



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*Universidad Autónoma del Estado de Morelos*



*Facultad de Medicina*

*Secretaría de docencia*

*Jefatura de posgrado*

*Análisis de la expresión de la proteína adaptadora SAP en células NK de  
pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda y su asociación  
con una citotoxicidad anormal*

*Tesis*

*Para obtener el grado de maestra en medicina molecular*

*Que presenta:*

*Ing. Lucero Valenzuela Vázquez*

*Director de tesis:*

*Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz*

Cuernavaca, Morelos, México junio del 2018

Facultad de Medicina UAEM

**Tutor principal:** Dr. Mario Cruz Ernesto Muñoz (Facultad de Medicina-UAEM)

**Tutor personal:** Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama (Facultad de Medicina-UAEM)

**Miembros del comité tutorial:**

Dr. José Luis Montiel Hernández (Facultad de Farmacia-UAEM)

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia (Facultad de Medicina-UAEM)

Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez (CIDC)

**Miembros del jurado de examen**

**Presidente:** Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

**Secretario:** Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

**Primer vocal:** Dr. Juan Carlos Núñez Enríquez

**Segundo vocal:** Dr. Miguel Ángel Castañeda Cruz

**Tercer vocal:** Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Este proyecto fue financiado por Conacyt No. De proyecto 241854

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a los laboratorios 1,2, 4 y 11 de la facultad de medicina; al laboratorio de medicina molecular y bioprocesos IBT UNAM por permitirnos trabajar en sus instalaciones y préstamo de material. También agradezco a la Dra. Alma y al Dr. Montiel por su asesoría en este proyecto.*

*Agradezco a la Dra. Rosana Pelayo por aceptarme de estancia en su Laboratorio de Linfopoyesis, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Y a su alumno, MC Juan Carlos Balandrán por su apoyo durante la experimentación y análisis de resultados de esta estancia.*

*Agradezco muchísimo el apoyo brindado por el Dr. Mejía Arangure y su equipo, por su amabilidad y disposición durante este proyecto (en especial a Juan Carlos Núñez)*

*Agradezco a todos los alumnos de la facultad de medicina que fueron donadores de sangre.*

*Agradezco a todas las personas que tiempo atrás estuvieron en mi camino y decidieron permanecer en él, así como nuevas personas que durante esta aventura también me brindaron de distintas maneras su apoyo y que durante toda esta trayectoria compartieron gratas experiencias conmigo.*

*Agradezco enormemente a mis padres por su apoyo incondicional, que me ha impulsado y permitido la formación profesional y personal que hoy en día tengo y por ello cada logro es dedicado con todo mi corazón a mi madre Antonia Vázquez y a mi padre José Luis Valenzuela.*

*Este logro también se lo dedico a mis hermanos y mis 4 hermosos hijos, esperando ser su orgullo y ejemplo.*

*También agradezco a Dios por brindarme vida, salud y sabiduría para seguir adelante.*

# INDICE GENERAL

## Tabla de contenido

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1.  | RESUMEN.....  | 1  |
| 2.  | INTRODUCCIÓN.....   | 2  |
| 2.1 | NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOPOYETICAS (LEUCEMIAS) .....   | 2  |
| 2.2 | LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA .....  | 4  |
| 2.3 | IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LAS CELULAS NK.....  | 8  |
| 2.4 | LAS FAMILIAS SLAM Y SAP REGULAN LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LAS CELULAS NK.....                    | 9  |
| 2.5 | FUNCIÓN DE LAS PROTEINAS SAP Y EAT-2 EN CELULAS NK .....  | 10 |
| 2.6 | FUNCIÓN DE RECEPTORES DE LA FAMILIA SLAM EN AUSENCIA DE LA FAMILIA SAP (señales y función). ..... | 11 |
| 2.7 | RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS NK .....   | 14 |
| 3.  | ANTECEDENTES .....  | 17 |
| 4.  | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....  | 22 |
| 5.  | PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....   | 23 |
| 1.  | OBJETIVO GENERAL.....   | 23 |
| 2.  | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 23 |
| 3.  | HIPOTESIS .....   | 24 |
| 4.  | MATERIAL Y MÉTODOS.....   | 25 |
| 9.1 | CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS (PACIENTES): .....   | 25 |
| 9.2 | CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOS CONTROLES:.....   | 25 |
| 9.3 | CÉLULAS .....   | 26 |
| 9.4 | ABS Y ANÁLISIS DE CITOMETRÍA .....  | 26 |
| 9.5 | ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS DE CITOMETRÍA .....   | 27 |
| 9.6 | ENSAYOS DE DEGRANULACIÓN.....   | 28 |
| 9.6 | ANÁLISIS DE SAP .....   | 28 |
| 9.7 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....   | 28 |
| 5.  | RESULTADOS .....  | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 10.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK EN INDIVIDUOS<br>CONTROLES Y PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON LLA A TRAVÉS DE ENSAYOS DE<br>DEGRANULACIÓN.....   | 31 |
| 10.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA SAP EN CÉLULAS NK DE<br>INDIVIDUOS CONTROLES Y PACIENTES CON LLA. ....  | 33 |
| 10.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE<br>LA PROTEÍNA ADAPTADORA SAP CON UNA DISMINUCIÓN EN LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE<br>LAS CÉLULAS NK EN PACIENTES CON LLA..... | 37 |
| 6. DISCUSIÓN .....  | 39 |
| 7. CONCLUSIONES.....  | 43 |
| 8.-PERSPECTIVAS .....   | 43 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 44 |
| 1. ANEXOS.....  | 47 |

## 1. RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más frecuente y afecta principalmente a la población infantil. Los índices de supervivencia a 5 años en niños menores de 15 años de edad con LLA en México son de 56%, mientras que en naciones desarrolladas alcanzan un 90%, aproximadamente. Debido a que la LLA representa un problema serio de mortalidad infantil en nuestro país, es importante generar conocimiento sobre los aspectos celulares y moleculares que favorecen el surgimiento de células hematopoyéticas malignas. Una importante defensa ante células neoplásicas hematopoyéticas, son las células Natural Killer (NK). Dentro del gran repertorio de familias de receptores que poseen las células NK, se encuentran los receptores de la familia de SLAM y las proteínas adaptadoras de la familia SAP. Ambas familias trabajan en conjunto y su interacción regula importantemente las funciones efectoras de células NK, por lo que alteraciones en su expresión o función conlleva a una importante disfuncionalidad en estas células, por lo que se ha demostrado en modelos murinos.

Realizamos un análisis comparativo de la expresión de la proteína adaptadora SAP en células NK de individuos controles y pacientes pediátricos con LLA, y determinamos si existe asociación entre la disfuncionalidad de estas células y alteraciones en dicha proteína. Interesantemente, y como ya se había reportado en Texas por Rayne H. y colaboradores, las células NK de pacientes mexicanos con LLA presentan una capacidad citotóxica disminuida respecto al grupo control.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de SAP en células NK de pacientes diagnosticados con LLA respecto al grupo control. Sin embargo, las células NK de pacientes con cuenta leucocitaria mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$  mostraron una disminución en la expresión de SAP y una asociación con la capacidad citotóxica deficiente de estas células. Interesantemente la cuenta inicial de leucocitos es el único factor de pronóstico asociado con un bajo nivel de expresión de SAP en células NK y el factor universal más importante para la clasificación de riesgo.

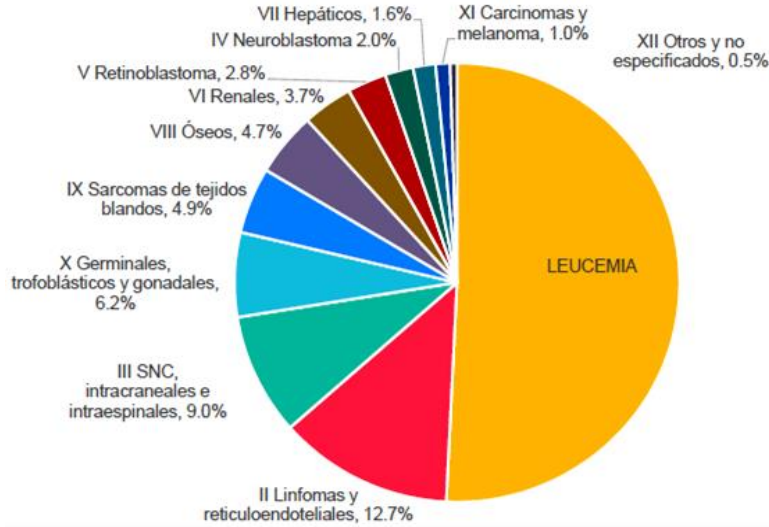
## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOPOYETICAS (LEUCEMIAS)

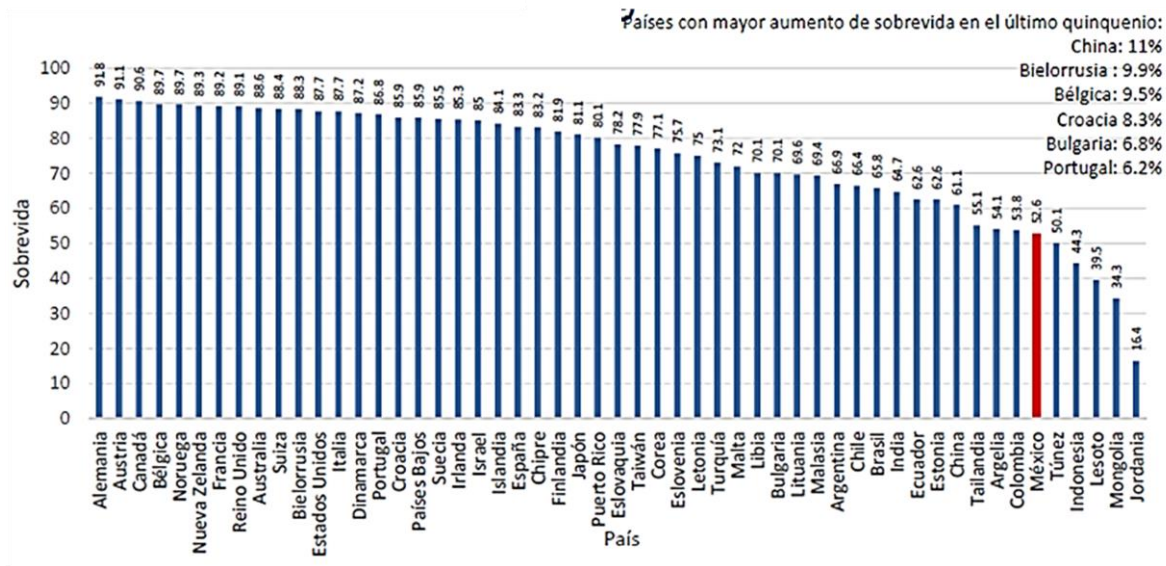
Las leucemias comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias malignas y representan alrededor del 50% de todos los cánceres infantiles en México <sup>[1]</sup> ver Figura 1.

Dentro de este grupo heterogéneo, las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) son las neoplasias malignas más frecuentes. La mayor incidencia ocurre en niños de entre dos y cinco años, predominando en varones. La tasa de supervivencia de niños menores de 15 años con LLA en México es del 56% a 5 años <sup>[2]</sup>, lo cual está muy por debajo si se compara con el índice de supervivencia a 5 años de países desarrollados como el de los Estados Unidos, el cual presenta un índice de supervivencia del 90 % aproximadamente <sup>[3]</sup>. En la Figura 2 se aprecia que México es uno de los 10 países con la supervivencia más baja en niños menores de 15 años de edad con LLA de todo el mundo.

Las leucemias se caracterizan por la proliferación acelerada de células neoplásicas del sistema hematopoyético en estado inmaduro, con lo cual reemplazan a las células hematopoyéticas normales. Una vez establecidas, las células hematopoyéticas malignas, tienen la capacidad de infiltrar la médula ósea, sangre y otros tejidos. De acuerdo con su evolución, se clasifican como agudas y crónicas, y según la estirpe celular afectada se clasifican en linfoide o mieloide. El origen de esta enfermedad se ha determinado como multifactorial, es decir, factores genéticos, hereditarios y/o ambientales pueden incidir en el desarrollo de este tipo de enfermedades. En la mayoría de los casos, esta enfermedad lleva a la muerte del paciente por lo que constituye un importante problema de salud en México <sup>[4]</sup>.



**Figura 1: Tipo de neoplasia en niños menores a 18 años de edad en México en el periodo 2008 – 2014.** Fuente: Dirección General Adjunta de Epidemiología. Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes. Abril 2015.



**Figura 2: Supervivencia a 5 años en menores de 15 años de edad con LLA por país, 2005-2009.** Fuentes: Allemani C, y cols. Estudio CONCORD-2. Lancet. 2014 pii: S01406736 (14) 62038-9. DGAE. RCNA 2015.



## **2.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

### **2.2.1 SINTOMATOLOGÍA**

- ✓ Dolor óseo.
- ✓ Síndrome anémico: palidez, taquicardia, astenia, fatiga.
- ✓ Trombocitopenia: petequias, hemorragia,
- ✓ Neutropenia: infecciones
- ✓ Organomegalia: hepatoesplenomegalia.
- ✓ Pancitopenia o bicitopenia
- ✓ Leucocitosis
- ✓ Blastos en la médula ósea o sangre periférica.

### **2.2.2 DETECCIÓN, CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO**

Cualquier paciente con uno o más de los síntomas característicos de leucemia requiere de una confirmación mediante un aspirado de médula ósea, con el cual se realiza el análisis morfológico de las células de la médula. Por su morfología, las leucemias linfocíticas agudas se clasifican según la FAB (La clasificación Franco-Americana-Británica):

- 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.

El diagnóstico es complementado con la realización de un inmunofenotipo, el cual determina la estirpe y su grado de maduración. En el Instituto Nacional de Cancerología se solicita de primera vez el siguiente inmunofenotipo (ver Figura 3 y Figura 4):

- Marcadores de células tempranas: CD34, CD117, HLA, TdT
- Marcadores de células B: CD19, CD79a, CD22, CD10, cIgM, mIgM.
- Marcadores de células T: CD3, CD5, CD2, CD1a, CD7.
- Mieloides: CD13 y CD33 (controles).

| Sub-grupos         | HLA -DR | TdT | CD 19 | CD 79 <sup>a</sup> | CD 22 | CD 10 | cIg M | mIg M |
|--------------------|---------|-----|-------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| Pro-B              | ++      | ++  | ++    | ++                 | ++    |       |       |       |
| PreB común (CALLA) | +       | ++  | ++    | ++                 | ++    | ++    |       |       |
| Pre-B              | +       | ++  | ++    | ++                 | ++    | ++    | ++    |       |
| B Madura           | +       | ++  | ++    | ++                 | ++    | ++    | ++    | ++    |

**Figura 3: Clasificación según su origen B.** <sup>[5]</sup>

| Subgrupos  | cCD3 | CD+ | CD5 | CD2 | CD3 | CD1 |
|------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| T-Temprana | ++   | ++  | +   |     |     |     |
| T-Cortical |      |     | ++  | ++  | +   | +   |
| T-Madura   | +    |     | ++  | ++  | ++  |     |

**Figura 4: Clasificación según su origen T.** <sup>[5]</sup>

Los pacientes diagnosticados con LLA se dividen en diferentes grupos de riesgo de recaída (riesgo estándar y riesgo alto) lo cual se determina con base en la cuenta de leucocitos en sangre periférica y la edad al momento del diagnóstico. La clasificación más utilizada es la del National Cancer Institute (NCI). Aquellos pacientes con una cuenta de leucocitos mayor

o 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. Los pacientes clasificados como alto riesgo de recaída reciben un tratamiento más intensivo y con una mayor duración. Los pacientes clasificados como de riesgo estándar suelen tener un mejor pronóstico que los de alto riesgo. En general, las tasas de supervivencia de los niños de riesgo estándar llegan a ser hasta del 98% en países desarrollados.

Otros factores que determinan el riesgo de recaída en los pacientes son:

- Subtipo de la LLA: Aquellos pacientes con LLA de células Pre-B generalmente tienen mejor pronóstico que los que tienen leucemia de células B maduras (Burkitt) o células T<sup>[6]</sup>.
- Propagación de células leucémicas a ciertos órganos: La propagación de blastos al líquido cefalorraquídeo, o a los testículos (en niños), reduce la probabilidad de remisión. La hepatomegalia y esplenomegalia generalmente se relaciona con una cuenta alta de leucocitos, sin embargo, algunos médicos consideran esto como un signo diferente de un pronóstico no tan favorable.
- Número de cromosomas: Los pacientes cuyas células leucémicas contienen más de 50 cromosomas (*hiperdiploidía*) tienen más probabilidades de remitir la enfermedad, especialmente si hay un cromosoma 4, 10 o 17 adicional. Mientras que los pacientes cuyas células leucémicas tienen menos de 46 cromosomas (*hipodiploidía*) tienen un pronóstico menos favorable<sup>[7]</sup>.
- Translocaciones cromosómicas: Los niños cuyas células leucémicas tienen una translocación entre los cromosomas 12 y 21 tienen más probabilidades de remitir la enfermedad que aquellos con una translocación entre los cromosomas 9 y 22 (el cromosoma Philadelphia), 1 y 19 o 4 y 11<sup>[7]</sup>. Algunos de estos factores de pronóstico “adversos” se han vuelto menos importantes en años recientes debido a mejores tratamientos.
- Respuesta al tratamiento: Los niños cuya inducción a la remisión es exitosa en un lapso de una a dos semanas de quimioterapia tienen un mejor pronóstico, mientras que, pacientes con falla en la inducción a la remisión o enfermedad mínima residual

persistente después de las primeras 2 semanas de inducción, reciben una terapia más agresiva y son considerados para trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas <sup>[7]</sup>. Niños cuya enfermedad mínima residual es menor a 0.01% en los días 33 y 78 tienen una sobrevida libre de eventos a 5 años <sup>[8-9]</sup>.

### 2.2.3 ETAPAS DEL TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO

El tratamiento para pacientes con LLA consiste en 3 fases:

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. Se prescriben medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de ADN, tales como vincristina, prednisona y L-asparginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorrubicina, los cuales no producen daño a la médula ósea normal y actúan pronto; 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%.

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 residuales que han superado la etapa anterior; 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, L-asparginasa y citarabina, o bien una combinación de dexametasona, vincristina, L-asparginasa, 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 mercaptopurina y metotrexato, que generan la mielosupresión y además son bien tolerados <sup>[4]</sup>.

### 2.3 IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LAS CELULAS NK

Las células Natural Killer (NK) son células linfoides que constituyen una defensa importante ante células cancerosas e infectadas por virus. En sangre periférica representan del 5-10% de las células linfoides y también se encuentran en órganos linfoides y tejidos periféricos no linfoides. A diferencia de los linfocitos B y T, las NKs no expresan receptores específicos para el antígeno, en su lugar expresan una variedad de receptores que reconocen ligandos específicos en las células blanco. Las células NK junto con los linfocitos T CD8, constituyen las principales células citotóxicas del sistema inmune, y son responsables de la eliminación de células infectadas por virus y células malignas. La función citotóxica de las células NK esta mediada por un fino equilibrio entre las señales activadoras e inhibitorias, las cuales se generan a partir de receptores de superficie. El resultado de este balance determina si las células NK matan o no, a una célula diana. A éste mecanismo por el cual las células NK eliminan células transformadas e infectadas por virus se conoce como citotoxicidad natural<sup>[10-12]</sup>. Adicionalmente, las células NK cuentan con una maquinaria que les permite secretar cantidades importantes de citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , lo que contribuye a regular la función de otras células inmunes.

Las células NK cuentan con un alto contenido de gránulos citotóxicos preformados en su citoplasma a medida que circulan en la periferia<sup>[13]</sup>. Dichos gránulos son preformados durante su desarrollo y maduración, y es hasta el momento de reconocimiento y conjugación en el que los gránulos son activamente dirigidos hacia el sitio de la sinapsis inmunológica<sup>[14]</sup>. Es entonces, cuando los lisosomas líticos se fusionan con la membrana plasmática, secretando así moléculas efectoras solubles en la sinapsis inmunológica citotóxica en formación. A su vez, varios componentes transmembranales de los gránulos que contienen perforina y granzima se exponen en la superficie de la célula y determinan el destino de las células blanco <sup>[15-16]</sup>.

## 2.4 LAS FAMILIAS SLAM Y SAP REGULAN LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LAS CELULAS NK

Entre los receptores que regulan la activación de las células NK se encuentran los miembros de la familia SLAM (signaling lymphocytic activation molecule). Esta familia de receptores son glicoproteínas de superficie celular que forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas y está integrada por 9 receptores específicos de células hematopoyéticas denominados SLAMF1 (también conocido como SLAM o CD150), SLAMF3 (Ly-9 o CD229), SLAMF4 (2B4 o CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (Ly108 en ratones y NTB-A en los seres humanos), y SLAMF7 (CRACC, CD319 o CS1)<sup>[17]</sup>.

Todos los receptores de esta familia participan en interacciones homofílicas, a excepción de SLAMF4 que interactúa con CD48 (también llamado SLAMF2), el cual se expresa en todas las células hematopoyéticas, incluidas las células que expresan 2B4. La mayoría de las células inmunes expresan de 3 a 5 miembros de la familia SLAM. De ésta familia, NTB-A, 2B4, CRACC, Ly-9<sup>[18]</sup> y CD84<sup>[19]</sup> se expresan en las células NK. En la Figura 5 se muestran los diferentes miembros de la familia SLAM, así como su patrón de expresión y características generales.

| Receptor                       | Physiological ligand | Expression pattern                      | Interaction with |             | Phenotypes knockout mice        | Genetic background knockout mice |
|--------------------------------|----------------------|---|------------------|-------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                                |                      |   | SAP              | EAT-2 (ERT) |                                 |                                  |
| <b>SLAM</b><br>(SLAMF1)        | SLAM                 | T, B, DC, Mφ, plat.                     | +                | +           | T, Mφ, plat., NK-T (with Ly108) | mixed 129-B6                     |
| <b>2B4</b> (SLAMF4)            | CD48                 | NK, T (CD8 <sup>+</sup> ), DC, Mφ, eos. | +                | +           | NK                              | pure B6                          |
| <b>NTB-A/Ly108</b><br>(SLAMF6) | NTB-A/Ly108          | T, B, NK, DC, neutro.                   | +                | +           | T, neutro., NK-T                | mixed 129-B6                     |
| <b>Ly-9</b><br>(SLAMF3)        | Ly-9                 | T, B, NK, DC, Mφ                        | +                | +           | T                               | mixed 129-B6                     |
| <b>CD84</b><br>(SLAMF5)        | CD84                 | T, B, NK, DC, Mφ, plat., mast, eos.     | +                | +           | Not reported                    | Not reported                     |
| <b>CRACC</b><br>(SLAMF7)       | CRACC                | T (activated), B, NK, DC, Mφ            | -                | +           | NK                              | pure 129                         |

**Figura 5: Receptores y características de los receptores de la familia SLAM.** <sup>[19]</sup>

H, Human; M, mouse; T, célula T; B, célula B; NK-T, célula natural killer -T; NK, célula natural killer; DC, célula dendrítica; Mφ, macrófago; PLC, fosfolipasa C; T<sub>H2</sub>, célula cooperadora 2; T<sub>FH</sub>, célula cooperadora folicular.

A través de sus regiones citoplasmáticas, los receptores de la familia de SLAM se asocian con las proteínas adaptadoras de la familia SAP (SLAM-associated protein) <sup>[20]</sup>. Esta familia de proteínas adaptadoras está formada por dos miembros conocidos como SAP (SH2D1) y EAT-2 (SH2D1B2). En la Figura 6 se observan los integrantes de la familia SAP, así como algunas de sus características. Estas proteínas adaptadoras están formadas por dominios SH2 y una cola carboxilo terminal de 23 aminoácidos y se expresan sólo en células hematopoyéticas, sin embargo, presenta patrones de expresión diferencial. Mientras SAP se expresa en células T y células NK, EAT-2 se expresa en células NK y células mieloides como macrófagos y células dendríticas <sup>[21]</sup>. El gen que codifica SAP se encuentra en el cromosoma X en humanos y ratón, y el gen que codifica para EAT-2 se sitúa en el cromosoma 1 en ambas especies <sup>[22]</sup>.

| Adaptor                   | Chromosomal localization   | Expression pattern     | Signaling mechanism                           | Phenotypes knockout mice   | Genetic background knockout mice | Human disease |
|---------------------------|----------------------------|------------------------|---|--|----------------------------------|---------------|
| <b>SAP</b><br>(SH2D1A)    | X (H, M)                   | T, ?B, NK-T, NK, plat. | Fyn, ?PIX, ?Nck (arginine 78)                 | T <sub>H</sub> 2, T <sub>FH</sub> , B (?indirect), NK-T, NK, plat. | Mixed 129-B6                     | XLP           |
| <b>EAT-2</b><br>(SH2D1B1) | 1 (H, M)                   | NK, DC, M $\phi$       | ?PLC- $\gamma$ 1 (carboxy-terminal tyrosines) | NK   | 129                              | none          |
| <b>ERT</b><br>(SH2D1B2)   | 1 (H, M; pseudo-gene in H) | NK                     | (?carboxy-terminal tyrosines)                 | NK   | 129                              | none          |

**Figura 6: Integrantes de la familia SAP y características.** <sup>[19]</sup>

H, Human; M, mouse; T, célula T; B, célula B; NK-T, célula natural killer -T; NK, célula natural killer; DC, célula dendrítica; M $\phi$ , macrófago; PLC, fosfolipasa C; T<sub>H</sub>2, célula cooperadora 2; T<sub>FH</sub>, célula cooperadora folicular.

## 2.5 FUNCIÓN DE LAS PROTEINAS SAP Y EAT-2 EN CELULAS NK

Varios estudios han demostrado que las proteínas adaptadoras de la familia SAP son necesarias para que los receptores de la familia SLAM regulen la activación de las células NK y células T CD8<sup>+</sup> <sup>[23-27]</sup>. Esta actividad se observó únicamente en el contexto de la

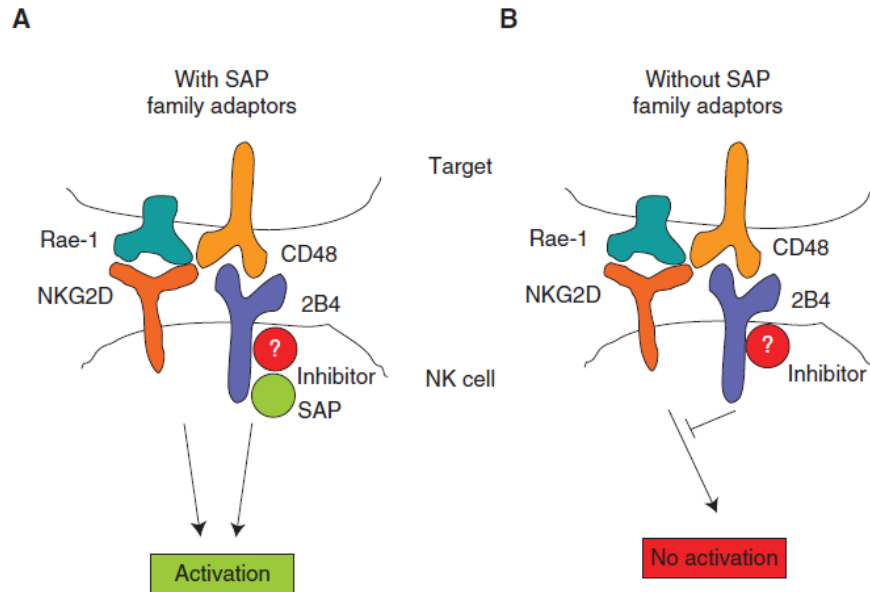
activación por las células NK como resultado de su interacción con células blanco hematopoyéticas. Sin embargo, un comportamiento similar se observó cuando los ligandos de los receptores de la familia SLAM se expresaron de forma ectópica en las células blanco no hematopoyéticas<sup>[26-27]</sup>.

A través de su dominio SH2, los adaptadores de la familia SAP se asocian con una secuencia específica que contiene un residuo de tirosina, el cual puede ser potencialmente fosforilado. Esta secuencia denominada ITSM (del inglés inmunoreceptor tyrosine-based switch motifs) se encuentra en el dominio citoplásmico de los receptores de la familia SLAM <sup>[21,28-32]</sup>. Estas interacciones son de alta afinidad y especificidad. La evidencia actual sugiere que todos los adaptadores de la familia SAP pueden interactuar con los receptores de la familia SLAM, con la clara excepción de CRACC que se asocia únicamente con EAT-2 y, presumiblemente, ERT, pero no con SAP <sup>[12,33-34]</sup>.

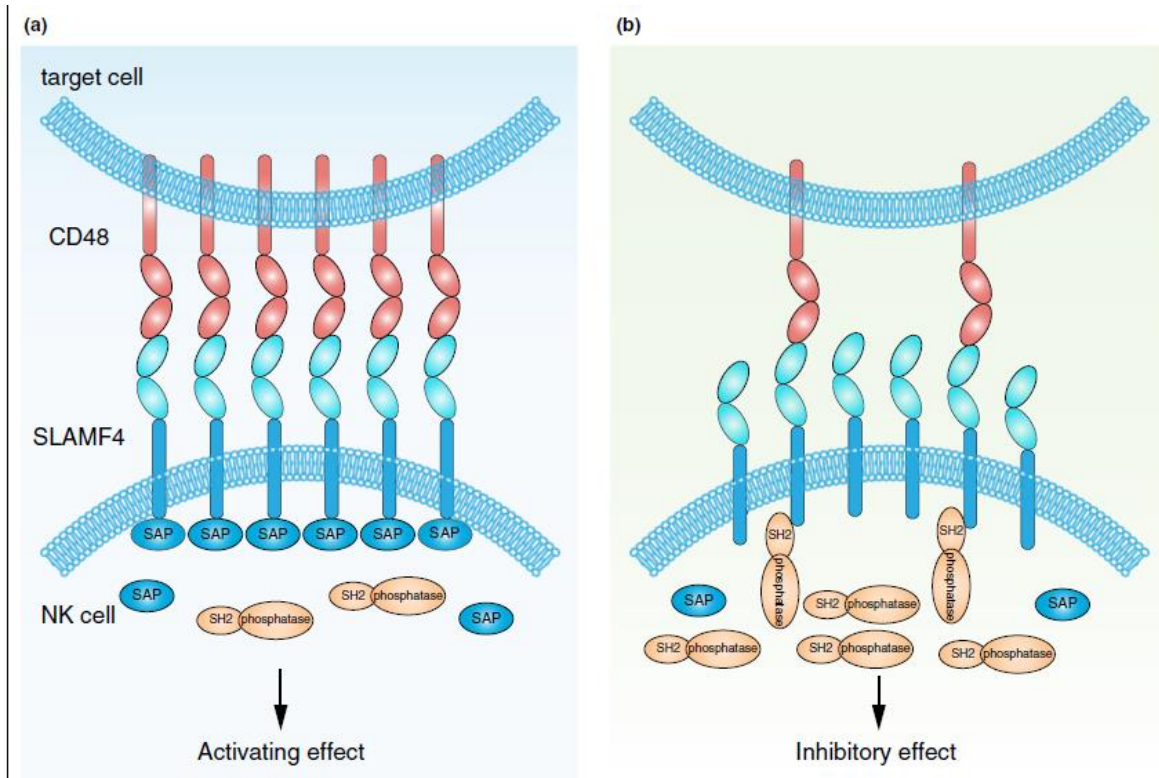
## **2.6 FUNCIÓN DE RECEPTORES DE LA FAMILIA SLAM EN AUSENCIA DE LA FAMILIA SAP (señales y función).**

Recientemente, se ha descubierto que, en ausencia de todos los adaptadores de la familia SAP, los receptores de la familia SLAM en las células NK de ratón, incluyendo 2B4, Ly108, CRACC, Ly-9, y CD84, no sólo pierden su función de activación, sino que también se convierten en potentes receptores que inhiben las funciones citotóxicas de las células NK (ver Figura 7)<sup>[26]</sup>. Esta señal inhibitoria permite que los receptores de la familia SLAM supriman la función de receptores de activación de otros receptores de células NK tales como el NKG2D, CD16 y, probablemente, DNAM-1, lo que conduce a una marcada supresión de la respuesta de las células NK hacia células dianas hematopoyéticas.





**Figura 7: Función de interruptor de la familia SLAM en ausencia de los adaptadores de la familia SAP.**<sup>[19]</sup> Activación de los receptores de la familia SLAM por interacción heterotípica u homotípica célula-célula. (A) Interacción heterotípica célula-célula. Desencadenamiento de 2B4 en células NK por CD48 en las células diana resulta en señales dependientes de los adaptadores de la familia de SAP, que mejoran la citotoxicidad y la secreción del IFN- $\gamma$  inducida a través de la estimulación del receptor de activación primaria NKG2D por su ligando Rae-1. (B) Interacción Homotípica célula-célula. La activación de Ly108 por Ly108 en dos timocitos doble positivas (DP) se traduce en señales dependientes de SAP.



**Figura 8: Modelo hipotético propuesto por Ning Wu y Veillette, 2016, sobre la función dicotómica de SLAMF4 en células con proteínas adaptadoras de la familia SAP.** SLAMF4, al igual que la mayoría de los receptores de la familia SLAM, puede funcionar como receptor activador o inhibidor en células NK que expresan proteínas adaptadoras de la familia SAP. Ning Wu y Veillette proponen que esta función dicotómica puede ser determinada por los niveles relativos de la familia SAP y fosfatasas inhibitoras que contienen dominio SH2 en células NK, o bien, por la abundancia de CD48 (ligando de SLAMF4, sobre células diana). (A) Cuando las células NK expresan grandes cantidades de adaptadores de la familia SAP con respecto a las proteínas inhibitoras, o cuando las células diana expresan altos niveles de CD48, entonces SLAMF4 funciona como un receptor de activación. (B) Cuando las células NK expresan cantidades bajas de adaptadores de la familia SAP con relación a las proteínas inhibitoras, o cuando las células diana expresan niveles bajos de CD48, entonces SLAMF4 funciona como receptor de inhibición.

## 2.7 RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS NK

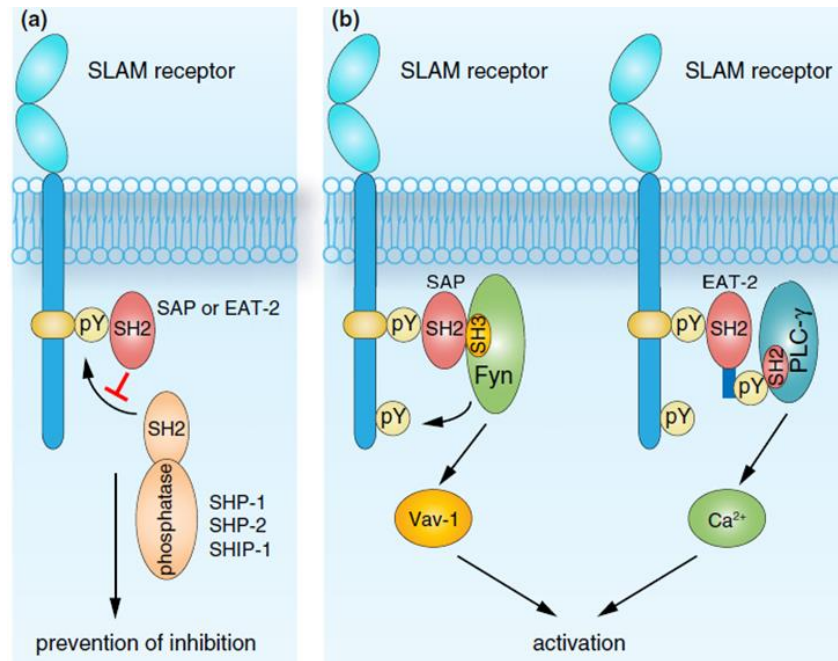
En células linfoides, las señales que se transmiten a través de receptores primarios de activación, está mediada por pequeñas proteínas adaptadoras ancladas a transmembrana que poseen secuencias específicas que contienen dos residuos de tirosina fosforilables. Estas secuencias denominadas ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) una vez fosforiladas, sirven como sitios de reclutamiento para proteínas que pueden encender vías de señalización cascada abajo. Las células NK expresan las proteínas adaptadoras CD3z, FcεRIγ y DAP12, todas ellas portadoras de al menos una secuencia ITAM. Las asociaciones entre estos adaptadores ITAM y sus receptores son predominantemente mediadas por las interacciones dentro de sus regiones transmembrana, a menudo con pares de aminoácidos con carga opuesta que forman puentes salinos estables. Un estudio reciente por Arase et al.<sup>[35]</sup> demostró que los heterodímeros de CD3z y FcεRIγ compiten con homodímeros FcεRIγ y regulan negativamente la activación de las células NK mediada por CD16.

A través de sus dominios ITAM, los receptores de activación pueden reclutar y activar a las cinasas de tirosina Syk y ZAP70, las cuales son expresadas por todas las células NK. El receptor de las NK que ha sido más ampliamente estudiado es CD16, un receptor de baja afinidad para IgG. Este receptor es responsable de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La señalización de CD16 en las células NK, iniciadas ya sea por CD3z o FcεRIγ es bastante similar a la transducción de señales inducida por TCR en las células T; la fosforilación del ITAMs es probablemente mediada por una quinasa de la familia src, facilitando de este modo el reclutamiento de Syk y ZAP70. Eventos cascada abajo incluyen la fosforilación de SLP-76, 3BP2<sup>[36]</sup>, Shc,<sup>[37]</sup> p85 PI3-quinasa, c-Cbl, fosfolipasa C (PLC) -G1 y PLC-γ2, la movilización de Grb2, enlazador para la activación de las células T (LAT), el reclutamiento y activación Vav-1 y Vav-2, así como la elevación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares, y la activación de Rho, Ras, GTPasas que a su vez proteína activan a la cascada de las MAP cinasas<sup>[10]</sup>.

La señalización a través de CD16 conlleva a la activación el factor nuclear de las células T activadas (NFAT, del inglés nuclear factor of activated T cells) lo que resulta en la producción de citocinas, incluyendo IFN-γ, GM-CSF y varias quimiocinas. Los eventos

bioquímicos que acompañan la estimulación de otros receptores de NK a base de ITAM no están bien caracterizados, pero probablemente es similar a la activación inducida por CD16. Al igual que con CD3z o FcεRIγ, la estimulación de las células NK a través de DAP12 activa Syk, y ZAP70 e inicia la citotoxicidad y la producción de citocinas mediada por células NK<sup>[10]</sup>.

La vía de señalización mediada por los receptores de la familia SLAM, es en parte dependiente del reclutamiento de las proteínas adaptadoras SAP. Una vez que los receptores de la familia SLAM interactúan con sus respectivos ligandos, la proteína adaptadora SAP es reclutada a través de su dominio SH2 a la tirosina fosforilada (pY) de los motivos ITSM, ubicados en el dominio citoplasmático de los receptores SLAM. Esta interacción previene el acoplamiento de los receptores de la familia SLAM con fosfatasa inhibitoras que contienen dominio SH2 tales como SHP-1, SHP-2 y SHIP-1. Lo anterior tiene como resultado generar señales de activación que potencia la función citotóxica de las células NK. La capacidad de SAP de generar señales de activación depende de su asociación física con Fyn, una cinasa de tirosinas de la familia de Src. Esta asociación está mediada por la arginina 78 (R78) de SAP y el dominio SH3 de Fyn. Este binomio SAP/Fyn induce la fosforilación de varios sustratos cascada abajo incluyendo al factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav-1. Por otro lado, EAT-2 recluta PLC-γ a través de una asociación que implica la tirosina en la C-terminal fosforilada de EAT-2 (tirosina 127) y el dominio SH2 de PLC-γ. A su vez, PLC-γ una vez activada inicia los flujos de calcio que también promueven vías de señalización que son importantes para mediar la citotoxicidad por las células NK (ver **Figura 9**).



**Figura 9: Mecanismo de acción dual de las proteínas adaptadoras de la familia SAP.**

### 3. ANTECEDENTES

La capacidad de las células NK para eliminar células blanco depende de un fino balance entre señales activadoras e inhibidoras las cuales son generadas por diversos receptores de superficie celular.

Las células NK poseen un repertorio de recetores de superficie que activan o inhiben la función efectora de células NK. Una de las familias de receptores importantes para regular la función citotóxica son los receptores pertenecientes a la familia SLAM. La función de estos receptores esta finamente regulada por su capacidad de asociarse a las proteínas adaptadoras de la familia de SAP. Adicionalmente, las células NK cuentan con otro grupo de receptores que son importantes en la inmunidad anti-tumoral mediada por las células NK. Entre estos receptores se encuentran los receptores de citotoxicidad natural (NCR), tales como NKp46, NKp30, NKp44 y NKG2D. Por otro lado, la célula NK también presenta receptores de inhibición en su superficie, los cuales atenúan las respuestas citotóxicas mediadas por las células NK. Entre los más estudiados están los receptores que pertenecen a la familia KIR y a las lectinas tipo C, cómo NKG2A.

Dong y colaboradores <sup>[26]</sup> demostraron en modelos murinos, que en ausencia de expresión de las proteínas adaptadoras de la familia SAP, los receptores de la familia SLAM funcionan como potentes inhibidores de la función citotóxica en células NK. Interesantemente, esta inhibición no se explica a través de inhibir la maquinaria intrínseca de las células NK, ya que estas mismas células, carente de la expresión de las proteínas adaptadoras de la familia SAP, son capaces de eliminar células blanco no hematopoyéticas de manera normal. Por lo tanto, estos resultados presuponen que alteraciones en la expresión de las proteínas adaptadoras de la familia SAP pueden conllevar a inhibir la función de células citotóxicas en contra de células blanco de rigen hematopoyético. Ver Figura 10.

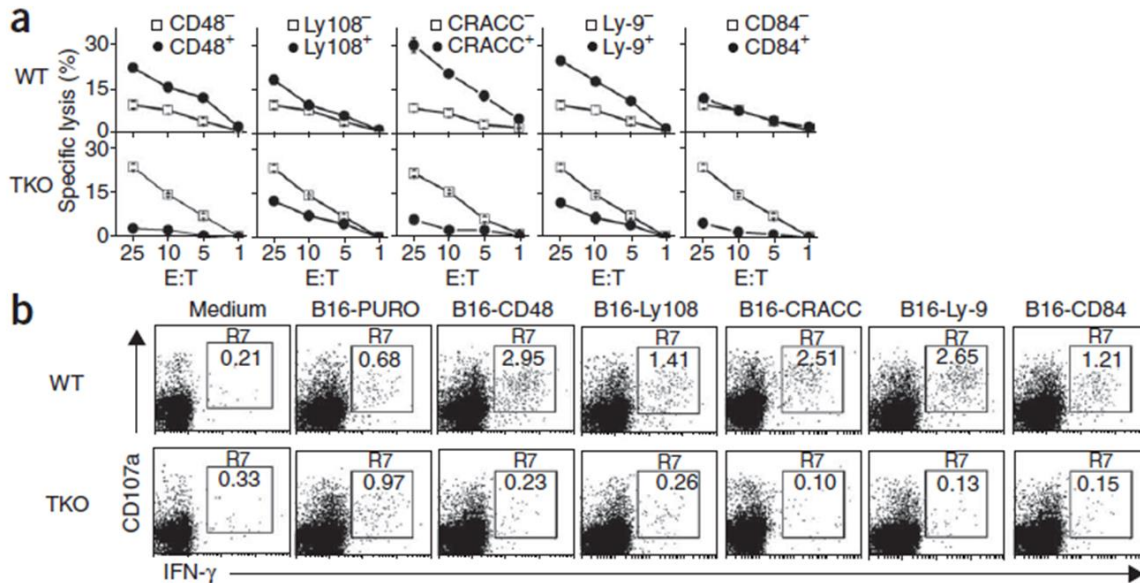
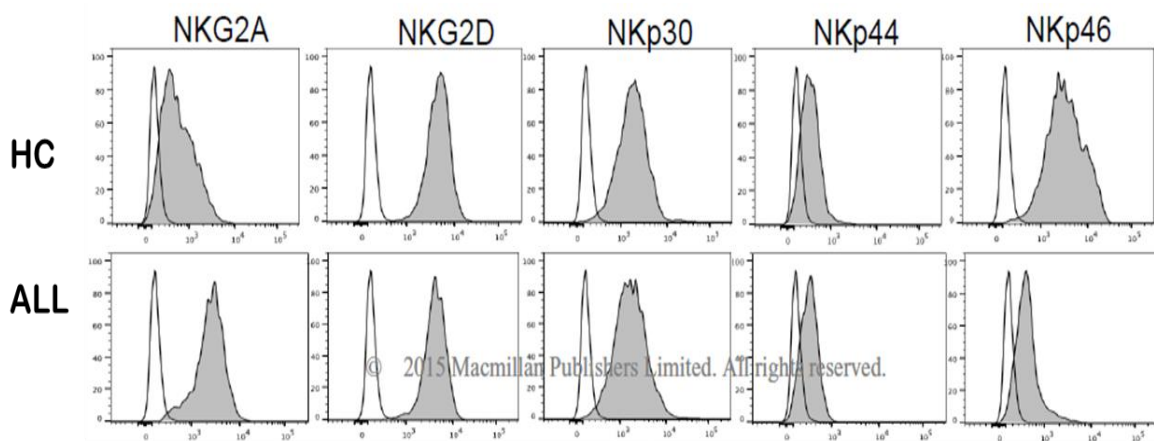


Figura 10: Los receptores de la familia SLAM se convierten en receptores inhibidores en células NK que carecen de las proteínas adaptadoras de la familia SAP. (A) Ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr donde se evalúa la capacidad de las células NK de ratones WT (wild type) y TKO (knockout para SAP, EAT-2 y ERT) para matar células B16 (melanoma) con o sin expresión de ligandos de diversos receptores de la familia SLAM. (B) Análisis de citometría de flujo de funciones efectoras, producción de IFN- $\gamma$  y expresión de CD107, de las células NK de ratones WT y TKO en respuesta a células de melanoma B16 con o sin expresión (B16-PURO) de ligandos para diversos receptores de la familia SLAM. B16-PURO, células B16 que expresan el marcador de resistencia a puromicina. Los números en las áreas delimitadas indican el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  [26].

Por otro lado, está bien documentado que el microambiente tumoral puede ejercer un efecto modulador sobre la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos, en el caso particular de las malignidades hematopoyéticas como las leucemias, se ha reportado que este microambiente tumoral pueden alterar el fenotipo de las células NK. Por ejemplo Rayne y colaboradores demostraron un mecanismo de evasión por parte de las células malignas en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL). Ellos reportan que las células NK de pacientes con LLA, tienen una mayor expresión del receptor NKG2A (receptor de inhibición) y una menor expresión de NKP46 (receptor de activación) respecto de las células NK de controles pareados por edad, (Figura 11).

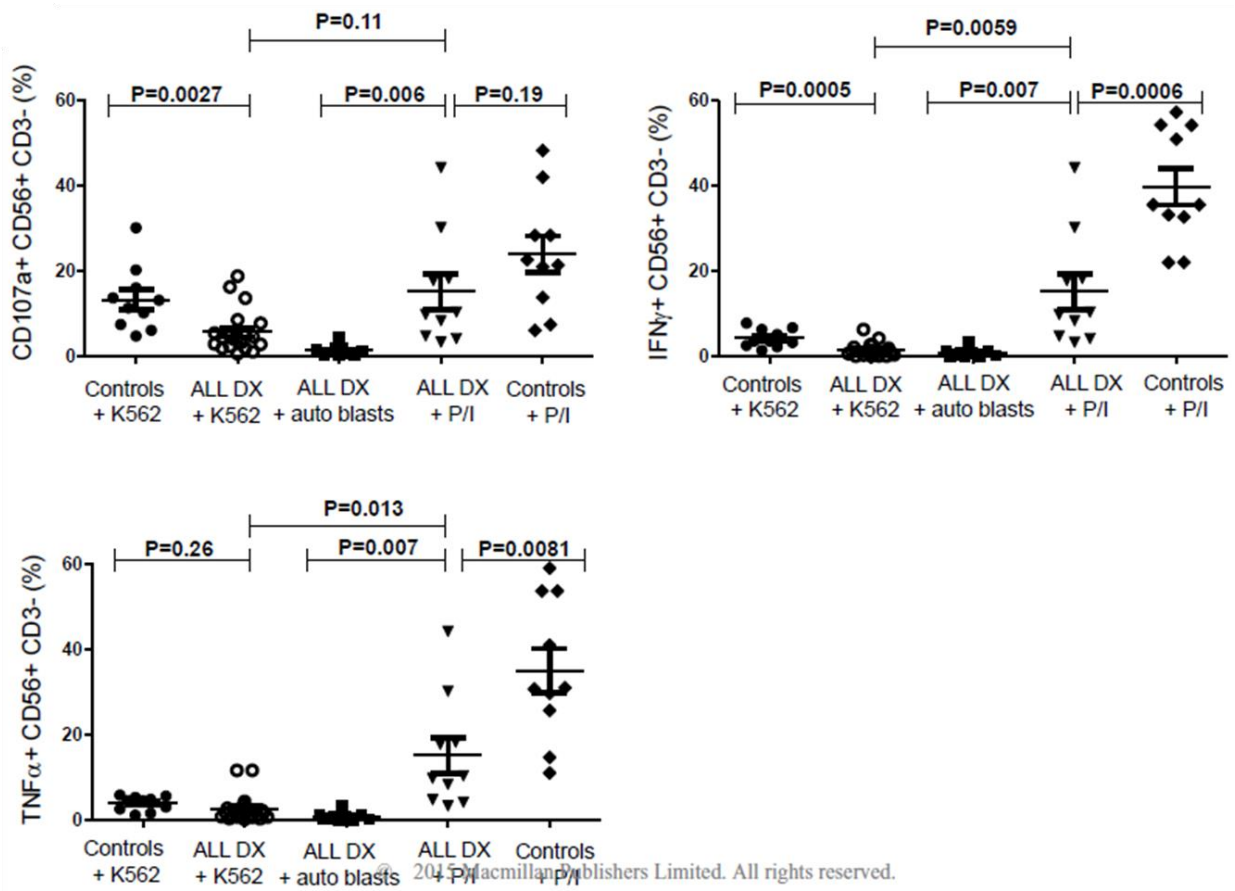
Adicionalmente, también reportan que los blastos de pacientes con B-ALL son capaces de inducir directamente dicho fenotipo inhibitorio en células NK sanas.



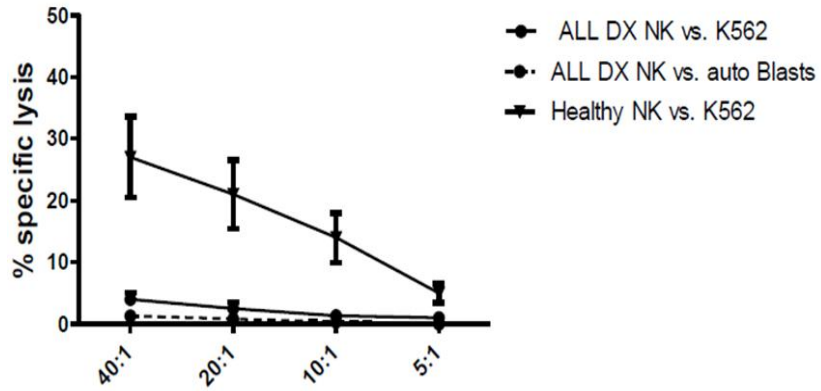
**Figura 11: Fenotipo anormal de receptores de superficie en células NK de pacientes con B-ALL en comparación con controles pediátricos sanos (Healthy Controls) pareados por edad.** Los histogramas representan el fenotipo de superficie de células NK en un paciente ALL representativo y control sano. Los histogramas sin sombra representan el control del isotipo y los histogramas sombreados representan tinción con los anticuerpos monoclonales específicos acoplados a PE. Se seleccionaron las células NK con fenotipo CD10<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> a partir de PBMC's.

Dicho fenotipo inhibitorio correlaciona con actividad citotóxica disminuida en pacientes pediátricos con B-ALL en comparación con controles pediátricos de la misma edad. Esto último lo demuestran con ensayos de degranulación y liberación de <sup>51</sup>Cr, representados en las Figura 12 y Figura 13. Estos resultados sugieren que una disminución en la expresión de las proteínas adaptadoras de la familia SAP podría contribuir a atenuar las respuestas citotóxicas de las células NK en pacientes con LLA<sup>[38]</sup>.





**Figura 12: Citotoxicidad y función efectora de las células NK en pacientes al momento del diagnóstico (DX), en comparación con controles pediátricos de la misma edad. A partir de la población CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>, evaluación de función citotóxica a través de ensayos de degranulación (expresión de CD107a), producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , ante células blanco K562, blastos autólogos, y en respuesta a PMA/ionomicina (P / I, control positivo) en 20 pacientes con ALL en comparación con 10 controles sanos [38].**



**Figura 13: Lisis específica (Ensayo de liberación de 51Cr).** Células blanco K562 (línea continua y círculo sólido) y blastos autólogos(línea punteada y círculo solido) en co-cultivo con células NKs 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 <sup>[38]</sup>.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los indicadores más importantes para valorar el estado de salud de una comunidad es la mortalidad infantil<sup>[39]</sup>. Las leucemias en México ocupan alrededor del 50% de todos los cánceres infantiles<sup>[1]</sup>, siendo la LLA la más frecuente y que afectan principalmente a la población infantil con una mayor incidencia en niños entre 2 y 5 años de edad, y con un predominio en varones. Los índices de supervivencia de niños menores de 15 años con LLA en México son preocupantemente bajos (56%) si se compara con el índice de supervivencia de países desarrollados (87%). Lo anterior a pesar del empleo de los mismos esquemas de quimioterapia. Por tanto, México está posicionado dentro de los 10 países con supervivencia más baja en niños menores de 15 años de edad con LLA, lo cual nos conduce a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para nuestra población.

Las células NK forman parte de la respuesta inmune anti-viral y anti-tumoral, particularmente en contra de células malignas hematopoyéticas. Por lo anterior, el estudio de las células NK es un tema central para la búsqueda de nuevos tratamientos para la erradicación del cáncer, particularmente varios tipos de leucemias. En los últimos años, los receptores de la familia SLAM y las proteínas adaptadoras de la familia SAP han emergido como elementos centrales en la regulación de la función citotóxica de las células NK. En presencia de los adaptadores de la familia SAP, la familia SLAM generalmente media señales que promueven la activación de las células NK, y en su ausencia emite señales que inhiben las funciones de las células NK<sup>[19]</sup>. Este proyecto se enfoca en analizar la expresión de la proteína adaptadora SAP en células NK en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda y determinar si existe relación entre una posible alteración en la expresión de SAP y una disfuncionalidad de las NKs.

## **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

- 1.-¿Existen cambios en los niveles de expresión de SAP en células NK de pacientes con LLA respecto a individuos controles?
- 2.- ¿Una cambio en los niveles de expresión de SAP está asociado a una disfuncionalidad en las NKs en pacientes con LLA?
- 3.- ¿Un cambio en los niveles de expresión de SAP está asociado con el tipo de riesgo de los pacientes con LLA?

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un análisis comparativo de la expresión de SAP en células NK de individuos controles y pacientes pediátricos con LLA, así como determinar si existe asociación entre su disfuncionalidad y alteraciones en dicha proteína.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Analizar la función citotóxica de las células NK en individuos controles y pacientes con LLA.
- 2.- Analizar la expresión de la proteína adaptadora SAP en células NK de individuos controles y pacientes con LLA.
3. Determinar si existe asociación entre cambios en la expresión de la proteína adaptadora SAP con una disfunción de las células NK en pacientes con LLA.
- 4.- Determinar si existe asociación entre cambios de la expresión de SAP y el nivel de riesgo de recaída.

### **3. HIPOTESIS**

Las células NK de pacientes con LLA muestran una disminución en los niveles de expresión de SAP respecto a individuos controles y esta disminución puede asociarse a una disfuncionalidad de las células NK y con el nivel de riesgo de recaída.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

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

#### Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 16 años 11 meses, con diagnóstico de LLA, basado en los criterios de la FAB y el inmunofenotipo.
- Que cuenten con estudio de genética molecular para determinación de los cuatro rearrreglos génicos más frecuentes en 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.

### 9.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOS CONTROLES:

#### Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 16 años 11 meses atendidos en hospitales de primero y segundo nivel, preferentemente de la misma institución (SS, IMSS, ISSSTE, GDF)
- Pareados con los casos en edad y sexo
- 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.

## **9.3 CÉLULAS**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron mediante separación por gradiente de Ficoll-Paque (PREMIUM) y se incubaron a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> (STIK) en medio RPMI enriquecido con FBS al 10% por al menos 12 horas. La línea celular K562 se utilizó como blanco en los ensayos de degranulación.

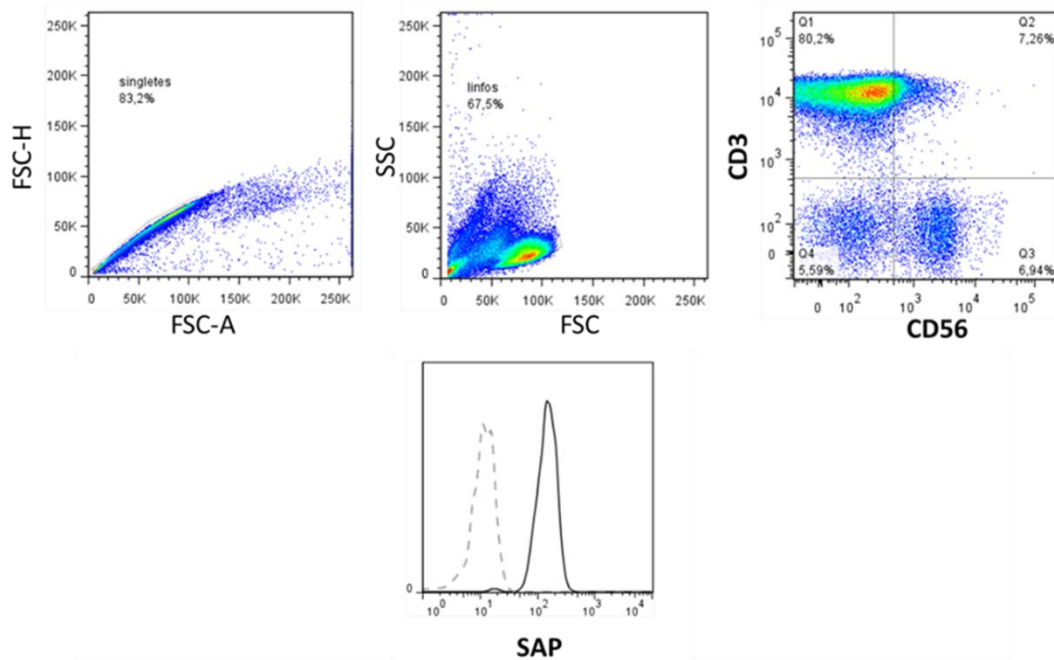
## **9.4 ABS Y ANÁLISIS DE CITOMETRÍA**

Los anticuerpos empleados fueron: anti-CD56 acoplado al fluorocromo APC (Biolegend, clona 5.1H11), anti-CD3 acoplado a PerCP-CY5.5 (Biolegend, clona OKT3), anti-CD107a acoplado a PE (Biolegend, clona H4A3), anti-SAP acoplado a PE (eBioscience, clona XLP-1D12).

Para tinciones de superficie, las células mononucleares se incubaron con anti-CD56 y anti-CD3. Posteriormente fueron fijadas y permeabilizadas de acuerdo a las instrucciones del estuche de tinción intracelular de BD (Cat: 554715). Finalmente, las células se marcaron para SAP. Todas las tinciones fueron realizadas en frío. Las muestras fueron adquiridas en

los citómetros FACS Calibur y FACS Canto II; analizadas en software flowjo. La expresión de SAP fue analizada en la población  $CD56^+CD3^-$ .

### 9.5 ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS DE CITOMETRÍA



**Figura 14: Estrategia para el análisis de citometría de flujo de células PBMCs.** Análisis a partir de población  $CD56^+ CD3^-$ . Histograma representativo de fenotipificación de la proteína SAP.

Para este estudio la estrategia de análisis de citometría, parte de la selección de la región linfocitaria a partir de PBMCs, seguido de la selección de células NK en la población correspondiente a  $CD56^+ CD3^-$ . Una vez seleccionada la población de interés ( $CD56^+ CD3^-$ ), se analizó la expresión de la proteína SAP a través de histograma, tal como se muestra en la Figura 14.



## **9.6 ENSAYOS DE DEGRANULACIÓN**

Para los ensayos de degranulación se utilizó la línea celular K562 como células blanco. Las células mononucleares totales ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) se incubaron con células K562 ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) en placas de 96 pozos por un tiempo de 4 horas a 37 grados centígrados. Posteriormente, las células fueron marcadas para CD3, CD56 y CD107a. El porcentaje de expresión de CD107a se analizó en la población  $\text{CD56}^+\text{CD3}^-$ . Las muestras fueron adquiridas en citómetro FACS calibur y FACS Canto II; analizadas en software flowjo. Los valores de delta CD107a indican el cociente del porcentaje de células NK positivas para CD107a en presencia y ausencia de células K562.

## **9.6 ANÁLISIS DE SAP**

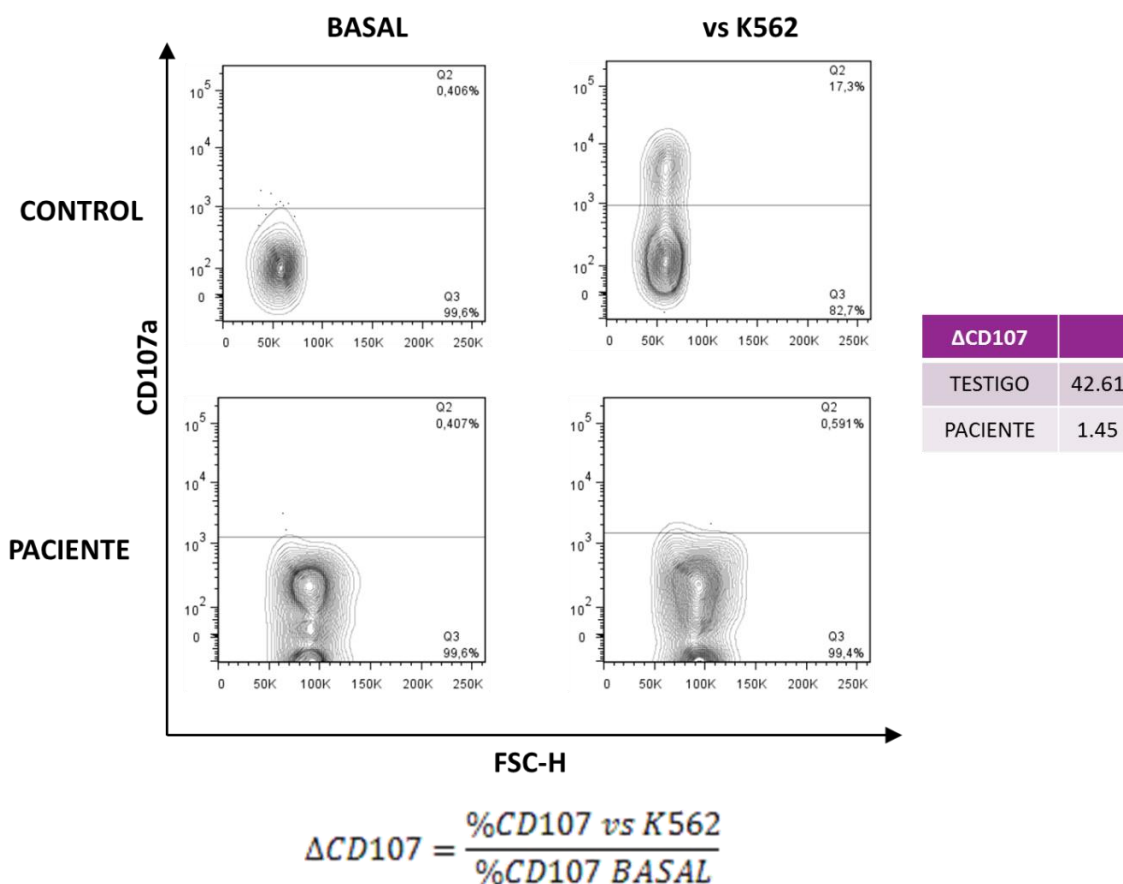
La expresión de SAP se analizó con el porcentaje de células NK positivas para SAP y la intensidad media de fluorescencia normalizada.

## **9.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Debido a la falta de distribución normal en los grupos, se utilizó la prueba estadística no paramétrica para valores independientes, Mann-Whitney con hipótesis de una cola, analizado en el programa Excel con la extensión XLSTAT y las gráficas fueron realizadas en el programa prism. Las barras de las gráficas indican el promedio y la desviación estándar.

## 5. RESULTADOS

Para evaluar el estado funcional de las células NK, se realizaron ensayos de degranulación los cuales se basan en cuantificar el porcentaje de células NK positivas para CD107a. CD107a es un componente de los gránulos citotóxicos y al darse la fusión de estos con la membrana plasmática, CD107 queda expuesto en la superficie celular. Importantemente, existe una correlación positiva entre la expresión de CD107a en la superficie celular con una mayor actividad citotóxica. Para normalizar los porcentajes de las células NK positivas para CD107a en distintas condiciones (sin estímulo vs estímulo) se obtiene el valor de delta CD107, el cual se obtiene a partir de dividir el porcentaje de células NK CD107a<sup>+</sup> en condiciones de estímulo entre el porcentaje de células NK CD107a<sup>+</sup> en condiciones de no estímulo (ver Figura 15).



**Figura 15: Determinación de  $\Delta$ CD107a de células NK de individuo control y paciente con LLA.** Partiendo de una estrategia de análisis de citometría donde se establece un límite

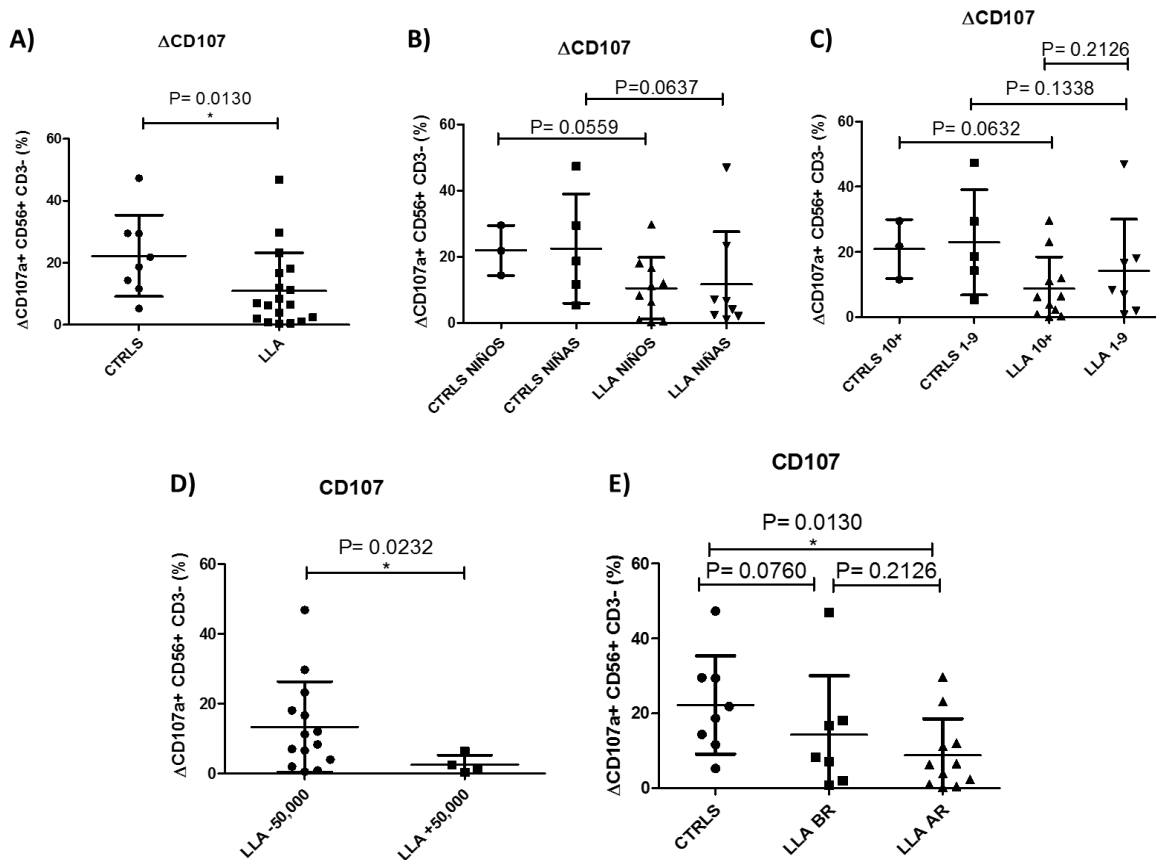
a partir de donde termina el porcentaje de células que degranulan en condición basal, y sustituyendo la fórmula de la imagen con los valores de la degranulación basal y en presencia de K562, se determina el valor de  $\Delta CD107$  de la misma forma en pacientes con LLA que en individuos controles.

Como se observa en la Figura 12, el porcentaje de  $\Delta CD107a$  en células NK estimuladas de individuos controles oscila entre 10 y 40 unidades según lo reportado por Rayne y colaboradores.

## **10.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK EN INDIVIDUOS CONTROLES Y PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON LLA A TRAVÉS DE ENSAYOS DE DEGRANULACIÓN.**

Las células NK, a través de su función citotóxica, son un elemento clave en la inmunidad anti-tumoral. Varios estudios han demostrado que la función citotóxica de las células NK está comprometida en varias enfermedades de carácter maligno, incluidos los varios tipos de leucemia. Rayne y col. (2015) demostraron que en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de recién diagnóstico, la función citotóxica de las NK se encuentra disminuida respecto a controles sanos. Con la finalidad de analizar, la capacidad citotóxica de las células NK en pacientes mexicanos con leucemia linfoblástica aguda, se realizaron ensayos de degranulación utilizando la línea celular k562 como células blanco.

Se obtuvieron muestras de 61 pacientes pediátricos con leucemia de recién diagnóstico y libres de terapias, de los cuáles se descartaron 8 por ser LMA y 12 por no tener suficiente muestra para realizar los ensayos funcionales de las NK y determinar la expresión de SAP. Los 41 pacientes restantes se diagnosticaron como leucemia linfoblástica aguda. Sobre estos 41 pacientes, se evaluó la capacidad citotóxica de la células NK usando la línea celular K562 como célula blanco (ver **Error! Reference source not found.**). Debido a la insuficiente cantidad de muestra, solo a 18 de estos 41 pacientes se les evaluó la expresión de SAP en células NK. De estos 18 pacientes todos fueron LLA de linaje pre-B.



**Figura 16: Evaluación de la capacidad citotóxica de células NK en individuos controles (n=8) y pacientes diagnosticados con LLA pre-B (n=18) ante la línea celular k562.** A) Controles pediátricos y pacientes pediátricos con LLA. B) Grupos según el género, controles y pacientes. C) Agrupación por edad de 1-9 y mayores a 10 años de edad, individuos controles y pacientes. D) Grupo de pacientes con cuenta de leucocitos menor y mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$ . E) Grupo control y clasificación de riesgo de recaída de los pacientes (bajo riesgo: BR y alto riesgo: AR).

Las células NK de pacientes mostraron una capacidad citotóxica significativamente menor que las células NK del grupo control ( $P=0.0130$ ) ver Figura 16 A. Estos resultados son comparables con lo reportado por Rayne y col. 2015, donde reportan con cohorte de 50 pacientes con LLA.

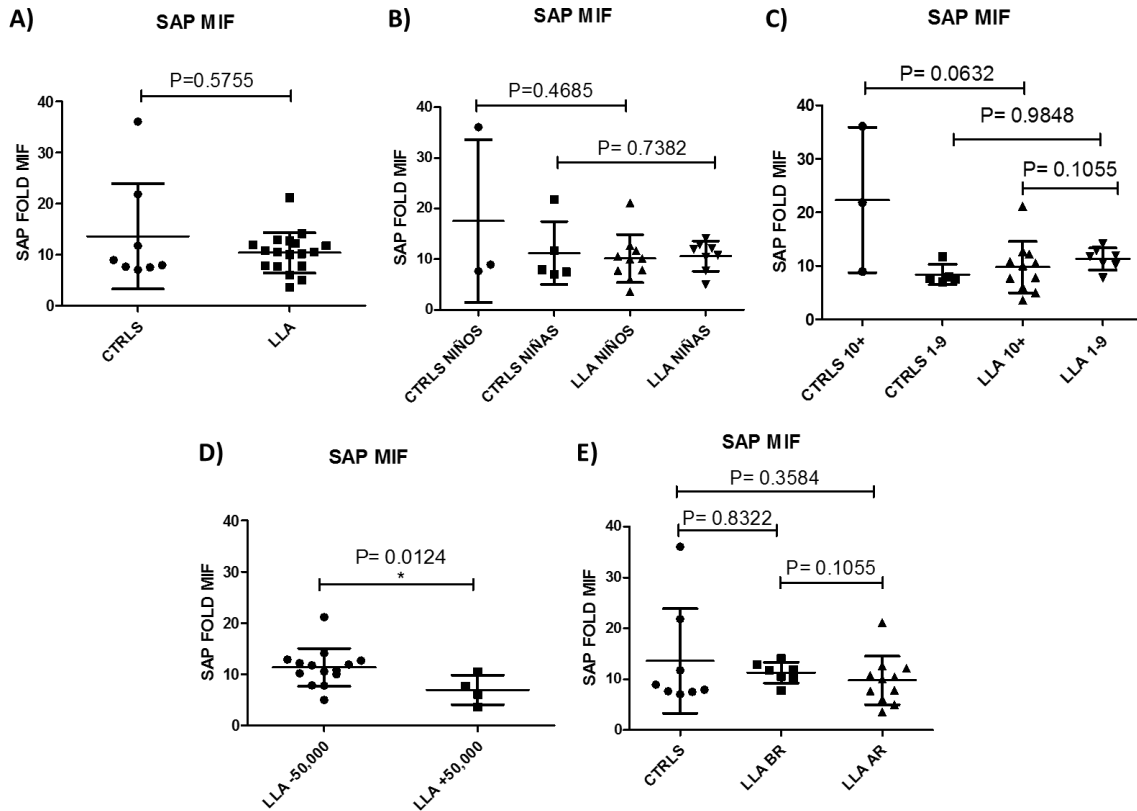
Aquellos pacientes con baja probabilidad de remisión se clasifican como de alto riesgo y aquellos con alta probabilidad se clasifican como de bajo riesgo. Existen distintas variables que determinan la probabilidad de que un paciente con LLA pueda remitir la enfermedad.

Entre otras, son la edad y el número de leucocitos presentes en sangre periférica al momento del diagnóstico. Se ha reportado una mayor incidencia de LLA en niños que en niñas, así como mayor riesgo de recaída, sin embargo, el género no es un factor por el cual se intensifique el tratamiento antineoplásico. Para determinar si la menor actividad citotóxica observada en células NK de pacientes con LLA está en función de estas variables, el porcentaje de células NK positivas para CD107a se analizó en función de la edad, sexo y el número de leucocitos. El resultado de este análisis demuestra que la menor actividad citotóxica observada entre pacientes y controles no está en función de edad ni el sexo (Figura 16 B y C). Interesantemente, la diferencia significativa en el porcentaje de células NK positivas para CD107a observada entre pacientes y controles sí está en función del número de leucocitos presentes en sangre periférica al momento de diagnóstico y que pertenecen al grupo de pacientes clasificados con alto riesgo de recaída (clasificación dada por el hospital en el que el paciente fue atendido) ver Figura 16 D.

Finalmente, los factores antes mencionados y otros más son, con los que en conjunto, se determina el grado de riesgo que tiene el paciente de padecer una recaída durante o después de su tratamiento. Las células NK de aquellos pacientes que han sido clasificados con alto riesgo de recaída, tienen un porcentaje de células NK positivas para CD107a menor que los pacientes clasificados como de bajo riesgo y el grupo control. Este último con una diferencia significativa de  $P=0.0130$  (Figura 16 E).

## **10.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA SAP EN CÉLULAS NK DE INDIVIDUOS CONTROLES Y PACIENTES CON LLA.**

Las proteínas adaptadoras de la familia SAP, son elementos esenciales que determinan la capacidad citotóxica de las células NK para lisar células malignas de origen hematopoyético. Interesantemente, estas mismas proteínas adaptadoras no resultan ser esenciales para lisar células de origen no hematopoyético. Por lo tanto, en este proyecto se decidió determinar la expresión de SAP en células NK de controles sanos y pacientes con LLA al momento del diagnóstico.



**Figura 17: Análisis de la expresión de la proteína SAP en células NK en controles pediátricos y pacientes con LLA-B.** A) Controles pediátricos y pacientes pediátricos con LLA pre-B. B) Clasificación según el género, controles y pacientes. C) Grupos por edad de 1-9 y mayores a 10 años de edad, individuos controles y pacientes. D) Pacientes con cuenta de leucocitos menor y mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$ . E) Grupo control y clasificación de riesgo de recaída de los pacientes (bajo riesgo: BR y alto riesgo: AR).

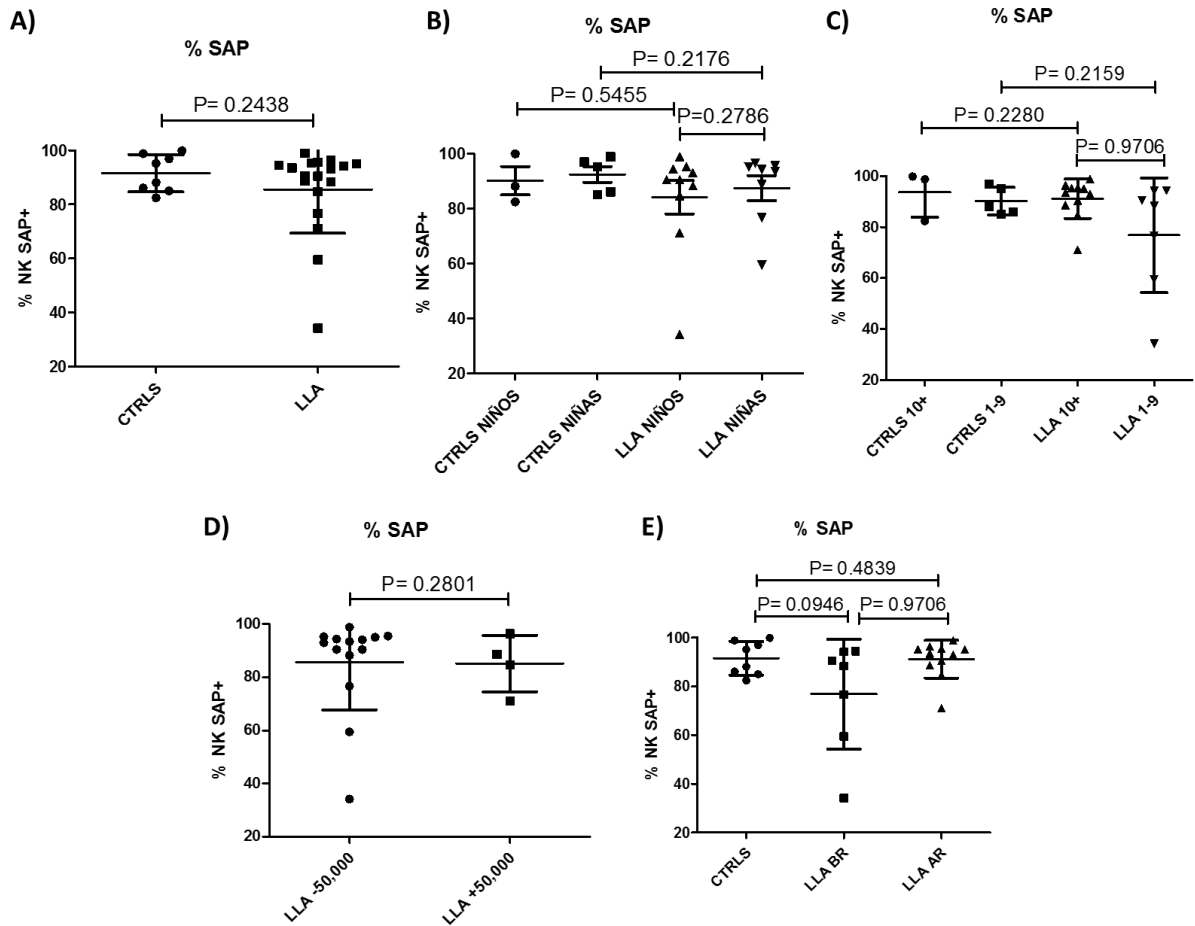
La Figura 17 muestra la expresión de la proteína intracelular SAP en células NK en individuos controles (n=8), así como en pacientes diagnosticados con LLA pre-B (n=18). Las células NK de pacientes con LLA pre-B tienen en promedio, una expresión de SAP similar que el grupo de controles (Figura 17 A). Para determinar si posibles cambios en la expresión de la proteína adaptadora SAP pueden estar en función de distintas variables que influyen en la clasificación y pronóstico de los pacientes tales como la edad, sexo, cuentas leucocitaria y la propia clasificación de riesgo, se reagruparon los datos de acuerdo a dichas variables.

Una vez hecho este análisis, los resultados obtenidos demuestran que posibles cambios en los niveles de expresión de SAP no están en función de la edad ni el sexo de los pacientes con LLA. Interesantemente, los niveles de expresión de SAP son significativamente menor en pacientes con una cuenta leucocitaria mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$  que en pacientes con una cuenta menor a 50,000  $\text{xmm}^3$  ( $p=0.0124$ ). Una cuenta de leucocitos mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$  es un factor que determina un mal pronóstico y por lo tanto a un riesgo de recaída alto. Estos resultados sugieren que una baja expresión de SAP podría contribuir a una baja capacidad citotóxica de las NK de pacientes con LLA (Figura 17 D). Finalmente, comparamos la expresión de SAP en células NK en pacientes de acuerdo a su clasificación de riesgo. Las células NK de pacientes clasificados como de alto riesgo expresan en promedio menos SAP que aquellos que fueron clasificados como bajo riesgo (dato que carece de significancia estadística) ver Figura 17 E.

En su conjunto, estos resultados sugieren que mientras no existe una diferencia en la expresión de SAP en células NK de pacientes con respecto a controles sanos, solo en aquellos pacientes con un número de leucocitos mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$ , existe una disminución significativa en la expresión de SAP en células NK. Estos resultados sugieren que una baja expresión de SAP puede contribuir con una función citotóxica anormal en células NK.

En estudios paralelos, también se evaluó el porcentaje de células NK positivas para la expresión de SAP.





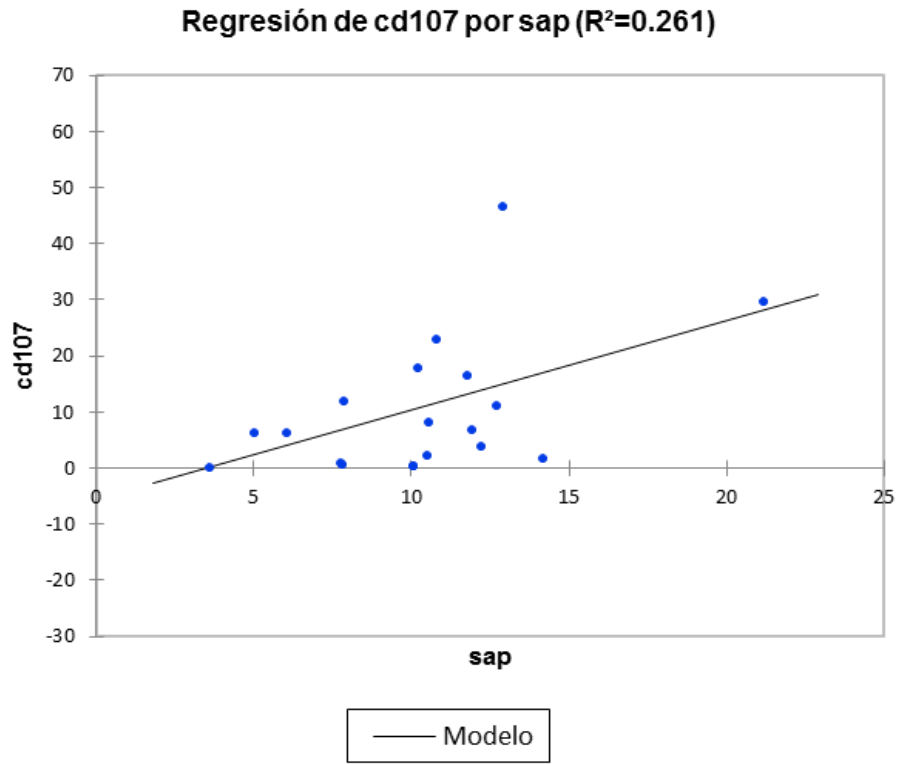
**Figura 18: Porcentaje de células NK que expresan la proteína adaptadora SAP.** A) Controles pediátricos y pacientes pediátricos con LLA pre-B. B) grupos por género en controles y pacientes. C) Grupos de acuerdo a la edad de 1-9 y mayores a 10 años de edad, individuos controles y pacientes. D) Pacientes con cuenta de leucocitos menor y mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$ . E) Grupo control y clasificación de riesgo de recaída de los pacientes (bajo riesgo: BR y alto riesgo: AR).

En controles sanos, el porcentaje de células NK que expresan SAP es alrededor del 100%, mientras que en pacientes el porcentaje de células NK positivas para SAP es arriba de 80%. Interesantemente, se encontraron pacientes con porcentajes debajo del 70% lo que demuestra que existen pacientes que cuyas células NK pierden la expresión de la proteína SAP (Figura 18 A). Al igual que en los análisis anteriores, se analizó el porcentaje de células NK positivas para SAP en función de las variables mencionadas anteriormente. En cuanto al género, el porcentaje de células NK que expresa SAP es similar entre niños y

niñas tanto en controles como en pacientes, salvo 2 valores atípicos por grupo en pacientes (Figura 18 B), mientras que de acuerdo a la edad, el grupo de pacientes de 1-9 años de edad presenta una alta variación en comparación a los tres grupos restantes, en donde el porcentaje de las células NK positivas para SAP en promedio es de 76%, el cual es menor al grupo control equivalente, lo anterior, principalmente debido a los valores atípicos. Sin embargo, las diferencias no son significativas (Figura 18 C). Finalmente el porcentaje de células NK positivas para SAP es similar entre pacientes con una cuenta mayor o menor a  $50,000 \text{ xmm}^3$ . Estos resultados sugieren que disminución en la expresión de SAP en células NK, más que una disminución en el porcentaje de células NK positivas para SAP, puede contribuir con una menor función citotóxica de las células NK en aquellos pacientes con cuentas leucocitarias mayores a  $50,000 \text{ xmm}^3$  (Figura 18 D).

### **10.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA SAP CON UNA DISMINUCIÓN EN LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK EN PACIENTES CON LLA.**

Se analizó la asociación entre la expresión de la proteína SAP y la capacidad efectora de las células NK en pacientes pediátricos con LLA mediante análisis de regresión lineal simple. Interesantemente, encontramos que existe una asociación positiva baja ( $r^2=0.261$ ) entre estas dos variables y además es estadísticamente significativo ( $P= 0.030$ ).



**Figura 19: Gráfica de dispersión de puntos. Asociación entre SAP y CD107.**

## 6. DISCUSIÓN

En este proyecto se determinó la función citotóxica de las células NK en pacientes pediátricos con LLA de recién diagnóstico (n=41). Adicionalmente, se analizó la expresión de la proteína intracelular SAP (n=18). En modelos murinos, la proteína adaptadora SAP determina la capacidad de las células NK para eliminar células malignas de origen hematopoyético. Por lo tanto en este trabajo se determinó si posibles alteraciones en la expresión de la proteína adaptadora SAP pueden asociarse con un estado funcional de las células NK [26].

La leucemia linfoblástica aguda es uno de los cánceres más frecuentes en la población infantil. Consiste en la producción acelerada de células linfoides, causando diversas complicaciones en los pacientes. En condiciones de equilibrio las células NK son capaces de eliminar células malignas hematopoyéticas, sin embargo, se ha reportado que el ambiente que generan los blastos de LLA-B, es capaz de inducir un fenotipo inhibitorio en las células NK. Algunas alteraciones en el fenotipo de las células NK incluyen la disminución en la expresión de receptores de activación como NKP46, y la sobre expresión de receptores de inhibición como NKG2A. En consecuencia, la función citotóxica de las células NK se ve disminuida respecto a individuos sanos. [38].

En éste proyecto, encontramos que efectivamente, tal y cómo reporta Rayne H Rouce y colaboradores, las células NK de pacientes con LLA (pre-B) al momento del diagnóstico, tienen una baja capacidad lítica ante la línea celular k562 en comparación con el grupo control (P=0.0130). Además se encontró que la actividad lítica de estas células está asociada con algunos factores de riesgo. Mientras una baja respuesta citotóxica observada en células NK de pacientes con LLA, no depende de género ni la edad, ésta sí está en función del tipo de riesgo y la cuenta inicial leucocitaria en sangre periférica. Específicamente, pacientes con una cuenta mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$  leucocitos tienen una actividad lítica muy baja con respecto a pacientes con cuenta inicial de leucocitos por debajo de 50,000  $\text{xmm}^3$  (P=0.0232). Estos datos, concuerdan con el mal pronóstico que tienen los pacientes mayores de 10 años de edad y una cuenta de leucocitos inicial mayor a 50,000  $\text{xmm}^3$ . Este último dato sugiere que, el aumento descontrolado de células

leucocitarias pudiera deberse a la baja capacidad efectora que presentan las células NK en dichos pacientes y cómo resultado de su ineficiencia, se favorece la proliferación de células malignas lo que conlleva a un mal pronóstico. De manera general, también puede verse una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad citotóxica de las células NK del grupo control y el grupo de pacientes clasificados como alto riesgo ( $P=0.0130$ ). Estos resultados en su conjunto sugieren que el estado funcional de las células NK es un indicador confiable de un mal o buen pronóstico del paciente.

La función de las células NK está regulada por un balance muy delicado entre las señales de activación y de inhibición [10,40]. Existen varios elementos que determinan si las señales que emanan de los receptores de superficie celular son mayoritariamente de activación o inhibición. Uno de estos elementos, son las proteínas adaptadoras de la familia SAP. Estudios en modelos murinos indican que una ausencia en la expresión de la proteína SAP compromete la capacidad citotóxica de las células NK para eliminar células malignas de origen hematopoyético. Actualmente se desconoce si este escenario es plausible en manifestaciones patológicas como las leucemias. En base a lo anterior, se determinó analizar la expresión de la proteína adaptadora SAP en células NK de pacientes con LLA al momento del diagnóstico.

La expresión de la proteína adaptadora SAP en células NK se determinó en cuanto a su expresión por célula (denotado como la intensidad media de fluorescencia) y el porcentaje de células NK que expresan dicha proteína. Nuestros resultados mostraron que no se encontró diferencia estadística en la expresión de la proteína SAP en las células NK entre el grupo control y el grupo de pacientes. La expresión de SAP fue similar en función del género y la edad entre los pacientes y los controles sanos. Sin embargo el grupo de pacientes varones y el grupo de pacientes mayor a 10 años de edad, expresan ligeramente menos SAP que el grupo de pacientes niñas y el grupo de 1-9 años de edad respectivamente, aunque esta diferencia no fue significativa. De manera interesante, al igual que en la degranulación, el grupo de pacientes con una cuenta inicial de leucocitos mayor a  $50,000 \text{ xmm}^3$  tienen una expresión de SAP muy baja en comparación al grupo con cuenta menor a  $50,000 \text{ xmm}^3$  ( $P=0.0124$ ). Estos datos sugieren que en las células NK de pacientes con cuenta leucocitaria mayor a  $50,000 \text{ xmm}^3$ , tienen una baja expresión de SAP y que

como resultado de esta baja expresión puede favorecer el reclutamiento de fosfatasa inhibitorias con los receptores de la familia SLAM. Lo anterior a su vez puede favorecer en la inhibición o reducción de la capacidad citotóxica de la célula NK [26]. De manera general, las células NK de pacientes clasificados como alto riesgo expresan en promedio menos SAP que aquellos que fueron clasificados como bajo riesgo (aunque carece de significancia estadística).

Se ha demostrado que en pacientes con síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X, los receptores 2B4 y NTB-A median señales inhibitorias en las células NK, debido a la ausencia de la proteína SAP y la interacción de estos receptores con sus respectivos ligandos en las células blanco infectadas por el virus de Epstein-Barr [41]. Así como la falta absoluta de la proteína SAP en células NK pueden enviar señales inhibitorias [26,41], una baja densidad de ésta, también permite que el sitio citoplasmático de los receptores SLAM interactúe con fosfatasa inhibitorias [18].

Esta disminución en la expresión de la proteína SAP, pudiera deberse a un microambiente rico en citocinas, generado por las células malignas, que conducen al fenotipo inhibitorio a la célula NK, como bien se ha reportado para algunos receptores de superficie[38].

Interesantemente, encontramos que existe una asociación positiva baja ( $r^2=0.261$ ) entre la expresión de la proteína adaptadora SAP y la capacidad citotóxica de las células NK de pacientes pediátricos con LLA y además es estadísticamente significativo ( $P= 0.030$ ). Lo anterior demuestra que la disminución en la expresión de SAP influye ligeramente en la disminución de la capacidad citotóxica de las células NK en pacientes pediátricos con LLA ya que la actividad lítica de las células NK dependen de muchas señales de activación e inhibición.

Por otro lado no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células NK SAP<sup>+</sup>, entre el grupo control y grupo de pacientes. No obstante se identificaron 4 valores atípicos en el grupo de pacientes cuyo porcentaje de células NK SAP<sup>+</sup> fue por debajo del promedio, todos ellos con baja capacidad citotóxica; sin embargo, dos de ellos tuvieron una buena respuesta al tratamiento esteroideo y los otros dos además de presentar mala respuesta a la ventana esteroidea, tuvieron falla en la inducción a la remisión y uno de ellos sufrió

recaída en medula ósea y falleció de choque séptico. De manera interesante, tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se agruparon según el género o cuenta de leucocitos; además, las diferencias encontradas en la clasificación por edad y de riesgo, se debe principalmente a los valores atípicos antes mencionados.

De ésta manera, podemos decir que la proteína adaptadora SAP contribuye a regular la función citotóxica de las células NK y alteraciones en su expresión puede contribuir a un mal funcionamiento de las células NK que favorezca una eliminación inadecuada de células malignas en pacientes con LLA,

## **7. CONCLUSIONES**

- 1.- Las células NK de pacientes con LLA presentan una capacidad citotóxica disminuida respecto al grupo control.
- 2.- No existen diferencias significativas en los niveles de expresión de SAP en células NK de pacientes diagnosticados con LLA respecto al grupo control.
- 3.- Existe una asociación positiva baja entre la expresión de la proteína adaptadora SAP y la capacidad citotóxica de las células NK de pacientes pediátricos con LLA y además es estadísticamente significativo ( $P= 0.030$ ).
- 4.- La cuenta inicial de leucocitos es el único factor de pronóstico asociado con un bajo nivel de expresión de SAP en células NK.

## **8.-PERSPECTIVAS**

- ✓ Aumentar el número de controles
- ✓ Evaluar el efecto del microambiente tumoral, a través del suero sanguíneo de pacientes con LLA, en la citotoxicidad y expresión de SAP en células NK de individuos sanos, para determinar si es el responsable de la disminución en la expresión de SAP en dichos pacientes.



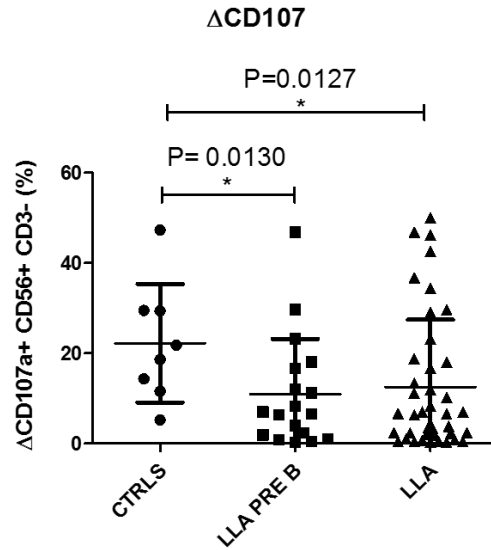
## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Fajardo Gutiérrez A, Mejía Aranguré M, Gómez Delgado A, Mendoza Sánchez H, Garduño Espinosa J, Martínez García MdC. Epidemiología de las neoplasias malignas en niños residentes del Distrito Federal (1982-1991). *Bol méd Hosp Infant Méx* 1995;52:507-516.
- [2] Jaime-Pérez JC, López-Razo ON, García-Arellano G, Pinzón-Uresti MA, Jiménez-Castillo RA, González-Llano O, et al. Results of treating childhood acute lymphoblastic leukemia in a low-middle income country: 10 year experience in northeast Mexico. *Archives of medical research* 2016;47:668-676.
- [3] Trigg ME, Sather HN, Reaman GH, Tubergen DG, Steinherz PG, Gaynon PS, et al. Ten-year survival of children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1142-1154.
- [4] Manuel Alfredo Ortega Sánchez MLOO, José Vicente Rosas Barrientos. Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México* 2007;23:26-33.
- [5] Labardini J, Cervera E, López O, Corrales C, Balbuena M, Barbosa A. Oncoguía Leucemia Linfoblástica Aguda. *Cancerología* 2011:111-115.
- [6] Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *New England Journal of Medicine* 2015;373:1541-1552.
- [7] Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics* 2009;23:655-674.
- [8] Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Current opinion in hematology* 2012;19:313-318.
- [9] Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010;115:3206-3214.
- [10] Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003;15:308-314.
- [11] Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004;306:1517-1519.
- [12] Cruz-Munoz ME, Dong Z, Shi X, Zhang S, Veillette A. Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nat Immunol* 2009;10:297-305.
- [13] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 2001;22:633-640.
- [14] Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cellular immunology* 2009;254:149-154.
- [15] Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunology letters* 2007;108:10-19.
- [16] Vahlne G, Becker S, Brodin P, Johansson M. IFN- $\gamma$  Production and Degranulation are Differentially Regulated in Response to Stimulation in Murine Natural Killer Cells. *Scandinavian journal of immunology* 2008;67:1-11.
- [17] van Driel BJ, Liao G, Engel P, Terhorst C. Responses to Microbial Challenges by SLAMF Receptors. *Frontiers in Immunology* 2016;7:4.

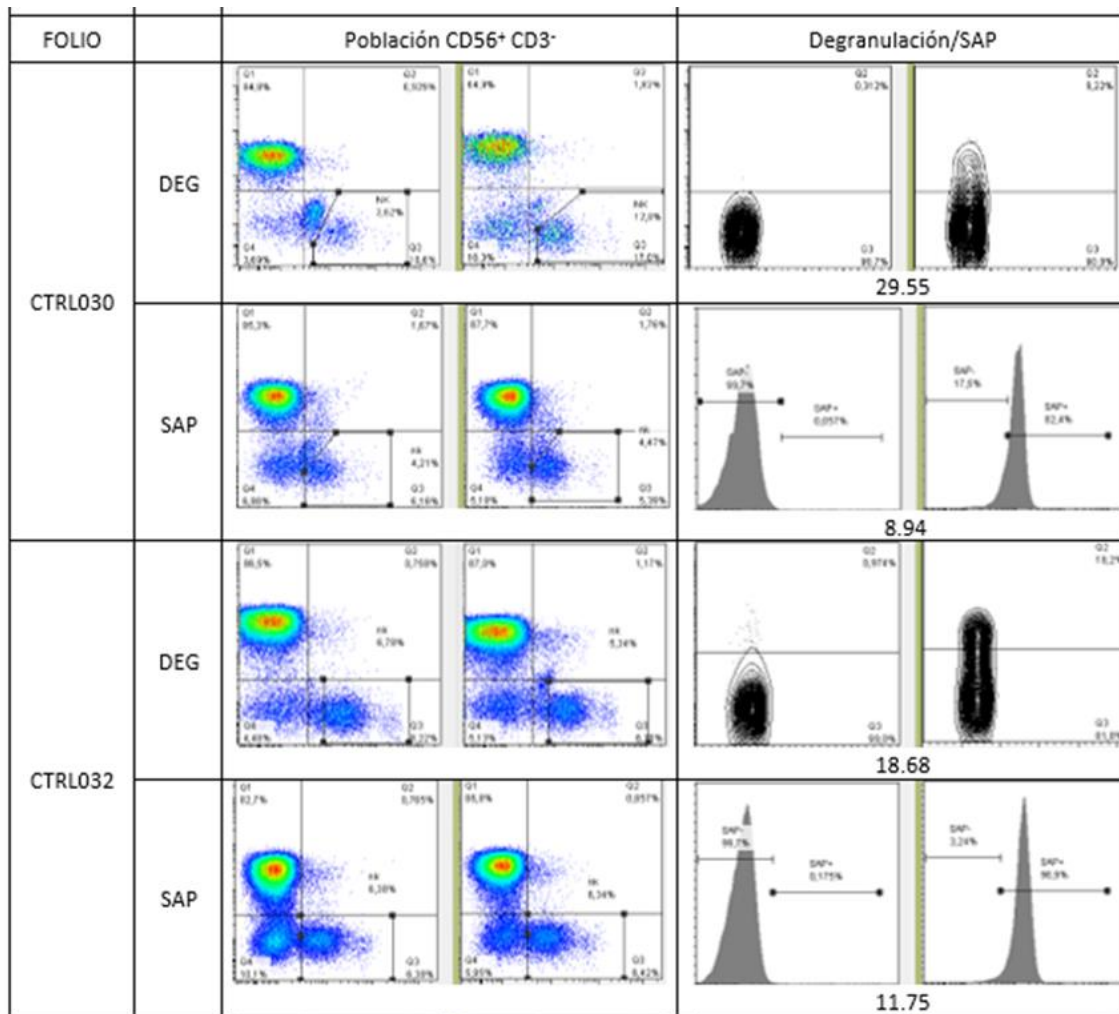
- [18] Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol* 2016;38:45-51.
- [19] Veillette A. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a002469.
- [20] Sidorenko SP, Clark EA. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol* 2003;4:19-24.
- [21] Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6:56-66.
- [22] Calpe S, Erdos E, Liao G, Wang N, Rietdijk S, Simarro M, et al. Identification and characterization of two related murine genes, *Eat2a* and *Eat2b*, encoding single SH2-domain adapters. *Immunogenetics* 2006;58:15-25.
- [23] Dupre L, Andolfi G, Tangye SG, Clementi R, Locatelli F, Arico M, et al. SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* 2005;105:4383-4389.
- [24] Hislop AD, Palendira U, Leese AM, Arkwright PD, Rohrlisch PS, Tangye SG, et al. Impaired Epstein-Barr virus-specific CD8+ T-cell function in X-linked lymphoproliferative disease is restricted to SLAM family-positive B-cell targets. *Blood* 2010;116:3249-3257.
- [25] Dong Z, Davidson D, Perez-Quintero LA, Kurosaki T, Swat W, Veillette A. The adaptor SAP controls NK cell activation by regulating the enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by enhancing conjugates with target cells. *Immunity* 2012;36:974-985.
- [26] 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;10:973-980.
- [27] Zhao F, Cannons JL, Dutta M, Griffiths GM, Schwartzberg PL. Positive and negative signaling through SLAM receptors regulate synapse organization and thresholds of cytotoxicity. *Immunity* 2012;36:1003-1016.
- [28] Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998;395:462-469.
- [29] Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 2009;9:39-46.
- [30] Ma CS, Nichols KE, Tangye SG. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 2007;25:337-379.
- [31] Veillette A, Dong Z, Latour S. Consequence of the SLAM-SAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes. *Immunity* 2007;27:698-710.
- [32] Veillette A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunol Rev* 2006;214:22-34.
- [33] Tassi I, Colonna M. The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol* 2005;175:7996-8002.
- [34] Bouchon A, Cella M, Grierson HL, Cohen JI, Colonna M. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* 2001;167:5517-5521.

- [35] Arase H, Suenaga T, Arase N, Kimura Y, Ito K, Shiina R, et al. Negative regulation of expression and function of Fc gamma RIII by CD3 zeta in murine NK cells. *J Immunol* 2001;166:21-25.
- [36] Jevremovic D, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2. *J Immunol* 2001;166:7219-7228.
- [37] Galandrini R, Tassi I, Morrone S, Lanfrancone L, Pelicci P, Piccoli M, et al. The adaptor protein shc is involved in the negative regulation of NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2001;31:2016-2025.
- [38] 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;30:800.
- [39] Rizo-Ríos P, Sánchez-Cervantes F, González-Rivera A, Betancourt-Cravioto M, Meneses-García A, Mohar A, et al. Mortalidad por leucemias en menores de 20 años: México 1998-2002. *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 2005;62:9-18.
- [40] Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004;306:1517-1519.
- [41] Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, et al. Gntb-A, a Novel Sh2d1a-Associated Surface Molecule Contributing to the Inability of Natural Killer Cells to Kill Epstein-Barr Virus-Infected B Cells in X-Linked Lymphoproliferative Disease. *Journal of Experimental Medicine* 2001;194:235-246.

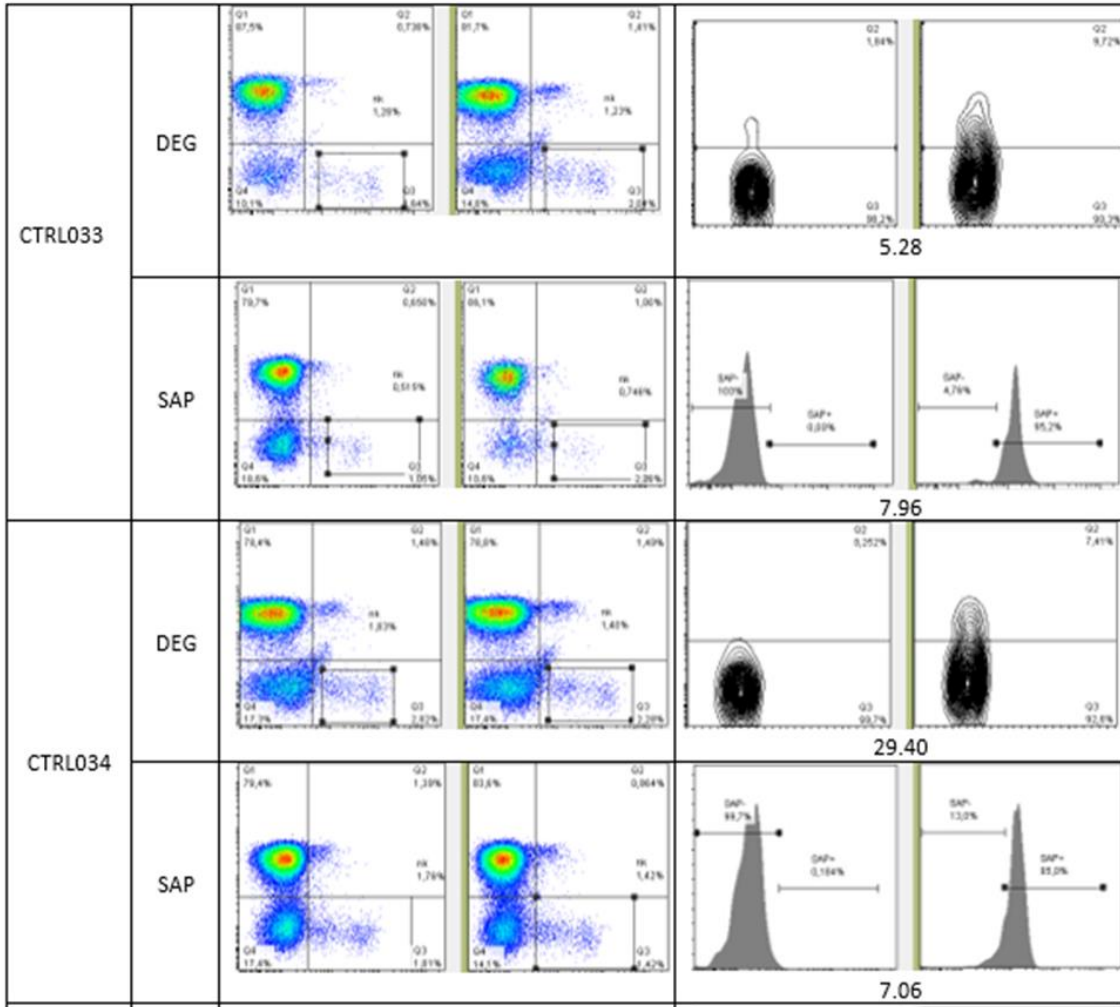
## 1. ANEXOS



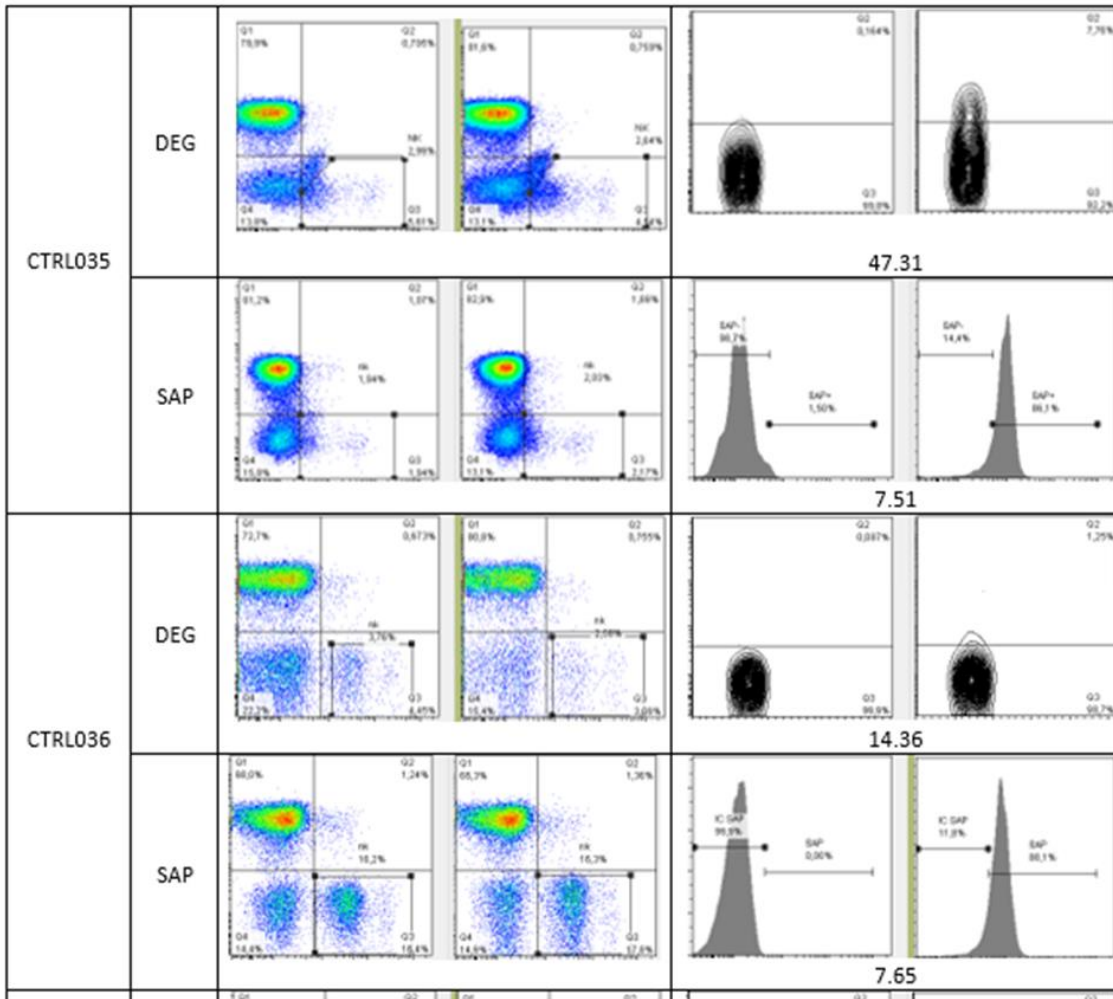
Anexo 1: Evaluación de capacidad lítica de células NK de individuos controles, pacientes diagnosticados con LLA pre-B (n=18) y pacientes con LLA de linaje B y T (n=41).



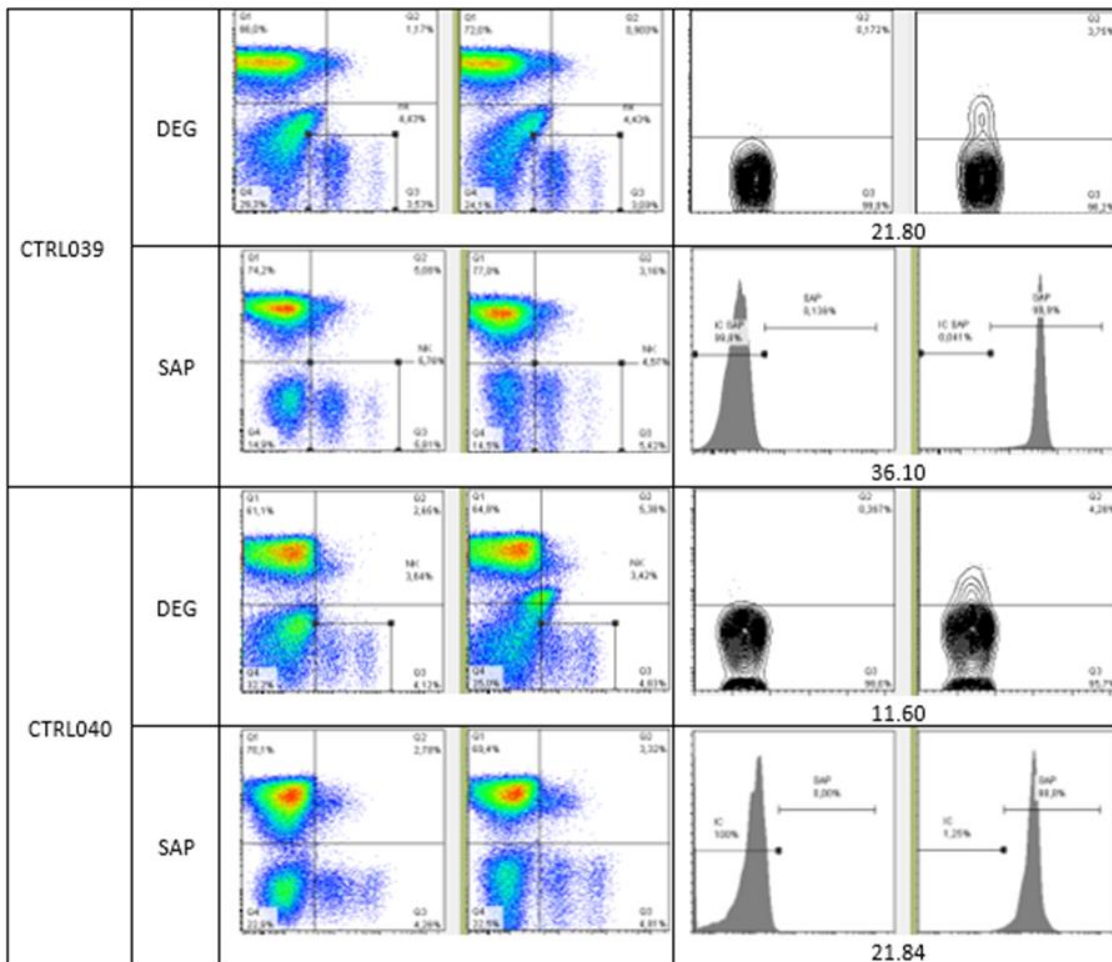
Anexo 2: Estrategia de gating, grupo control (n=8) Selección de población NK CD56+ CD3-; degranulación y expresión de SAP.



Anexo 2: Estrategia de gating, grupo control (n=8) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.

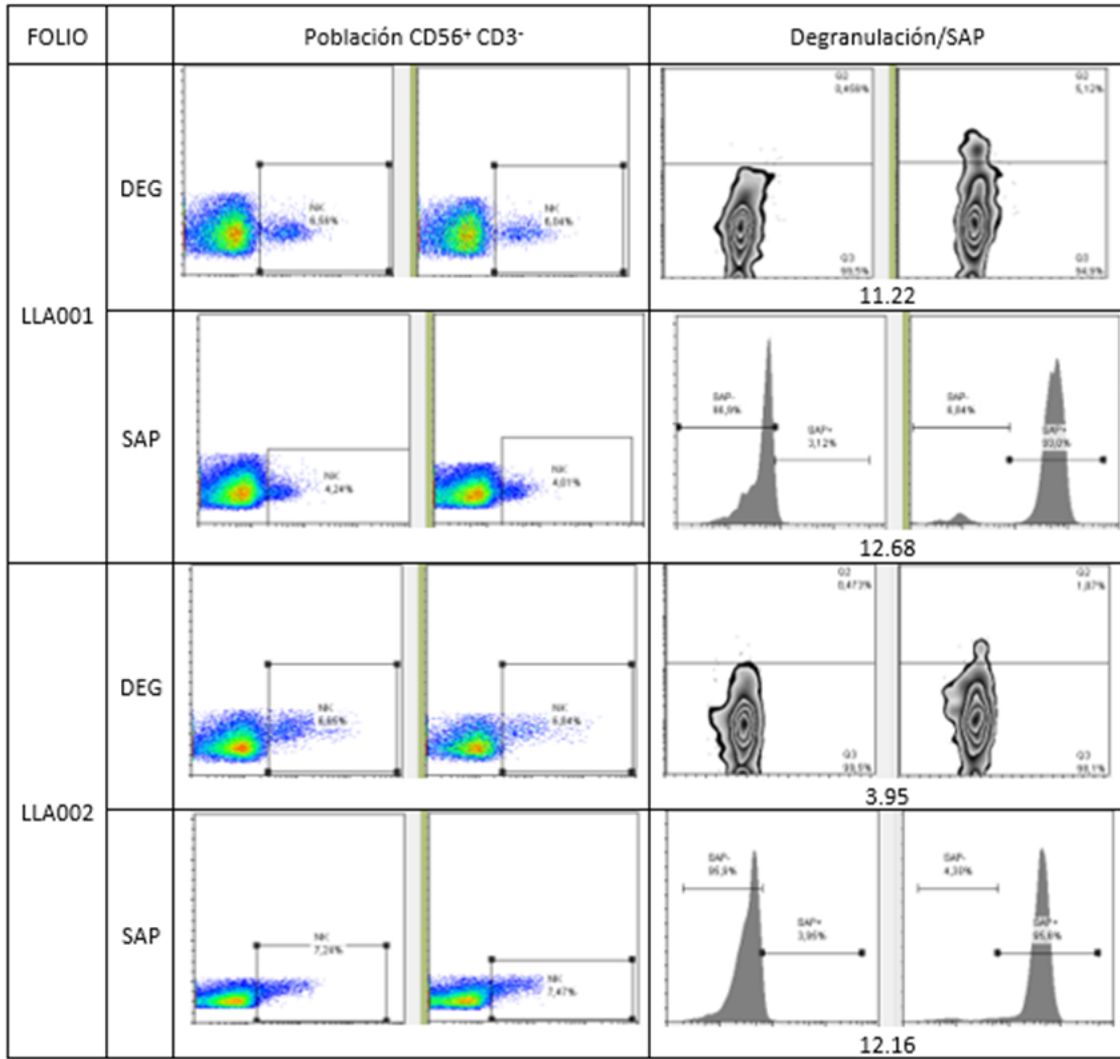


Anexo 2: Estrategia de gating, grupo control (n=8) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.

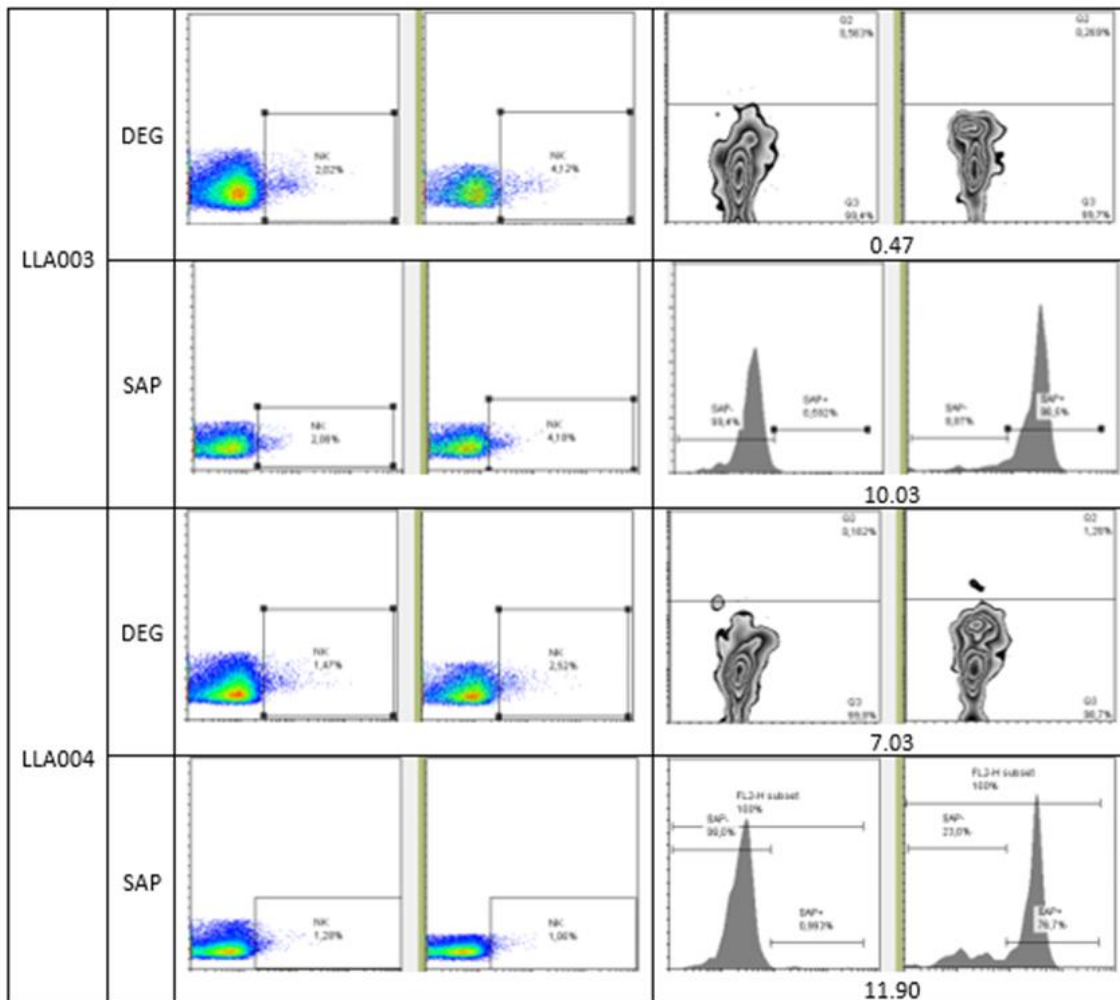


Anexo 2: Estrategia de gating, grupo control (n=8) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.

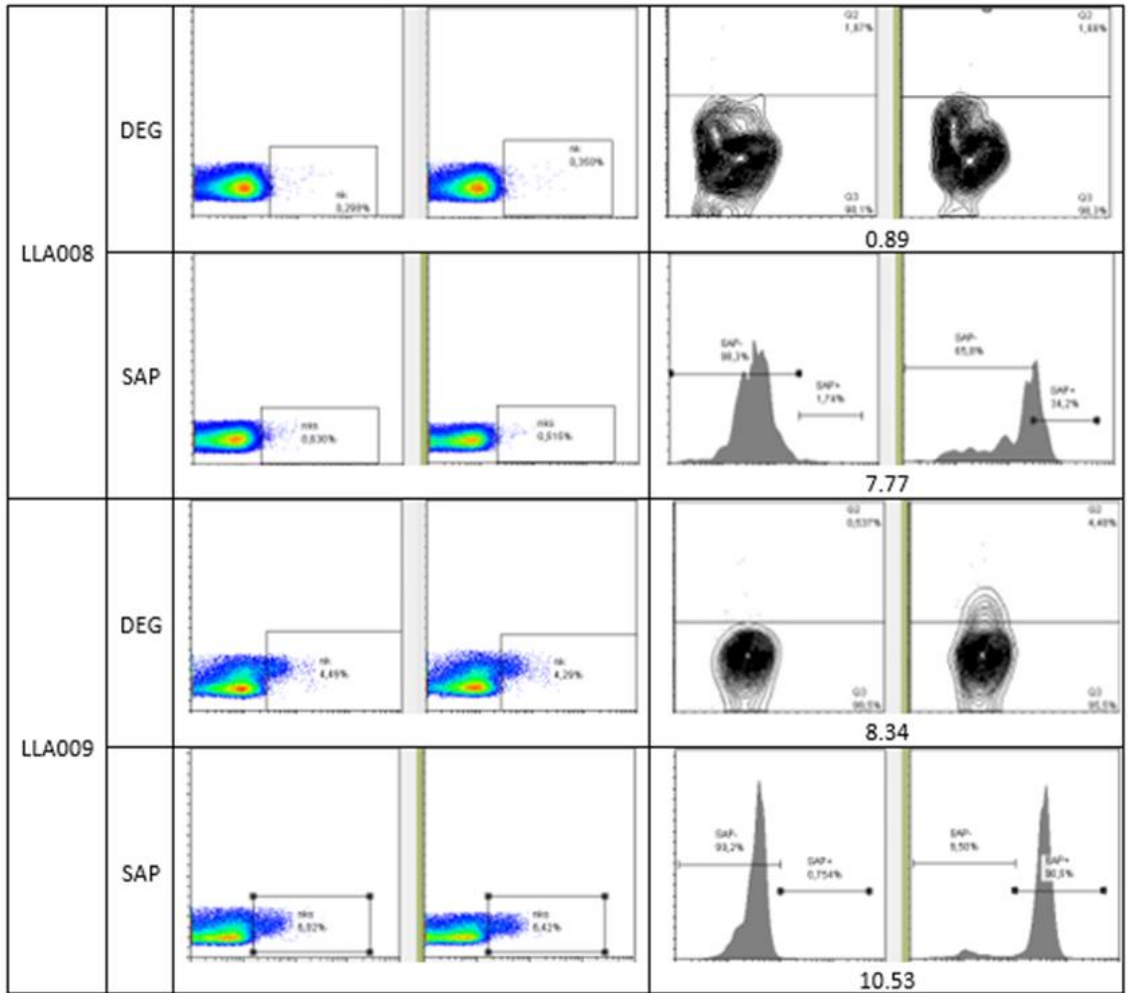




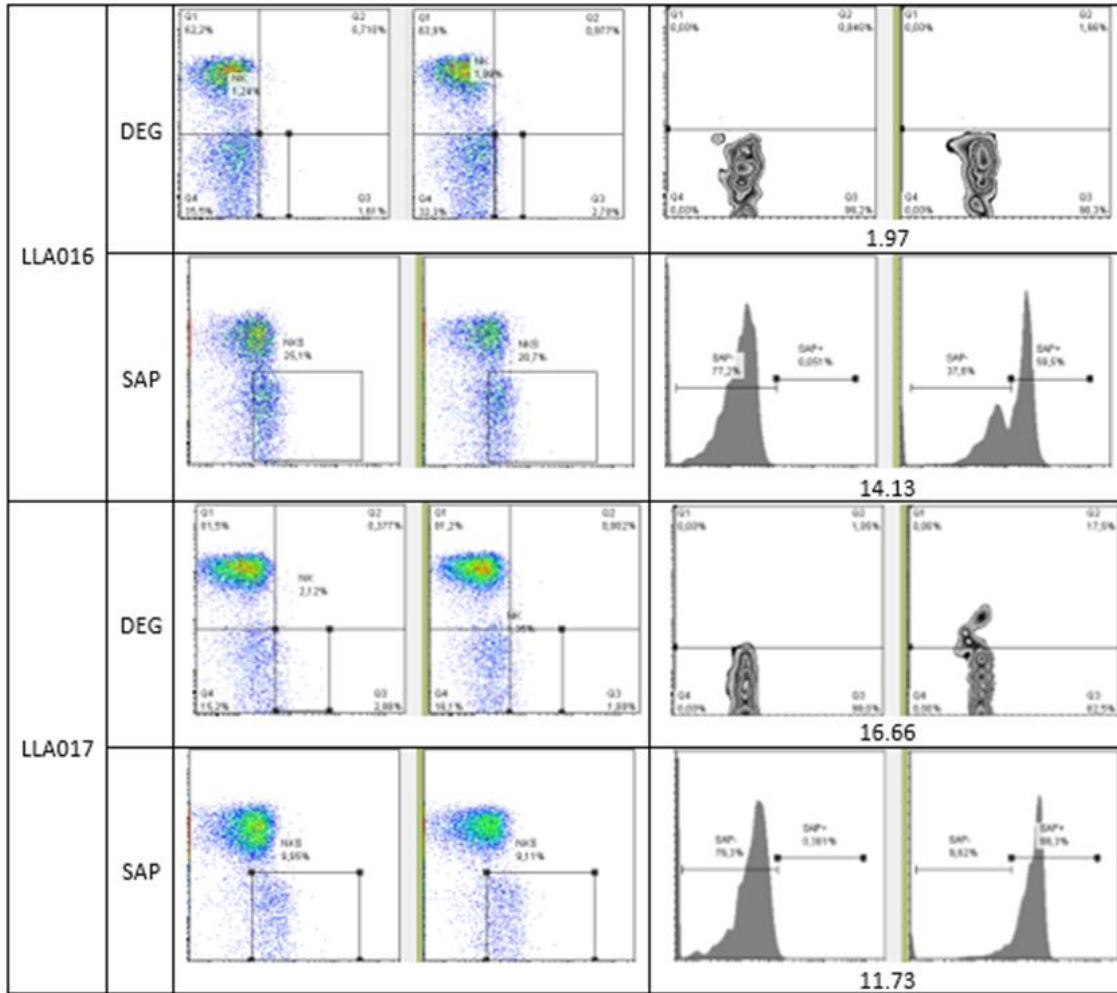
Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.



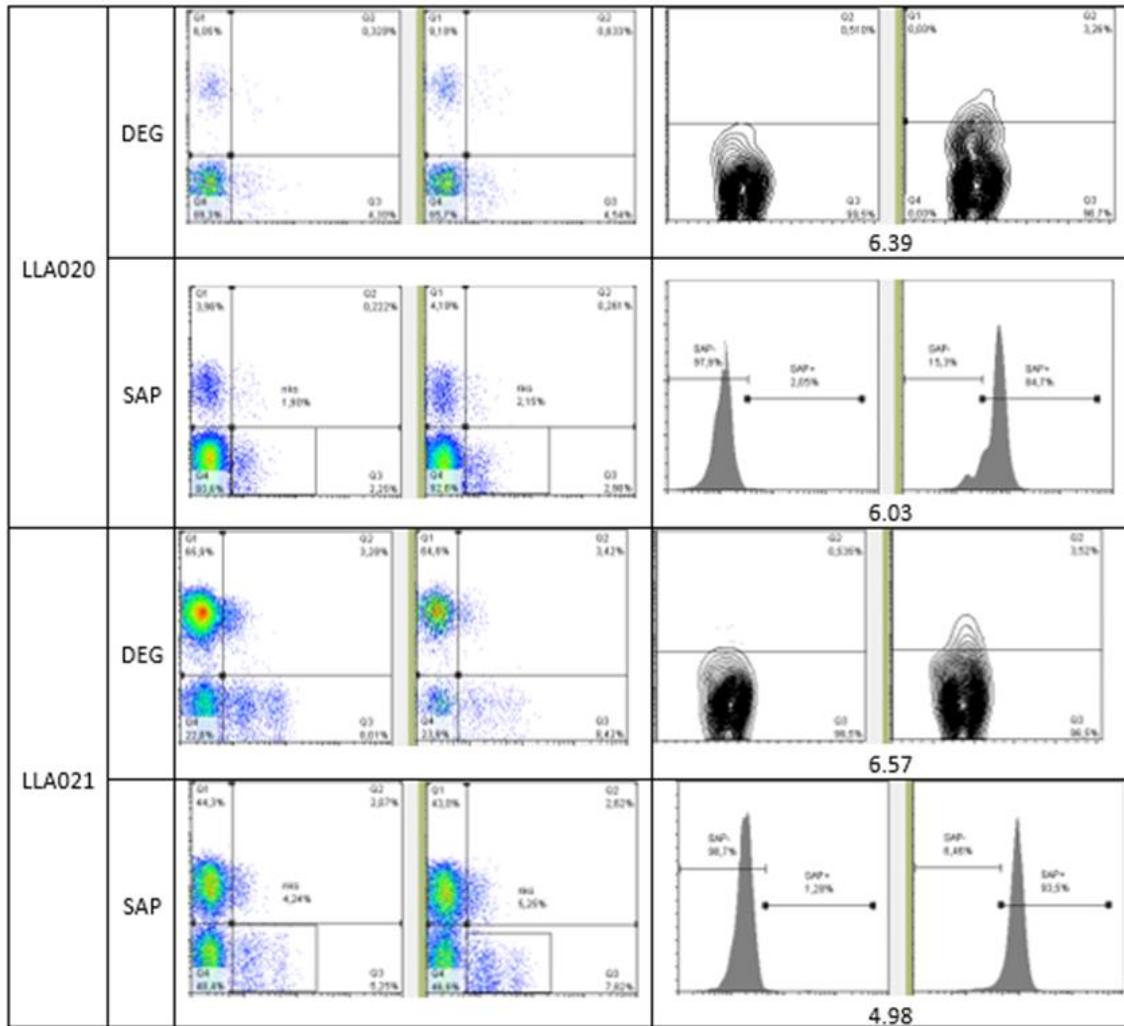
Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.



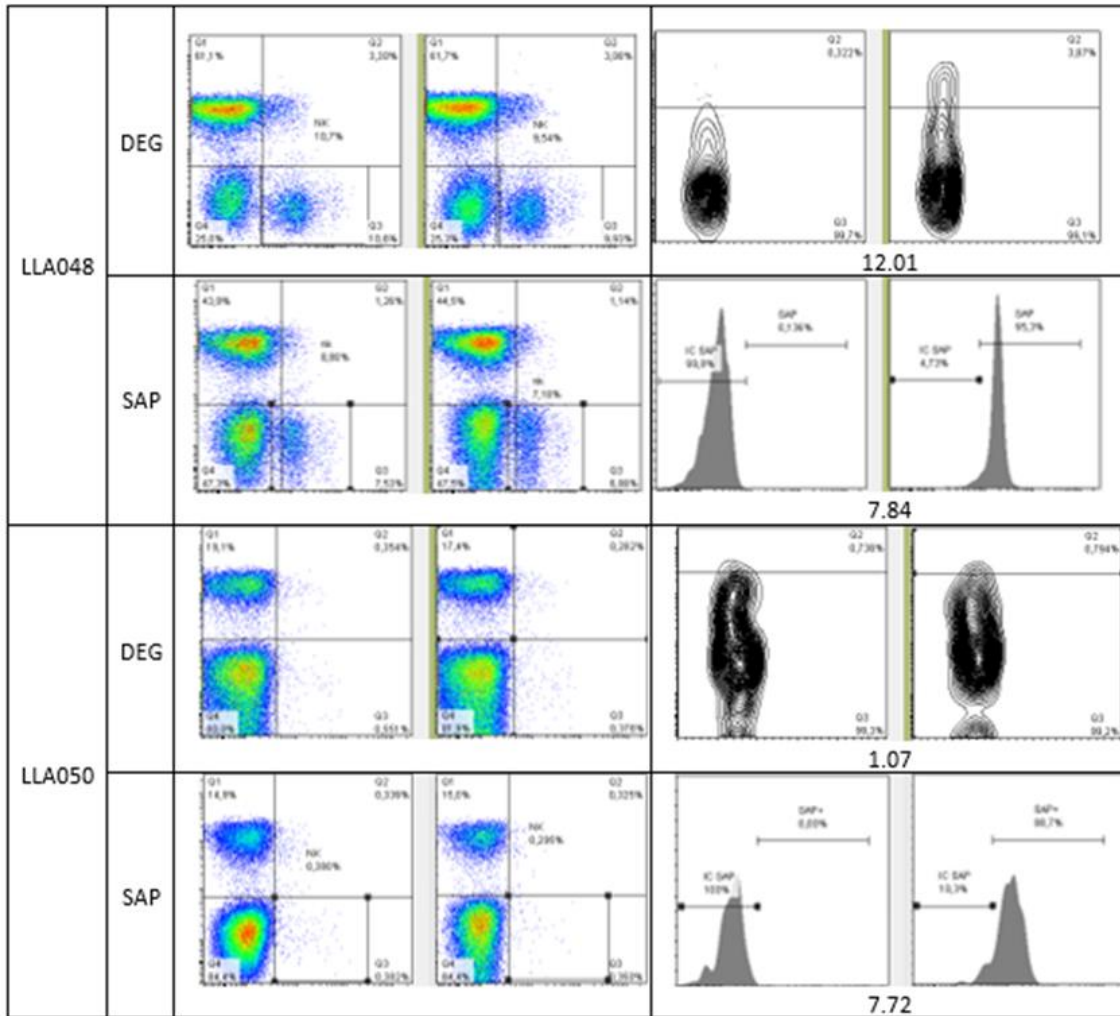
Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.



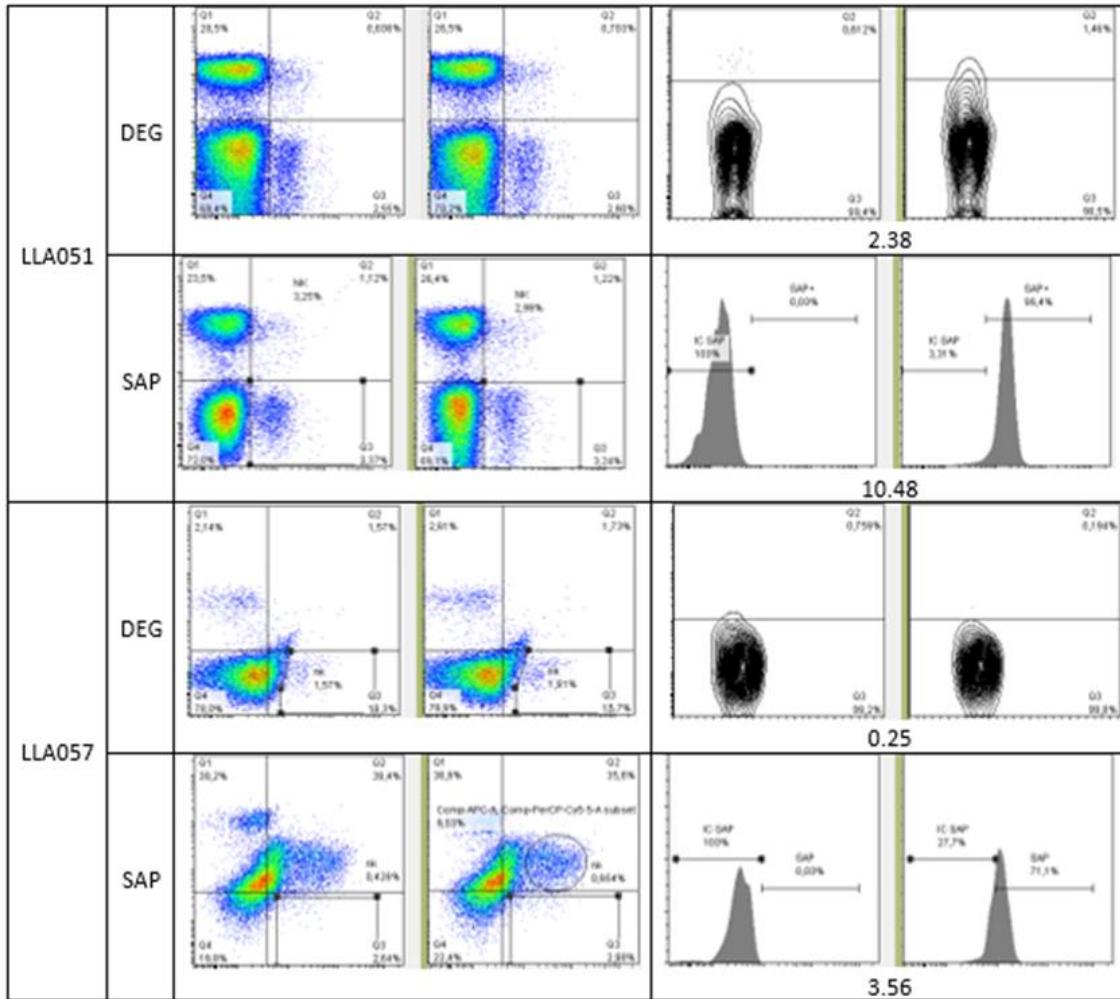
Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.



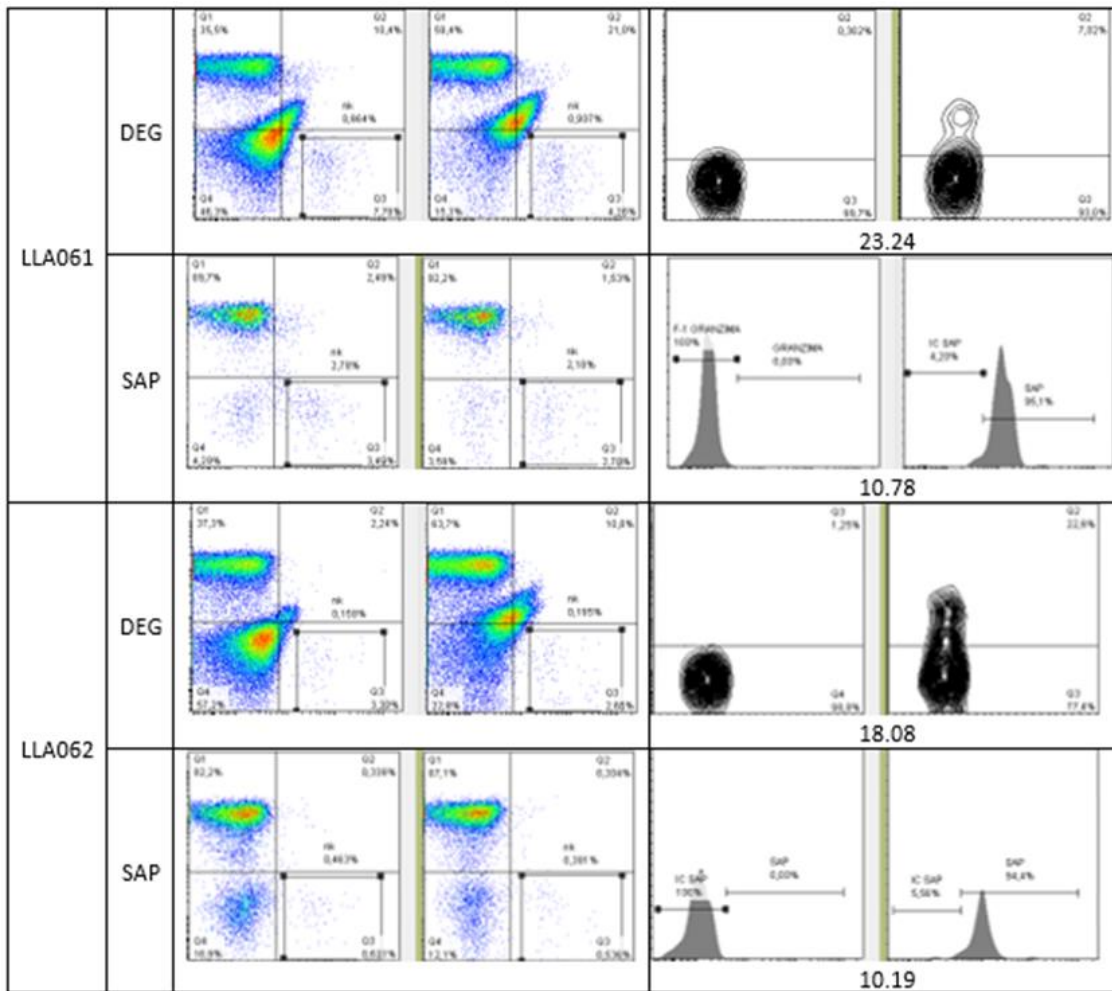
Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>; degranulación y expresión de SAP.



Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.

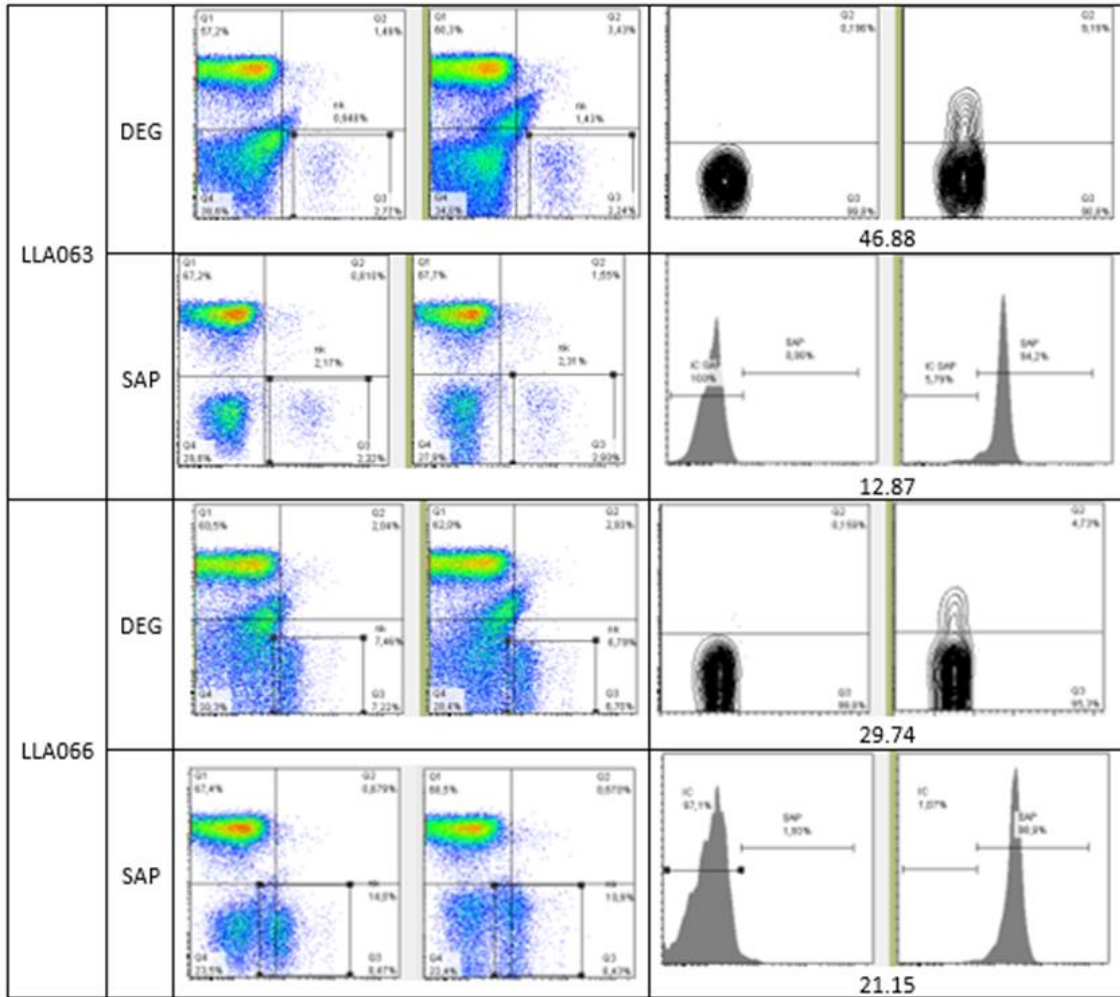


Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>; degranulación y expresión de SAP.



Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.





Anexo 2: Estrategia de gating, grupo de pacientes (n=18) Selección de población NK CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>; degranulación y expresión de SAP.

| FOLIO  | RIESGO | INMUNOFENOTIPO | CLASIFICACION MORFOLÓGICA FAB | CUENTA DE LEUCOS EN SP | % DE BLASTOS EN MO AL DX | RESULTADO DE REARREGLO | SEXO | EDAD (MESES) | ΔCD107 | SAP FOLD MIF | % DE CÉLULAS NK SAP* | CITOMETRO     | RESPUESTA A LA VENTANA ESTEROIDEA | FALLA A LA INDUCCIÓN | TRATAMIENTO ADICIONAL A LA REMISIÓN | RECAÍDA | SITIO DE LA RECAÍDA | MUERTE | CAUSA DE MUERTE   |
|--------|--------|----------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|------|--------------|--------|--------------|----------------------|---------------|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------------|---------|---------------------|--------|---|
| Ila001 | 1      | PRE B          | L2                            | 9,600                  | 98                       | No detectados          | 0    | 187          | 11.22  | 12.68        | 93                   | FACS Calibur  | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila003 | 1      | PRE B          | L1                            | 6,760                  | 95                       | No detectados          | 0    | 165          | 0.47   | 10.03        | 90.5                 | FACS Calibur  | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila008 | 0      | PRE B          | L1                            | 4,960                  | 83                       | No detectados          | 0    | 79           | 0.89   | 7.77         | 34.2                 | FACS Calibur  | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila009 | 0      | PRE B          | L1                            | 5,200                  | 97                       | No detectados          | 0    | 46           | 8.34   | 10.53        | 90.5                 | FACS Calibur  | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila017 | 0      | PRE B          | L1                            | 10,600                 | 90                       | No detectados          | 0    | 59           | 16.66  | 11.73        | 88.3                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila020 | 1      | PRE B          | L1                            | 92,100                 | 100                      | No detectados          | 0    | 202          | 6.39   | 6.03         | 84.7                 | FACS Calibur  | buena                             | si                   | Reinducción                         | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila048 | 1      | PRE B          | L1                            | 2800                   | 54                       | No detectados          | 0    | 184          | 12.01  | 7.84         | 95.3                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila057 | 1      | PRE B          | L1                            | 109520                 | 99999999                 | BCR/ABL1 menor         | 0    | 184          | 0.25   | 3.56         | 71.1                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila062 | 0      | PRE B          | L1                            | 6340                   | 99999999                 | No detectados          | 0    | 23           | 18.08  | 10.19        | 94.4                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila066 | 1      | PRE B          | L2                            | 18000                  | 100                      | No detectados          | 0    | 123          | 29.74  | 21.15        | 98.9                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila002 | 1      | PRE B          | L1                            | 2,050                  | 92                       | No detectados          | 1    | 162          | 3.95   | 12.16        | 95.6                 | FACS Calibur  | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | si     | Choque séptico, isquemia intestinal, colitis neutropénica, leucemia linfoblástica aguda |
| Ila004 | 0      | PRE B          | L1                            | 8,290                  | 82                       | No detectados          | 1    | 99           | 7.03   | 11.9         | 76.7                 | FACS Calibur  | mala                              | si                   | Reinducción                         | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila016 | 0      | PRE B          | L1                            | 25,000                 | 90                       | No detectados          | 1    | 33           | 1.97   | 14.13        | 59.5                 | FACS Canto II | mala                              | si                   | Reinducción                         | si      | Medula ósea         | si     | choque séptico  |
| Ila021 | 1      | PRE B          | L1                            | 2750                   | 100                      | No detectados          | 1    | 126          | 6.57   | 4.98         | 93.5                 | FACS Calibur  | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila050 | 1      | PRE B          | L1                            | 73050                  | 99                       | No detectados          | 1    | 159          | 1.07   | 7.72         | 88.7                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila051 | 1      | PRE B          | L2                            | 67900                  | 98                       | No detectados          | 1    | 140          | 2.38   | 10.48        | 96.4                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila061 | 1      | PRE B          | L2                            | 1910                   | 70                       | No detectados          | 1    | 136          | 23.24  | 10.78        | 95.1                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |
| Ila063 | 0      | PRE B          | L1                            | 7240                   | 100                      | No detectados          | 1    | 23           | 46.88  | 12.87        | 94.2                 | FACS Canto II | buena                             | no                   | no                                  | no      | no aplica           | no     | no aplica   |

Anexo 3: Tabla de contenido clínico y experimental de pacientes. Riesgo: bajo=0 alto=1; Sexo: hombre= 0 mujer=1; Respuesta a la ventana esteroidea buena: cuenta absoluta de leucocitos menor a 1,000x $\text{mm}^3$  en sangre periférica tras 7 días de ventana esteroidea; Respuesta a la ventana esteroidea mala: cuenta absoluta de leucocitos mayor a 1,000 en sangre periférica después de 7 días de esteroides; Falla a la inducción: cuenta de blastos en medula ósea menor al 5% al final de la inducción; Reinducción: quimioterapia usada en pacientes que tuvieron falla a la inducción.