, with 6.9% of total patients harboring a genetic rearrangement. 14 patients (19.4%) presented with leukocyte counts >50,000 x mm<sup>3</sup>, 7 patients (9.7%) relapsed, and 8 patients (11.1%) died (Table 1). Infections during the first year of life was found to be similar between control and ALL groups (61.9% and 63.9%, respectively), while allergies were more frequent in the group control (38.1% and 16.7%, respectively) (Table 1).

### Decreased expression of activating receptors in NK cells from patients with acute leukemia

Before analyzing the phenotype on peripheral blood NK cells, we compared the relative frequencies of NK cells between patients and controls. The relative frequencies of the two major NK cell subsets (CD56 dim and CD56 bright) were significantly reduced in pediatric ALL patients compared with age-matched healthy controls ( $P < 0.0001$ ) (Supplementary Figures 1A, B). Then, we analyzed the expression frequency of major receptors associated with NK cell activation. As reported before (17, 24), we observed a significant decrease ( $P = 0.0252$ ) in the percentage of NKp46<sup>+</sup> NK cells in ALL patients compared with controls (Figure 1A). A significant decrease in the percentages of NKG2C<sup>+</sup> NK cells ( $P = 0.0084$ ) and NKG2D<sup>+</sup> NK cells ( $P = 0.0008$ ) was also found in ALL patients when compared with healthy controls (Figure 1A). DNAM showed also a significant decrease ( $P < 0.0001$ ) in the percentage of DNAM-1<sup>+</sup> NK cells in ALL patients when compared with healthy controls (Figure 1A). Finally, the relative frequencies of NK cells expressing members of the SLAM including 2B4 (SLAMF4), NTBA (SLAMF6), or SLAMF7, were also significantly decreased (2B4<sup>+</sup>  $P < 0.0001$ ; NTBA<sup>+</sup>  $P < 0.0001$ ; SLAMF7<sup>+</sup>  $P = 0.0002$ ) in ALL patients relative to age-matched controls. Representative flow cytometer plots from controls and patients are shown in Figure 1B.

We analyzed the percentage of NK cells expressing markers associated with alternative lymphocyte and NK cell functions, including differentiation and cellular retention. For these markers, we did not observe a significant difference in the percentage of CD16<sup>+</sup> NK cells in ALL patients when compared with controls (Supplementary Figures 2A, B). Like CD16, we observed no significant difference in the percentage of NK cells expressing CD69 (Supplementary Figures 2A, B). Finally, we also assessed the expression percentage of CD57, a marker associated with replicative senescence or terminal differentiation (40–42). The percentage of CD57<sup>+</sup> NK cells was significantly reduced ( $P = 0.0175$ ) in ALL patients relative to healthy controls. Consistent with a reduced percentage positivity, we found lower overall expression density of NKG2C, DNAM-1, SLAMF7, NBTA, 2B4, and CD57



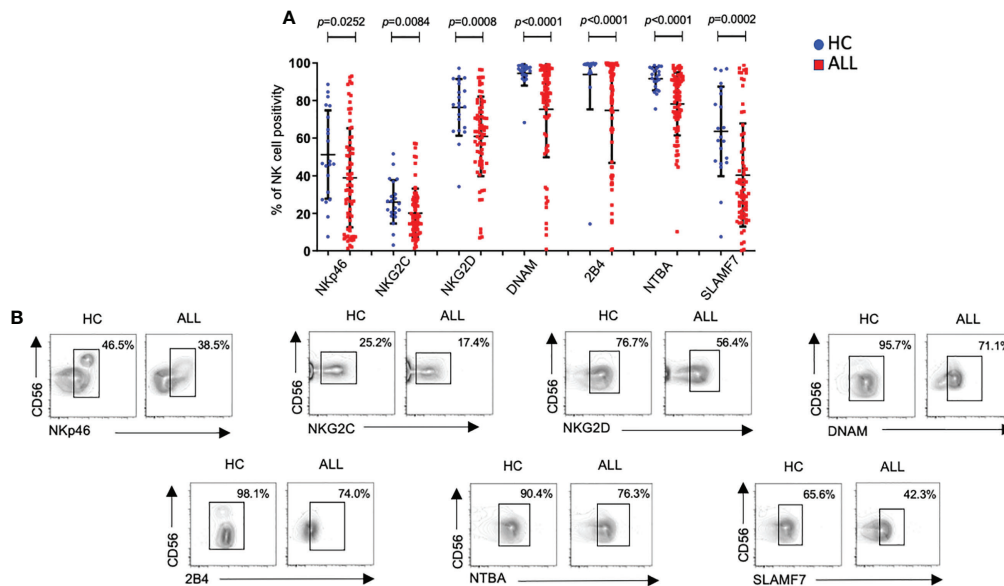


FIGURE 1

Percentages of NK cells expressing distinct activating receptors from ALL patients and healthy controls. (A) The frequencies of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells expressing distinct activating receptors were analyzed by flow cytometry in 72 ALL patients and 21 healthy controls. Vertical lines indicate standard deviation. The horizontal lines represents the mean value. P values reports significance according to U-Mann Whitney Test one-tail. HC: healthy controls; ALL: Acute lymphoblastic leukemia patients. (B) Representative FACS plots depict the percentage of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells expressing distinct activating receptors from healthy controls ( $n = 21$ ) and ALL patients ( $n = 72$ ). HC: healthy controls; ALL: Acute lymphoblastic leukemia patients.

(Figures 2A–C). Interestingly, despite the lack of overt differences in percent positivity, we found lower overall expression density of CD69 on NK cells. Altogether, the data suggest that NK cells from pediatric ALL patients display an aberrant NK cell phenotype characterized by a significant reduction in the percent positivity and overall expression density of various activating receptors.

## NK cells from pediatric ALL patients exhibit normal inhibitory receptor expression

Alongside inhibitory receptors belonging to the KIR family, several recently-described receptors have been ascribed broad immunoregulatory roles (27). One of such receptors, TIGIT, has been shown to inhibit the effector function of both T and NK cells (43–45). With this in mind, we evaluated the expression frequency of TIGIT on peripheral blood NK cells from pediatric ALL patients. While we failed to observe significant differences in TIGIT<sup>+</sup> NK cells between ALL and healthy donor samples, we found a significant decrease in CD96, another member of the DNAM-1-TIGIT axis (46) (Figure 3). NKG2A, is an inhibitory receptor which expression is upregulated in patients with acute leukemia (17). No significant differences were observed for the percentage of NKG2A<sup>+</sup> NK cells between patients and controls (Figure 3). Finally, we also evaluated

the expression frequency of CD85j (ILT2), an immunoglobulin (Ig)-like receptor, which displays an inhibitory role in NK cells upon ligation with HLA molecules (47). As with TIGIT and NKG2A, we did not find any significant differences in the percentage of NK cells expressing CD85j in ALL patients when compared with controls. When the overall expression of NKG2A, TIGIT, and, CD85j was analyzed, we did not find any significant difference between healthy controls and ALL patients (Figures 2A–C). As an exception to these findings, a significant decrease in the expression density of CD96 was observed in ALL patients when compared to healthy controls. These data suggest that in contrast to broad modulation of activating receptors, NK cells from pediatric ALL patients do not display an irregular inhibitory receptor expression profile.

## A convergent decreased expression of activating receptors dominates the NK cell phenotype among ALL patients

Since a significant reduction in the expression frequency of various NK cell activating receptors was observed in ALL patients when compared with healthy controls, we analyzed the concurrent expression patterns for such activating receptors among NK cells from ALL patients. Patients were distributed in two categories based on the 50th percentile. Seven different possible phenotype combinations were analyzed and their

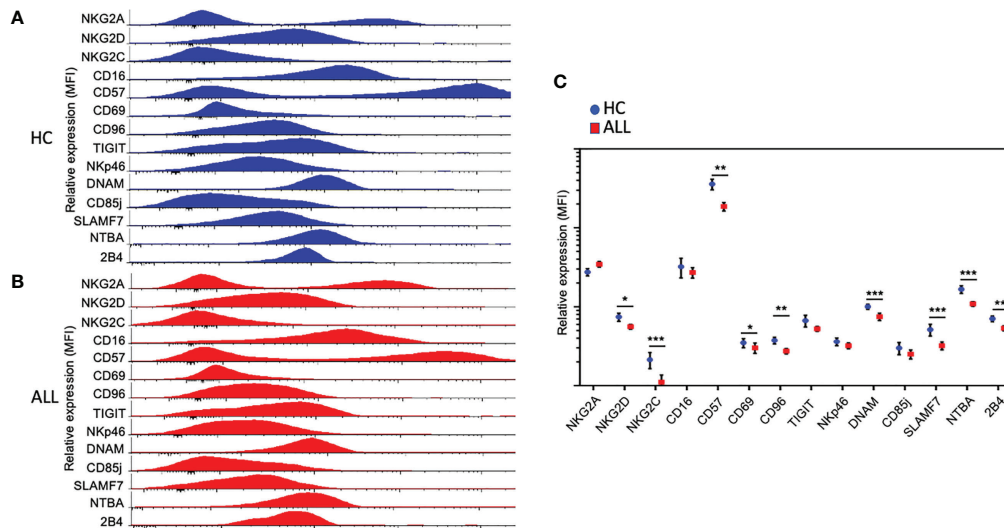


FIGURE 2

Relative expression of activating and inhibitory receptors on NK cells. Relative expression, represented as the mean fluorescence intensity (MFI), of activating and inhibitory receptors in NK cells from total healthy controls (n = 21) (A) and ALL patients (n = 62) (B). Histograms cover all the values obtained for each control and patient as indicated. (C) Summary of data for frequencies of NK cell expressing distinct activating and inhibitory receptors from 21 healthy controls and 62 ALL patients. The vertical lines indicate standard deviation. The horizontal lines represent the mean value. Results were considered significant at \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

profiles were analyzed by the Eulerr package for R version 6.1.0. (Figure 4). We found that in 62% (n=44) of patients with ALL, NK cells had a convergent decreased expression frequency for SLAMF7, 2B4 and, NTB-A (Figure 4A, top panel). In contrast, only one patient (3.6%) display a normal concurrent expression for such activating receptors (Figure 4A bottom panel). A

concurrent decreased expression frequency for DNAM-1, TIGIT and, CD96 in NK cells was observed in 53% of ALL patients (Figure 4B, top panel), whereas 16.2% of ALL patients showed NK cells with a normal concurrent for DNAM-1, TIGIT and, CD96 (Figure 4B, bottom panel). Finally, when we analyzed the expression profile for DNAM-1, 2B4 and, NKG2D, we found

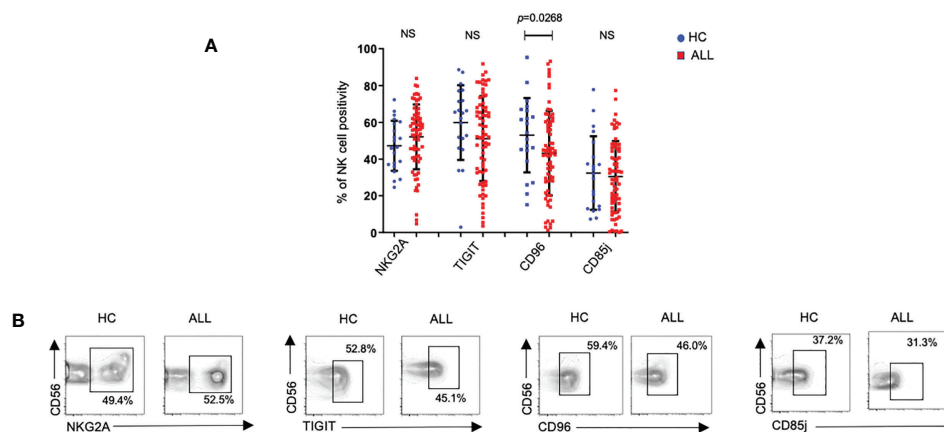
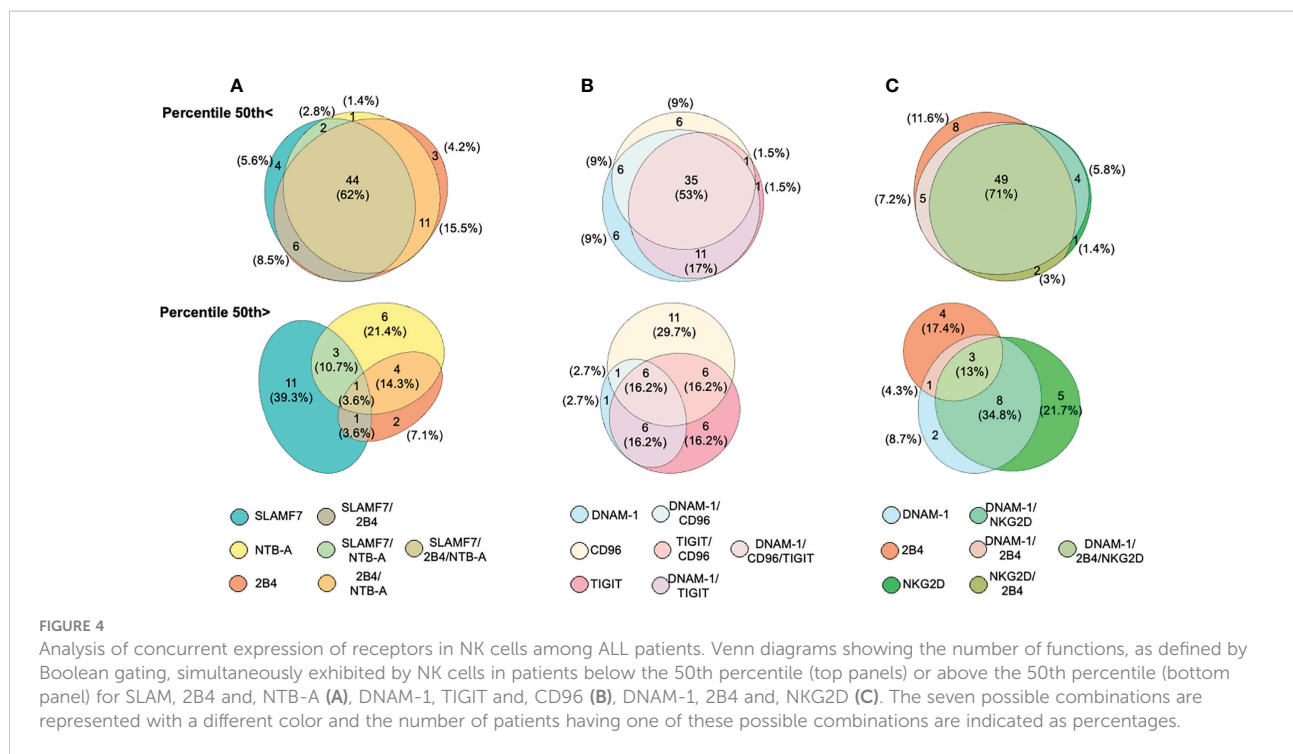


FIGURE 3

Percentages of NK cells expressing distinct inhibitory receptors on NK cells from healthy controls and ALL patients. (A) The frequencies of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>C14<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells expressing distinct inhibitory receptors were analyzed by flow cytometry in 72 ALL patients and 21 healthy controls. Vertical lines indicate standard deviation. The horizontal lines represents the mean value. (B) Representative FACS plots depict the percentage of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> expressing distinct inhibitory receptors on NK cells from healthy controls (n = 21) and ALL patients (n = 72). HC: healthy controls; ALL: Acute lymphoblastic leukemia patients. NS, Not significant.



that in 71% of ALL patients, NK cells displayed a concurrent decrease expression frequency for DNAM-1, 2B4 and, NKG2D (Figure 4C, top panel), whereas only 13% of ALL patients presented a normal concurrent expression for these activating receptors (Figure 4C, bottom panel). Therefore, these data suggest that among ALL patients, the percentages of NK cells with a decreased concomitant expression for various activating receptors either belonging to a single family or multiple families was dominant over NK cells displaying a significant reduction is just a single type of receptor.

## NK cells from patients with pediatric ALL display an abnormal differentiation phenotype in the mature NK-cell pool

Loss of NKG2A expression, accompanied by acquisition of CD57 and KIRs, has been shown to be useful in determining the differentiation status of NK cells (19–22). Using these markers, we investigated the relative impact of ALL on NKG2A/CD57-delineated NK cell subsets. Interestingly, relative to healthy donor controls, the percentage of NKG2A<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> (immature-like) NK cells were significantly increased ( $P=0.0242$ ), whereas NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> (mature) NK cells were significantly decreased ( $P=0.0474$ ), suggesting that patients with ALL exhibit defects in NK cell terminal differentiation (Figures 5A, B). Based on these findings, we decided to analyze the relative expression of activating and inhibitory receptors in the four major NK cell subsets distinguished by the differential expression of NKG2A

and CD57. As shown in Figure 5C, the downregulation of NKG2D, CD96, DNAM-1, SLAMF7, NTBA, and 2B4 was significant consistent through the four major subsets of the peripheral NK cell pool. These data suggest that irrespective of the heterogeneity of subsets observed in the NK cell pool, activating receptors are broadly modulated in pediatric ALL patients.

## NK cells from ALL patients exhibit an abnormal cytotoxicity

An impaired NK cell effector functions has been associated with a higher incidence of cancer including hematological malignancies (48, 49). However, there are few studies assessing the functional competence of NK cells in pediatric patients with ALL. Our previous work (19) and that published by Rouce and collaborators (17) has provided information on the state of NK cell responsiveness at moment of diagnosis. Since we found that the expression of multiple receptors was significantly affected in NK cells from patients compared with healthy controls, we decide to assess NK cell-mediated cytotoxicity through an activating receptor whose expression was not significantly different between patients and healthy controls, as is the case for CD16, the low affinity receptor for IgG. Therefore, we analyzed NK cell degranulation in reverse ADCC assays by using P815 cells supplemented with anti-CD16 mAbs. Our results showed that the NK degranulation, measured as the expression of CD107a at NK cell surface, was significantly

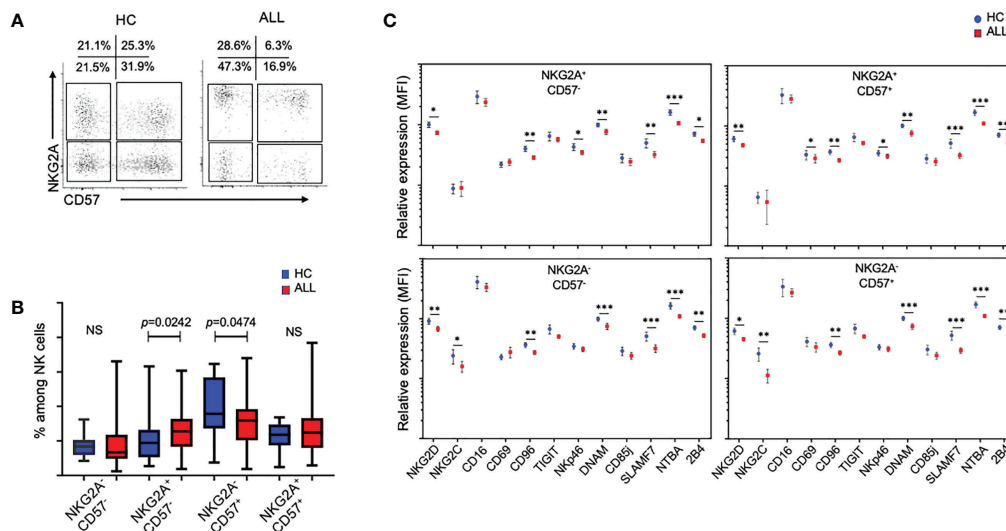


FIGURE 5

Analysis of the mature NK-cell pool from ALL patients and healthy controls. (A) Representative FACS plots of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>C14<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells at different stages of maturation according to the expression of NKG2A and CD57 from healthy controls and ALL patients. (B) Summary of data for frequencies of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>C14<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells according to the expression of NKG2A and CD57. Vertical lines indicate standard deviation. The horizontal lines represent the mean value. P values report significance according to U-Mann Whitney Test one-tail. HC, healthy controls; ALL, Acute lymphoblastic leukemia patients. (C) Summary of data for relative expression, represented as the mean fluorescence intensity (MFI), of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>C14<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells at different stages of maturation according to expression of NKG2A and CD57. The vertical lines indicate standard deviation. HC, healthy controls; ALL, Acute lymphoblastic leukemia patients. The horizontal lines represent the mean value. Results were considered significant at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ . NS, Not significant.

reduced when compared with healthy controls (Figures 6A, B). These results demonstrate that ADCC is also affected in NK cells from ALL pediatric patients. In addition, by Boolean analysis we evaluated the expression of various NK cell receptors in those patients that displayed an abnormal degranulation according to the percentile 50th value. Interestingly, we found that more than 50% of the patients with impaired degranulation displayed a concurrent decrease in the percentage of NK cells expressing three different types of receptors (Figure 6C).

## A decreased expression of activating receptors in NK cells is associated with acute lymphoblastic leukemia

By means of a logistic regression analysis, we evaluated a possible association between an abnormal NK cell phenotype, highlighted by a significant decrease in the relative frequencies and a downregulated expression of various activating receptors, with the probability of developing leukemia. To perform such analysis, the categorical variables, expressed as the percentage of NK cells expressing a given activating receptor or, as mean fluorescence intensity (MFI) for each receptor, were adjusted within the model of logistic regression. When the analysis was adjusted by sex and age, we observed that a higher percentage of NK cells expressing NKG2D was associated with a lower

probability of developing ALL (aOR= 0.23; 95% CI:0.08.-0.67). A similar trend was observed for DNAM-1 (aOR= 0.18; 95% CI: 0.06-0.56). In contrast to NKG2D, we also found that a higher expression density for DNAM-1 on NK cell surface was associated with lymphoblastic leukemia at the moment of diagnosis (aOR=0.30; 95% CI:0.10-0.89). Furthermore, our analysis showed that higher percentage of NK cells expressing 2B4, NTBA or SLAMF7, were also associated with a lower probability of developing ALL during childhood (Table 2). Finally, the logistic regression analysis also showed that an increase in the percentages of the two major NK cell subsets in peripheral blood (NK CD56<sup>dim</sup> and NK CD56<sup>bright</sup>) was associated with a lower probability of developing the disease. However, no association was identified for the relative frequencies of NK cells subsets distinguished by the differential expression of NKG2A and CD57 (Table 2). When the logistic regression analysis was adjusted by sex, age and infection, we found that a decrease in the percentage of DNAM-1<sup>+</sup>NK cells, 2B4<sup>+</sup>NK cells, NTBA<sup>+</sup>NK cells, and SLAMF7<sup>+</sup> NK cells, as well as a decrease in their expression levels on NK cells, were associated with lymphoblastic acute leukemia during childhood at the moment of ALL diagnosis (Table 2). Same results were obtained for the percentage of NK cells expressing NKG2D and percentages of CD56<sup>dim</sup> NK cells and CD56<sup>bright</sup> NK cells (Table 2). Notably, a decreased percentage of NKG2C<sup>+</sup> NK cell was significantly associated with acute lymphoblastic

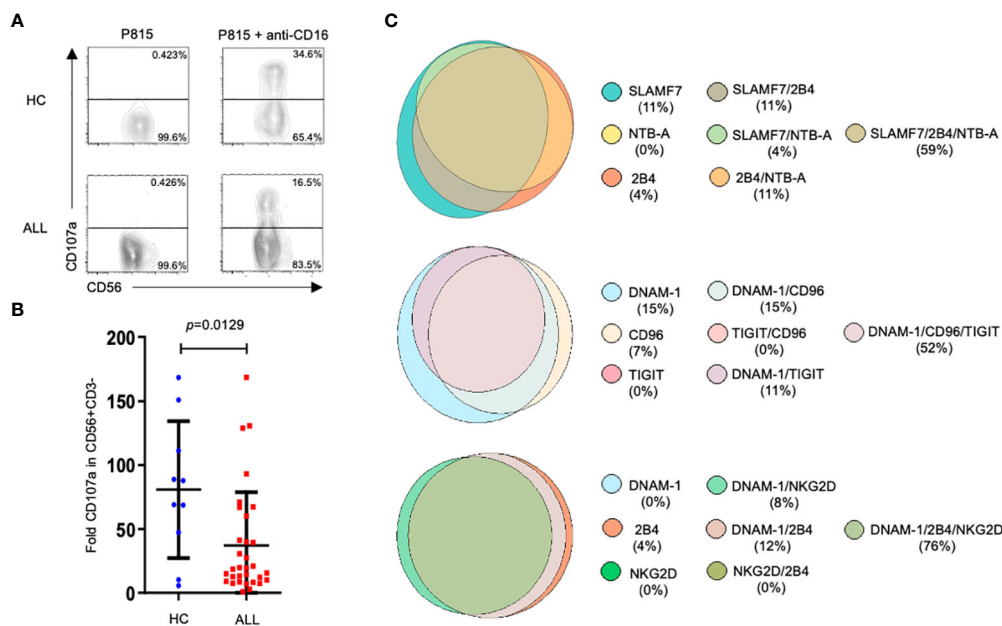


FIGURE 6

Degranulation assays in NK cells from ALL patients and healthy controls. Representative FACS plots depict NK cell response (CD107a degranulation) against P815 supplemented or not with anti-CD16 (clone 4G6). (A) PBMCs ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) were incubated with P815 cells ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) for 3 hours in a total volume of 200  $\mu\text{l}$  in a 96 well plate at  $37^\circ\text{C}$ . Degranulation was represented as the fold increase of CD107a on NK cell surface, which is the difference between the percentage of NK cells expressing CD107a at surface after stimulation with P815 cells supplemented with agonist mAb, and the percentage of NK cells expressing CD107a at NK cell surface after incubation with P815 cells with no agonist mAb. NK cell degranulation assays were performed in 32 ALL patients and 10 age-matched controls. (B) Summary of data and statistic from 32 ALL patients and 10 age-matched controls. (C) Venn diagrams showing the number of functions as defined by Boolean gating. The diagrams show the concurrent expression of various NK cell receptors in those patients that displayed degranulation values under the 50th percentile.

leukemia when the categorical variable was adjusted by sex, age and allergies history (Table 2).

Finally, associations between immunoreceptors and clinical characteristics of patient with ALL were also explored. Lower percentages of CD69<sup>+</sup> NK cells (OR=0.32; 95% CI:0.12-0.87) and 2B4<sup>+</sup> NK cells (OR=0.20; 95% CI:0.04-0.09) from patients older than 10-year-old were associated with higher risk of developing leukemia. In addition, an association between a higher percentage of 2B4<sup>+</sup> NK cells (OR=5.69; 95% CI:1.16-27.92) with a lower risk of developing leukemia was observed only for male patients. A similar result was obtained for a higher percentage of NK cells expressing DNAM-1 (OR=4.05; 95% CI:1.05-15.59), but only in patients suffering from allergies. No other associations were noticed (Supplementary Table 2).

## Discussion

A delicate balance between activation and inhibitory signals largely determines whether an NK cell will kill or not the target cell. Disruption of this equilibrium by altering the expression of activating and inhibitory receptors, results in an abnormal NK cell function that may contribute to cancer. Here, we analyzed

the expression of various activating and inhibitory NK cell receptors in pediatric ALL patients at diagnosis.

The role of NCR receptors in the recognition and killing of cancer cells has been well documented (17, 50–53). Consistent with prior findings, we observed that the frequencies of NKp46<sup>+</sup> NK cells at diagnosis were diminished in ALL patients compared to healthy controls. Our study did not involve the analysis of other members of the NCR family such as NKp44 or NKp30, however their expression were reported to be normal in pediatric patients with ALL (17). Since a distinct non-overlapping function has been attributed to these receptors (54), we cannot exclude the possibility of an abnormal expression for such receptors in our patients cohort. NKG2C is involved in the recognition of HLA-E molecules (55–57). In this study we found that the percentage of NKG2C<sup>+</sup>NK cells and overall expression of NKG2C on NK cells were significantly reduced in ALL patients. The recognition of HLA-E by NK cells may represent a mechanism for immunosurveillance of normal biosynthesis of HLA class I molecules, a process dampened in certain virus-infected or cancer cells including leukemia (58). Thus, our results suggest that NKG2C may play an important role in the recognition and killing of leukemic cells, especially when the dominant contribution of inhibitory receptors, such as NKG2A, falls beneath a critical

TABLE 2 Logistic regression analyses for the association between NK cells features (as categorical variables) and the risk of acute lymphoblastic leukemias in Mexican children.

NK cells features	OR	Sex and age	Sex, age and infections	Sex, age and allergies
		aOR (95% CI)	aOR (95% CI)	aOR (95% CI)
<b>MIF Immunoreceptors <math>\geq p50</math><sup>1</sup></b>				
NKG2D	0.47 (0.17-1.27)	0.42 (0.15-1.21)	0.43 (0.15-1.23)	0.51 (0.17-1.50)
NKG2A	1.65 (0.61-4.50)	1.64 (0.60-4.48)	1.60 (0.58-4.43)	1.82 (0.64-5.17)
NKG2C	0.54 (0.20-1.46)	0.53 (0.19-1.47)	0.52 (0.19-1.44)	0.45 (0.16-1.31)
NKP46	0.54 (0.20-1.46)	0.52 (0.19-1.44)	0.53 (0.19-1.45)	0.53 (0.19-1.50)
<b>CD69</b>	0.37 (0.13-1.03)	<b>0.32 (0.11-0.95)*</b>	<b>0.29 (0.10-0.90)*</b>	<b>0.27 (0.09-0.85)*</b>
TIGIT	0.50 (0.18-1.36)	0.46 (0.16-1.30)	0.46 (0.16-1.30)	0.54 (0.18-1.58)
CD96	0.40 (0.15-1.10)	0.38 (0.13-1.08)	0.38 (0.13-1.11)	0.42 (0.14-1.24)
<b>DNAM</b>	<b>0.34 (0.12-0.95)*</b>	<b>0.30 (0.10-0.89)*</b>	<b>0.29 (0.10-0.86)*</b>	<b>0.31 (0.10-0.94)*</b>
<b>CD57</b>	<b>0.32 (0.11-0.88)*</b>	<b>0.31 (0.11-0.88)*</b>	<b>0.32 (0.11-0.89)*</b>	<b>0.34 (0.12-0.99)*</b>
CD85j	0.54 (0.20-1.46)	0.48 (0.17-1.40)	0.49 (0.17-1.44)	0.41 (0.13-1.25)
<b>CRACC</b>	<b>0.29 (0.10-0.82)*</b>	<b>0.28 (0.10-0.80)*</b>	<b>0.28 (0.10-0.79)*</b>	<b>0.31 (0.11-0.91)*</b>
<b>2B4</b>	<b>0.32 (0.11-0.88)*</b>	<b>0.30 (0.10-0.85)*</b>	<b>0.30 (0.10-0.85)*</b>	<b>0.33 (0.11-0.96)*</b>
<b>NTBA</b>	<b>0.26 (0.09-0.75)*</b>	<b>0.26 (0.09-0.75)*</b>	<b>0.27 (0.09-0.76)*</b>	<b>0.32 (0.11-0.96)*</b>
CD16	0.80 (0.30-2.15)	0.80 (0.29-2.19)	0.81 (0.30-2.21)	0.99 (0.35-2.85)
<b>% NK positive for immunoreceptors <math>\geq p50</math><sup>2</sup></b>				
<b>NKG2D</b>	<b>0.26 (0.09-0.72)*</b>	<b>0.23 (0.08-0.67)**</b>	<b>0.23 (0.08-0.67)**</b>	<b>0.26 (0.09-0.81)*</b>
NKG2A	1.71 (0.64-4.57)	1.73 (0.64-4.66)	1.74 (0.64-4.70)	2.17 (0.76-6.22)
<b>NKG2C</b>	0.37 (0.14-1.01)	0.37 (0.13-1.00)	0.37 (0.13-1.01)	<b>0.30 (0.10-0.88)*</b>
NKP46	0.51 (0.19-1.37)	0.48 (0.17-1.34)	0.48 (0.17-1.33)	0.54 (0.19-1.55)
CD69	0.77 (0.29-2.04)	0.74 (0.27-2.05)	0.72 (0.26-2.03)	0.79 (0.28-2.24)
TIGIT	0.45 (0.17-1.22)	0.43 (0.16-1.18)	0.43 (0.16-1.19)	0.43 (0.15-1.22)
CD96	0.45 (0.17-1.22)	0.43 (0.16-1.18)	0.43 (0.16-1.18)	0.45 (0.16-1.27)
<b>DNAM</b>	<b>0.22 (0.08-0.62)**</b>	<b>0.18 (0.06-0.56)**</b>	<b>0.18 (0.06-0.56)**</b>	<b>0.22 (0.07-0.72)*</b>
CD57	0.43 (0.16-1.15)	0.43 (0.16-1.15)	0.43 (0.16-1.15)	0.45 (0.16-1.25)
CD85	0.86 (0.32-2.28)	0.82 (0.30-2.26)	0.82 (0.30-2.27)	0.77 (0.27-2.17)
<b>CRACC</b>	<b>0.26 (0.09-0.72)*</b>	<b>0.25 (0.09-0.70)**</b>	<b>0.24 (0.08-0.68)**</b>	<b>0.25 (0.09-0.73)*</b>
<b>2B4</b>	<b>0.20 (0.07-0.57)**</b>	<b>0.13 (0.04-0.46)**</b>	<b>0.13 (0.04-0.46)**</b>	<b>0.14 (0.04-0.51)**</b>
<b>NTBA</b>	<b>0.22 (0.08-0.62)**</b>	<b>0.21 (0.07-0.60)**</b>	<b>0.21 (0.07-0.60)**</b>	<b>0.24 (0.08-0.73)*</b>
CD16 <sup>1</sup>	0.61 (0.23-1.66)	0.61 (0.23-1.67)	0.61 (0.23-1.67)	0.73 (0.26-2.07)
<b>% Subpopulations <math>\geq p50</math></b>				
<b>NK Dim<sup>2</sup></b>	<b>0.05 (0.01-0.20)***</b>	<b>0.05 (0.01-0.18)***</b>	<b>0.04 (0.01-0.16)***</b>	<b>0.04 (0.01-0.18)***</b>
<b>NK Bright<sup>2</sup></b>	<b>0.27 (0.09-0.75)*</b>	<b>0.25 (0.09-0.72)*</b>	<b>0.25 (0.09-0.72)*</b>	<b>0.28 (0.09-0.83)*</b>
<b>NK Total<sup>2</sup></b>	<b>0.10 (0.03-0.33)***</b>	<b>0.08 (0.02-0.29)***</b>	<b>0.07 (0.02-0.26)***</b>	<b>0.07 (0.02-0.29)***</b>
NKG2A- CD57 <sup>1</sup>	0.61 (0.23-1.66)	0.60 (0.22-1.64)	0.60 (0.22-1.65)	0.64 (0.23-1.80)
NKG2A+ CD57- <sup>1</sup>	1.54 (0.57-4.19)	1.53 (0.56-4.17)	1.56 (0.57-4.28)	1.49 (0.53-4.16)
NKG2A+ CD57+ <sup>1</sup>	1.03 (0.38-2.79)	1.03 (0.38-2.78)	1.03 (0.38-2.79)	1.13 (0.40-3.17)
NKG2A- CD57+ <sup>1</sup>	0.61 (0.23-1.66)	0.61 (0.22-1.67)	0.61 (0.22-1.68)	0.55 (0.19-1.57)

ALL: acute lymphoblastic leukemia; OR: odds ratio; aOR: adjusted odds ratio; MIF: medium intensity of fluorescence; CI: confidence interval;  $\geq p50$ : above 50<sup>th</sup> percentile; NK: Natural killer. <sup>1</sup> 62 cases and 21 controls; <sup>2</sup> 72 cases and 21 controls. \*p<0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001. Bold values represent the statistically significant results.

threshold (58, 59). NKG2D is a NK cell receptor, which ligands represented by ULBPs and MICA/B are upregulated in cancers cells (60–62). In contrast to the study by Rouce and colleagues (17), we found a significant reduction in the percentage of NK cells expressing NKG2D in ALL patients when compared with healthy controls. A significant downregulation in the expression of NKG2D on NK cell surface was also noticed. A possible explanation to this

discrepancy may be due to differences in the percentages of patients diagnosed with low and high risk ALL. In our study, 37 (51.4%) patients were diagnosed with high risk leukemia compared with the 32% reported by Rouce. However, further studies will be useful to precise these findings. DNAM-1 is an activating receptor that upon ligation with PVR and Nectin-2, triggers NK cell-mediated cytotoxicity against various cancer cells. Here, we noticed a

significant reduction in the percentage of DNAM+ NK cells and overall expression of DNAM. Our data support the notion that DNAM-1 plays an important role in the recognition and killing of leukemic cells. Because TIGIT competes with DNAM-1 for binding to PVR (CD155), a downregulation of DNAM-1 in NK cells may favor inhibitory signaling, even if the expression levels of TIGIT remain relatively unchanged, as observed in our patient cohort (63, 64). By contrast, CD96 also represents a competing receptor for PVR, which expression pattern in lymphoid cells is similar but not identical to TIGIT (65–67). Unlike TIGIT, we observed that the percentage of CD96<sup>+</sup> NK cells and its overall expression were significantly reduced in patients with ALL. Whereas the functional relevance of CD96 ligation by PVR needs to be determined, our results suggest that CD96 may play an important role in the recognition of ALL blast and contribute to modulate the delicate balance established between the DNAM-1-TIGIT-CD96 axis. The expression of SLAM family receptors on hematopoietic target cells make them highly sensitive to NK cell-mediated cytotoxicity when compared with target cells lacking expression of SLAM receptors (68, 69). We found that the proportions of NK cells expressing 2B4, NTBA or SLAM were all significantly decreased in ALL patients when compared with healthy controls. Moreover, a downregulation in the expression of these SLAM receptors was also observed. To our knowledge, this is the first study documenting an aberrant expression of SLAM family receptors in pediatric patients with ALL.

Boolean analysis showed that a significant majority of ALL patients displayed a concurrent decrease in the expression percentage for at least two different types of receptors. Moreover, some studies demonstrated that among ALL patients, NK cells with a concurrent normal expression for more than one single type of receptor is the less common phenotype. To our knowledge, this is the first report showing an abnormal NK cell phenotype highlighted by the concurrent decreased expression in at least more than one single type of activating receptor in children with ALL at diagnosis. Whether these phenotypes could be associated not only with the initial presentation of ALL but also with the prognosis of the disease should be investigated in future studies.

The gradual loss of NKG2A expression and the sequential acquisition of CD57 has been associated to different differentiation stages (19–22). We observed that the percentages of NKG2A<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> NK cells were significantly increased in patients with ALL when compared to healthy controls, whereas a significant decrease in the percentages of NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> NK cells was also observed. Our data suggest that lymphoblastic leukemia may impact on different aspects of NK cell biology including differentiation.

A failure in the NK cell-mediated natural cytotoxicity has been shown in pediatric patients with ALL (17, 19), however, the molecular mechanism behind this abnormal effector function remains elusive. Since an abnormal expression of activating and inhibitory receptors has been also documented in ALL, a possible explanation for the impaired NK cell cytotoxicity in such patients, may be the consequence of an altered balance of activating or inhibitory signaling. In order to bypass the influence of this

abnormal expression of activating receptors on NK cell function, we performed NK cell degranulation assays in response to an activating receptor whose expression on NK cell surface remains unaltered between patients and healthy controls as turn to be the case for CD16. Our results showed that despite a normal expression of CD16 in NK cells from ALL patients, we observed a significant reduction in the ability of NK cells to degranulate in response to P815 cells supplemented with anti-CD16. Moreover, more than 50 percent of those patients with a poor ability to degranulate also displayed a simultaneous decrease in the percentage of NK cells expressing various activating receptors. These results suggest that in addition to an abnormal expression of activating receptors, other factors intrinsic to the cytolytic machinery may be also compromised in NK cells from pediatric patients with ALL.

A logistic regression analysis was conducted to identify associations between an altered phenotype of NK cells and the probability of developing acute lymphoblastic leukemia during childhood. Our analysis indicates that there is a significant association between a reduction, either in the percentage or density expression of a determined NK cell receptor and lymphoblastic leukemia during childhood at moment of diagnosis. This association was found for the activating receptors NKp46, NKG2C, NKG2D, DNAM-1, 2B4, NTBA, and SLAMF7. Our results confirm that a downregulation in the expression of activating NK cell receptors may contribute with an inefficient killing of leukemic cells, a phenomenon also observed in other hematological malignancies including acute myeloid leukemia, where a diminished expression of NCRs, DNAM and NKG2D has been suggested to explain the resistance of myeloid leukemias to NK-mediated lysis (70).

A conclusion from this study is that a significant reduction in the expression of activating receptors was not limited to only one single type of receptor or family of activating receptors. Instead, we observed a concurrent downregulation of multiple types of receptors belonging to different families. Moreover, our data also suggest that an overall reduction of percentages of NK cells expressing a specific type of activating receptor and its downregulation is significantly associated to acute lymphoblastic leukemia during childhood. Therefore, a normal expression of activating receptors in NK cells may be important to display an efficient cytotoxicity towards lymphoblastic acute leukemia.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Author contributions

Contribution: LV-V and JCN-E performed research, performed statistical analysis, analyzed and interpreted data; JS-H performed research and performed statistical analysis; AM-

S, MLP-S, EJ-H, JAM-T, MAC-M, JF-L, RA-S, FGM-R, JGP-G, DAD-R, JRT-N, RME-E, BC-H, LVF-V, LEM-P, CA-H, RR-C, KAS-L, FM-L, JAP-G, MMV-A, AM-R, AA-D, JDS-J, AG-S, AJG-V, MM-R, GAH-E, OAS-R, and HR-V collected data; IM-H analyzed and interpreted data; SJ-M and AH-M collected data and performed statistical analysis; IM-D, JDW, KWH, and KPM provided critical review and assisted in writing the manuscript; JMM-A and MEC-M analyzed and interpreted data, wrote the manuscript and designed research. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

MEC-M is supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (FORDECYT-PRONACES-377883-2020). JMM-A is supported by FONCICYT/37/2018, FIS/IMSS/PROT/1782, and CB 2015-258042-M. JN-E is supported by FORDECYT/303019/2019.

## Acknowledgments

The authors want to acknowledge to Erika Melchy-Perez for her technical assistance in Flow Cytometry.

## Conflict of interest

Authors JDW, KWH, and KPM are employed by GlaxoSmithKline.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* (2018) 18(8):471–84. doi: 10.1038/s41568-018-0015-6
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* (2002) 3(11):991–8. doi: 10.1038/ni1102-991
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity* (2004) 21(2):137–48. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.017
- Pastorczyk A, Domka K, Fidyk K, Poprzeczko M, Firczuk M. Mechanisms of immune evasion in acute lymphoblastic leukemia. *Cancers (Basel)* (2021) 13(7):1–25. doi: 10.3390/cancers13071536
- Chiosso L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* (2018) 18(11):671–88. doi: 10.1038/s41577-018-0061-z
- Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: Evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* (2009) 113(13):3119–29. doi: 10.1182/blood-2008-06-164103
- Locatelli F, Pende D, Maccario R, Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of high-risk leukemias: how NK cells make the difference. *Clin Immunol* (2009) 133(2):171–8. doi: 10.1016/j.clim.2009.04.009
- Locatelli F, Pende D, Mingari MC, Bertina A, Falco M, Moretta A, et al. Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: Role of alloreactive NK cells. *Front Immunol* (2013) 4:15. doi: 10.3389/fimmu.2013.00015
- Velardi A, Ruggeri L, Alessandro, Moretta, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol* (2002) 23(9):438–44. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02284-6
- Fehniger TA, Cooper MA. Harnessing NK cell memory for cancer immunotherapy. *Trends Immunol* (2016) 37(12):877–88. doi: 10.1016/j.it.2016.09.005
- Bi J, Tian Z. NK cell dysfunction and checkpoint immunotherapy. *Front Immunol* (2019) 10:1999. doi: 10.3389/fimmu.2019.01999
- Daher M, Rezvani K. The evolution of NK cell immunotherapy for hematologic malignancies: A historical and contemporary perspective. *Semin Hematol* (2020) 57(4):165–6. doi: 10.1053/j.seminhematol.2020.11.005

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.1023510/full#supplementary-material>

### SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Percentages of NK cells CD56 dim and CD56 bright in healthy controls and ALL patients. (A) The percentages of total NK cells and NK cells CD56 dim were analyzed by flow cytometry in 21 healthy controls and 71 ALL patients. (B) The percentages of NK cells CD56 bright were analyzed by flow cytometry in 21 healthy controls and 71 ALL patients. Vertical lines indicate standard deviation. The horizontal lines represents the mean value. P values reports significance according to U-Mann Whitney Test one-tail. HC: healthy controls; ALL: Acute lymphoblastic leukemia patients.

### SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Percentages of CD16<sup>+</sup>; CD69<sup>+</sup>; CD57<sup>+</sup> NK cells in healthy controls and ALL patients. (A) The frequencies of CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells expressing CD16, CD69 or, CD57 were analyzed by flow cytometry in 72 ALL patients and 21 healthy controls. Vertical lines indicate standard deviation. The horizontal lines represents the mean value. P values reports significance according to U-Mann Whitney Test one-tail. HC: healthy controls; ALL: Acute lymphoblastic leukemia patients. (B) Representative FACS plots depict the percentages of NK cells expressing CD16, CD69 or, CD57 from healthy controls (n=21) and ALL patients (n=72). HC: healthy controls; ALL: Acute lymphoblastic leukemia patients.



13. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* (2008) 27(45):5932–43. doi: 10.1038/onc.2008.267
14. Romanski A, Bug G, Becker S, Kampfmann M, Seifried E, Hoelzer D, et al. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* (2005) 33(3):344–52. doi: 10.1016/j.exphem.2004.11.006
15. Reusing SB, Manser AR, Enczmann J, Mulder A, Claas FH, Carrington M, et al. Selective downregulation of HLA-c and HLA-e in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* (2016) 174(3):477–80. doi: 10.1111/bjh.13777
16. Makanga DR, Da Rin de Lorenzo F, David G, Willem C, Dubreuil L, Legrand N, et al. Genetic and molecular basis of heterogeneous NK cell responses against acute leukemia. *Cancers (Basel)* (2020) 12(7):1–18. doi: 10.3390/cancers12071927
17. Rouce RH, Shaim H, Sekine T, Weber G, Ballard B, Ku S, et al. The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood b-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2016) 30(4):800–11. doi: 10.1038/leu.2015.327
18. Parrado A, Casares S, Rodriguez-Fernandez JM. Natural killer cytotoxicity and lymphocyte subpopulations in patients with acute leukemia. *Leuk Res* (1994) 18(3):191–7. doi: 10.1016/0145-2126(94)90114-7
19. Valenzuela-Vázquez L, Nunez-Enriquez JC, Sanchez-Herrera J, Jimenez-Hernandez E, Martin-Trejo JA, Espinoza-Hernandez LE, et al. Functional characterization of NK cells in Mexican pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: Report from the Mexican interinstitutional group for the identification of the causes of childhood leukemia. *PLoS One* (2020) 15(1):e0227314. doi: 10.1371/journal.pone.0227314
20. Liu S, Dhar P, Wu JD. NK cell plasticity in cancer. *J Clin Med* (2019) 8(9):1–17. doi: 10.3390/jcm8091492
21. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* (2005) 23:225–74. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
22. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:227–58. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005
23. Giuliani M, Poggi A. Checkpoint inhibitors and engineered cells: New weapons for natural killer cell arsenal against hematological malignancies. *Cells* (2020) 9(7). doi: 10.3390/cells9071578
24. Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, et al. NKP46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. correlation between surface density of NKP46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* (1999) 29(5):1656–66.
25. Thielens A, Vivier E, Romagne F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* (2012) 24(2):239–45. doi: 10.1016/j.coi.2012.01.001
26. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* (2005) 5(3):201–14. doi: 10.1038/nri1570
27. Muntasell A, Ochoa MC, Cordeiro L, Berraondo P, Lopez-Diaz de Cerio A, Cabo M, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* (2017) 45:73–81. doi: 10.1016/j.coi.2017.01.003
28. Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, Vuletic A, Mirjagic Martinovic K, Radenkovic S, et al. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. *Immunol Res* (2012) 52(1-2):139–56. doi: 10.1007/s12026-012-8285-7
29. Molgora M, Cortez VS, Colonna M. Killing the invaders: NK cell impact in tumors and anti-tumor therapy. *Cancers (Basel)* (2021) 13(4). doi: 10.3390/cancers13040595
30. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* (2002) 99(10):3661–7. doi: 10.1182/blood.V99.10.3661
31. Costello RT, Fauriat C, Sivori S, Marcenaro E, Olive D. NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends Immunol* (2004) 25(6):328–33. doi: 10.1016/j.it.2004.04.005
32. Sanchez CJ, Le Treut T, Boehrer A, Knoblauch B, Imbert J, Olive D, et al. Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60(1):1–13. doi: 10.1007/s00262-010-0898-x
33. Viel S, Charrier E, Marçais A, Rouzère P, Bienvenu J, Karlin L, et al. Monitoring NK cell activity in patients with hematological malignancies. *Oncoimmunology* (2013) 2(9):e26011. doi: 10.4161/onci.26011
34. Zhang C, Liu Y. Targeting NK cell checkpoint receptors or molecules for cancer immunotherapy. *Front Immunol* (2020) 11:1295. doi: 10.3389/fimmu.2020.01295
35. Rudant J, Lightfoot T, Urayama KY, Petridou E, Dockerty JD, Magnani C, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia and indicators of early immune stimulation: a childhood leukemia international consortium study. *Am J Epidemiol* (2015) 181(8):549–62. doi: 10.1093/aje/kwu298
36. Nunez-Enriquez JC, Fajardo-Gutierrez A, Buchan-Duran EP, Bernaldez-Rios R, Medina-Sanson A, Jimenez-Hernandez E, et al. Allergy and acute leukaemia in children with down syndrome: a population study. report from the Mexican inter-institutional group for the identification of the causes of childhood leukaemia. *Br J Cancer* (2013) 108(11):2334–8.
37. Bryceson YT, Fauriat C, Nunes JM, Wood SM, Bjorkstrom NK, Long EO, et al. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol Biol* (2010) 612:335–52. doi: 10.1007/978-1-60761-362-6\_23
38. Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, Gilmour KC, Ufheil H, Vraetz T, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* (2012) 119(12):2754–63. doi: 10.1182/blood-2011-08-374199
39. Arellano-Galindo J, Barrera AP, Jimenez-Hernandez E, Zavala-Vega S, Campos-Valdez G, Xicohtencatl-Cortes J, et al. Infectious agents in childhood leukemia. *Arch Med Res* (2017) 48(4):305–13. doi: 10.1016/j.armed.2017.09.001
40. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* (2003) 101(7):2711–20. doi: 10.1182/blood-2002-07-2103
41. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, et al. The cytolytic enzymes granzyme a, granzyme b, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* (2009) 85(1):88–97.
42. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* (2010) 116(19):3865–74. doi: 10.1182/blood-2010-04-282301
43. Boles KS, Vermi W, Facchetti F, Fuchs A, Wilson TJ, Diacovo TG, et al. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol* (2009) 39(3):695–703. doi: 10.1002/eji.200839116
44. Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(42):17858–63. doi: 10.1073/pnas.0903474106
45. Joller N, Hafler JP, Brynedal B, Kassam N, Spoerl S, Levin SD, et al. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol* (2011) 186(3):1338–42. doi: 10.4049/jimmunol.1003081
46. Sanchez-Correa B, Valhondo I, Hassouneh F, Lopez-Sejas N, Pera A, Bergua JM, et al. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE axis: Novel immune checkpoints for natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* (2019) 11(6):1–15. doi: 10.3390/cancers11060877
47. Colonna M, Nakajima H, Navarro F, Lopez-Botet M. A novel family of ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol* (1999) 66(3):375–81. doi: 10.1002/jlb.66.3.375
48. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* (2012) 23 Suppl 8:viii6–9. doi: 10.1093/annonc/mds256
49. Baier C, Fino A, Sanchez C, Farnault L, Rihet P, Kahn-Perles B, et al. Natural killer cells modulation in hematological malignancies. *Front Immunol* (2013) 4:459. doi: 10.3389/fimmu.2013.00459
50. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* (2000) 21(5):228–34. doi: 10.1016/S0167-5699(00)01596-6
51. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, et al. Molecular cloning of NKP46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* (1998) 188(5):953–60. doi: 10.1084/jem.188.5.953
52. Stringaris K, Sekine T, Khoder A, Alsuliman A, Razzaghi B, Sargeant R, et al. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* (2014) 99(5):836–47. doi: 10.3324/haematol.2013.087536
53. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A* (2013) 83(8):702–13. doi: 10.1002/cyto.a.22302
54. El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, et al. Critical and differential roles of NKP46- and NKP30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* (2008) 181(5):3009–17. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3009
55. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-e binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, b and c. *Nature* (1998) 391(6669):795–9. doi: 10.1038/35869
56. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-e complexed with HLA class I

signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* (1998) 187(5):813–8. doi: 10.1084/jem.187.5.813

57. Lopez-Botet M, Muntasell A, Vilches C. The CD94/NKG2C+ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Semin Immunol* (2014) 26(2):145–51. doi: 10.1016/j.smim.2014.03.002

58. Lopez-Botet M, Bellon T, Llano M, Navarro F, Garcia P, de Miguel M. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum Immunol* (2000) 61(1):7–17. doi: 10.1016/S0198-8859(99)00161-5

59. Morandi F, Pistoia V. Inter actions between HLA-G and HLA-e in physiological and pathological conditions. *Front Immunol* (2014) 5:394. doi: 10.3389/fimmu.2014.00394

60. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* (1999) 285(5428):727–9. doi: 10.1126/science.285.5428.727

61. Raulat DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:413–41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951

62. Lanier LL. NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunol Res* (2015) 3(6):575–82. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0098

63. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell* (2014) 26(6):923–37. doi: 10.1016/j.ccell.2014.10.018

64. Chauvin JM, Ka M, Pagliano O, Menna C, Ding Q, DeBlasio R, et al. IL15 stimulation with TIGIT blockade reverses CD155-mediated NK-cell dysfunction in melanoma. *Clin Cancer Res* (2020) 26(20):5520–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0575

65. Wang PL, O'Farrell S, Clayberger C, Krensky AM. Identification and molecular cloning of tactile, a novel human T cell activation antigen that is a member of the ig gene superfamily. *J Immunol* (1992) 148(8):2600–8.

66. Fuchs A, Cella M, Giuriso E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* (2004) 172(7):3994–8. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.3994

67. Lepletier A, Lutzky VP, Mittal D, Stannard K, Watkins TS, Ratnatunga CN, et al. The immune checkpoint CD96 defines a distinct lymphocyte phenotype and is highly expressed on tumor-infiltrating T cells. *Immunol Cell Biol* (2019) 97(2):152–64. doi: 10.1111/imcb.12205

68. Cruz-Munoz ME, Valenzuela-Vazquez L, Sanchez-Herrera J, Santa-Olalla Tapia J. From the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance. *J Leukoc Biol* (2019) 105(5):955–71. doi: 10.1002/JLB.MR0618-224RR

69. Dong Z, Cruz-Munoz ME, Zhong MC, Chen R, Latour S, Veillette A. Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nat Immunol* (2009) 10(9):973–80. doi: 10.1038/ni.1763

70. Farnault L, Sanchez C, Baier C, Le Treut T, Costello RT. Hematological malignancies escape from NK cell innate immune surveillance: mechanisms and therapeutic implications. *Clin Dev Immunol* (2012) 2012:421702. doi: 10.1155/2012/421702

#### COPYRIGHT

© 2022 Valenzuela-Vázquez, Nuñez-Enriquez, Sánchez-Herrera, Medina-Sanson, Pérez-Saldivar, Jiménez-Hernández, Martiín-Trejo, Del Campo-Martínez, Flores-Lujano, Amador-Sánchez, Mora-Ríos, Peñaloza-González, Duarte-Rodríguez, Torres-Nava, Espinosa-Elizondo, Cortés-Herrera, Flores-Villegas, Merino-Pasaye, Almeida-Hernández, Ramírez-Colorado, Solís-Labastida, Medrano-López, Pérez-Gómez, Velázquez-Aviña, Martínez-Ríos, Aguilar-De los Santos, Santillán-Juárez, Gurrola-Silva, García-Velázquez, Mata-Rocha, Hernández-Echáurregui, Sepúlveda-Robles, Rosas-Vargas, Mancilla-Herrera, Jimenez-Morales, Hidalgo-Miranda, Martinez-Duncker, Waight, Hance, Madauss, Mejía-Aranguré and Cruz-Munoz. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas



Cuernavaca, Mor., a \_19\_ de \_noviembre\_ de 2023

**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO  
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: *Caracterización fenotípica y funcional de células NK en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda: un estudio multicéntrico*, que presenta la alumna Lucero Valenzuela Vázquez (10024363) para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Director de tesis: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz  
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM - UAEM	APROBADO	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC - UAEM	APROBADO	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM - UAEM	APROBADO	
Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré INMEGEN -UNAM	APROBADO	
Dr. José Luis Montiel Hernández FF - UAEM	APROBADO	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC - UAEM	APROBADO	
Dr. Ismael Mancilla Herrera INPer - Isidro Espinosa de los Reyes	APROBADO	

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2023-11-19 11:12:12 | Firmante**

J5+n93+k0zbXG6ff8t1vdDECPqQM/AZyHCOAUs1TjYivDa/gJKZVQ1MHKhtxli2vkQMgJA2rq588kOH8UFbPzRkhlEqMEsC2Dhv9wVtUcpRtxfd/m66Tkoy8gDv2pmAFw++oZzn/qXR0o97w39ZxchZIZhSFvoE4AVxBF+vCgJT27pwOWeLeXbP79e6Z5r+mcOBjVwXJR3hO0fIgcVzV2chiwr4KoH7XukukwzyY+jflmo9ZVtj7ZuB8l8zvlwHsqf9aT+Xv3kCOKDaT4p9oJY6VCyTHvmwOyxKNybEaXUfIbdSOAbvWNjplVWFpCheXKh/sdPDx5tBo4Opw==

**IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2023-11-19 11:14:33 | Firmante**

DZ+IQcGC+zKzBY0b6kSQ+DdpnSciTU4hwY95uU1d6XLgSDxil9CdaGi6du0qvw4r419tEAzFBvnpZ1yYkLtnxtjZtK9UhhKj1hUd7nQGUCfZwZYVcf4Fh+h7xT+w7rf1YJgEHWKIBQzhlGILRmLQ8/Pb6g4KX1BC591SZipWw9PU/cAew4dmBdVuOhpnbxneSt/Yc6VZAwuQo6ncC1H7qtr11Fqdo3PnDb+IdYzyBBEovG7UIWBALG0brw/1g0Z5P7DSMVk+4VCulq9Q3NBF0f8FyyMtqzqbphDGCn5B1VMNpG7akyJiZzHed5NXkodaipKIG1xouGN2bEUag==

**MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2023-11-19 13:21:39 | Firmante**

z+1Z2nMd1Go4MMBGDxj1MuBFqCSJXcGfYSBvToQ0VsHk2vaCaABPDomVFP4SvVZOJnf52d9bHqdB9p8RTwMt4XXDxvQMhVObEVZsccNarFdaAJgLvwdi9hF5VNH+bOpsRmnP9IP2NQ0OoNWRnr6ihADKtVppsumcTdoe04PushXld803qjBRWQftGVDrRX+fHmJs4M4SaYDxicuQfbqv+f3kLQRVAC1wHGhRNz6hVKEbSN2N6f7AfKwblBgW5iaWucJQ18XEsGMmumguVR8FpmvrgUUIBrTgNdU56lxK1kExLMh+orDFxgLWjHHRlRNeaB9uQCjJ2uSWOw==

**FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2023-11-19 14:47:41 | Firmante**

O6g9EW7U3irBoalNva1Vwx4rnsOLzndRvNbdxPrjefbyAZXn/YUrP9P0FTF2wyITReaQxjZl+j0ER1bHe7T3vznS65Ynzp4B69zGhgRHcgO0jp3bqxy/IntKWMkLqt36LDoqk4EdNHmpPSGYp6ktBSXMy/62OaQYt5bo5CUct0B/BDhKpfnWYWF0jwpK07Ewz3AZKTLpbJpuHPfsZQ6O8Hlyq44aEaCPMmJ+VsrYX4enJJAa2Romi+GkRwrDpdfGUywh+etPqD DgF1V7x0Z5HrW4+LL7P46QnF4GDPDF3RRF0uE/q6KUwYQI8ic3BaT0nC+Xhk8nXOsfJeJw==

**JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2023-11-19 18:19:10 | Firmante**

OQDEF877BP8mo9pRRIDO+z14/otg+jSQcHqYEQ6VPYKOazwGFP3oCtThtA5lv97fhgZ+v7kRiV2Q5nWw888FY2khXYdlW6sEzBpBPF6R4H3vfu5rKe/Gb9PBcBHycM8sF+Mp3SkW6HWBB9PcfSyOaIE+6TrYr86A15vKqsltBBHWybgkQU5Ophfqf6ZOnGSnQbcjFhX5ohhH0+9cuGKhxYqXhx+iaQz1tq9yRRKPYCNJqAFB9xN8QFTNAzlmr4HP2qmobKrkYFlrRE2kIEJenJqPzQUJwUFOP5CjOXTuKPLv5+InbVwVKlw3yvupUkly++05fg2R5MhaRzJcFLEQ==

**ISMAEL MANCILLA HERRERA | Fecha:2023-11-19 22:01:30 | Firmante**

WUQfWLq0fTldJTl89SPiBggXkBFWMF56pD/CfrM/jBlvfg6l2M5taDidqCuuCXrYCDrfU5GipBgZCQ0q2+2UthLDqa0Csq8Z56CtG/9RwYhSzoIcfKuv7UIKcEBBHQldUawgF94qZMueJW0ArXAJz2ou49o+wsOFMMegrzKy/TaHT/CriZPQ1V1f8inG1a7t51oSjJ06dgt93eil0wycqSCj877qtzws39zdz5u9cQaeDD0cJDD/2C1iEW4cgB+smzi3j89Lk9cg/RYNtL7YM2txiis2b1f3VF9AnH3mkL5xSBpri+0z2RcC7e/7d9MAIoTxFVIDppZHE+w==

**JUAN MANUEL MEJIA ARANGURE | Fecha:2023-11-20 14:04:13 | Firmante**

0fNoR4/cxZ2pnsqllntfY4Srhv/oFwViS1XlRk20Yuj6g2KMusymKRwUWqN1doPuajfANm3+pFvAEAF1WSAS9Em9XsZr//TL8UwvPS2/NSO/vGVoSEWbWjp4n9OEQKW5CDUI6eTADk93MSbxhZt5atAvilTbcyE665vAQ5zphZlnlS5KfH+06QHhGyGkojHvhjw+sLysPSY4GMMRxmCNYSVl8w9+NEunRGAXS0RpAi6awOBVGD5dsMrfWhcO6YRD0VZGEzboLmfuD0VEVA2E2CxMe0TeaMDZ700jXAPd0FmSxmTdw4A9vdvGSzbs48k6H0vENL13E5cVnbuqBmg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Yu8H3Earv

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VxKCK4ALqAAPVvYhElgmMgvtwmCsnDZm>