UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

FUNCIÓN Y MODOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES SLAM EN LA CITOTOXICIDAD DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA MEDIADA POR CÉLULAS NK

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JACQUELINE SÁNCHEZ HERRERA

DIRECTOR: DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ

CODIRECTOR: DR. JUAN CARLOS NÚÑEZ ENRÍQUEZ

CUERNAVACA, MORELOS MAYO, 2025

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

PUBLICACIONES RELACIONADAS

I. Sánchez-Herrera J, Valenzuela-Vázquez L., J. C Nuñez-Enriquez, et al. Influence of SLAM family receptors in the NK cell-mediated surveillance of lymphoblastic acute leukemia. European Journal of immunology; 2025.

II. Valenzuela-Vázquez, L., Nuñez-Enriquez, J. C., Sánchez-Herrera, et al. NK cells with decreased expression of multiple activating receptors is a dominant phenotype in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Frontiers in oncology. 2022; 12, 1023510. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1023510.

III. Valenzuela-Vazquez L, Núñez-Enríquez JC, Sánchez-Herrera J, 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):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0227314.

IV. Cruz-Muñoz ME, Valenzuela-Vázquez L, Sánchez-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). doi:10.1002/JLB.MR0618-224RR.

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 el Dr. Juan Carlos Núñez Enríquez, jefe de la División de Investigacion en Salud, UMAE Hospital de Pediatría Centro Medico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del seguro social.

La experimentación se llevó a cabo 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): 740531 otorgadas 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 Carlos Núñez Enríquez contó con el apoyo de CONAHCyT, FORDECYT-PRONACES 303019.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz y mi cotutor el Dr. Juan Carlos Núñez Enríquez, por sus enseñanzas, tiempo y atención que me permitieron llevar a cabo este proyecto el cual me impulsó a crecer y cultivarme profesionalmente.

A la Dra., Yvonne Rosenstein por siempre recibirnos en la unidad de citometría del IBT-UNAM y a la M.C. Erika Melchy por su apoyo incondicional y por brindarme constante conocimiento en el bello arte de la citometría.

Al Dr. Ismael Mancilla del Instituto Nacional de Perinatología, por estar siempre dispuesto a mejorar este trabajo a través de su apoyo y constante enseñanza y por facilitar el uso de su equipo de citometría para que fuera posible terminar este proyecto.

Al M.C Juan Carlos Villegas García, Técnico Académico de Laboratorio, del Laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, quien brindó su apoyo con algunos de los materiales de laboratorio empleados en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio quienes siempre estuvieron ahí para apoyarme y hacer amenos y divertidos los días de trabajo: Mitzi, Mali, Kary, Elizabeth, Nataly, Yoandi, Paola y en especial gracias a Lucero y Arturo en los que pude tener siempre alguien en quien confiar, una excelente guía para crecer académica y personalmente. Gracias, amigos.

A mis padres, que con su ejemplo, amor y enseñanzas me han impulsado a construir el camino que hoy elijo y en el que por fortuna me acompañan. Mi fortaleza y mi hogar, gracias por hacer de él el lugar al que siempre quiero regresar con triunfos, el lugar donde puedo fabricar nuevas metas y sueños que toman siempre tintes de realidad con su guía.

A mi hermana Diana, quien me motiva con sus logros y su historia, quien me demostró que aun estando lejos de casa se puede construir y seguir los sueños a los que aspiramos; quien me enseñó que no hay que tener miedo a hacer lo que nos apasiona.

A mis sobrinos Mario y Helena, quienes ahora tienen gran parte de mi corazón, en los que siempre puedo ver esas ansias de aprender todo lo que está a su alcance, por su capacidad genuina de asombrarse, sorprenderse y de crear cada día.

A mis hermanas, cómplices y amigas, Brenda y Naolli, quienes siempre han estado para mí trascendiendo en el tiempo y la distancia. Parte de lo que soy ahora y a donde he

llegado lo he forjado con ustedes, con su cariño, apoyo, jalones de orejas, alegrías y una que otra derrota. Gracias por estar siempre para mí, por hacerme crecer, por permitirme crecer con ustedes, siempre tendrán un hogar conmigo.

A Everardo por acompañarme en este viaje, en quien hallé siempre la motivación de querer ser mejor. Por enseñarme a ser paciente y resiliente, quien me apoyó, impulsó y retó en este camino.

DEDICATORIA

Para mis padres Odilón Manuel y Patricia, para mi hermana Diana, mis sobrinos Mario y Helena y mi compañero de vida Everardo.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
BCR	B cell receptor
CRACC	CD2-like receptor activating cytotoxic cells
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAT-2	Ewing's sarcoma-associated transcript 2
EBV	Epstein-Barr virus
FasL	Fas Ligand
GFP	Green fluorescent protein
HLA	Human leukocyte antigen
HLH	Hemophagocytic lymphohistiocytosis
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
MHC	Major histocompatibility complex
MFI	Mean fluorescence intensity
NCR	Natural cytotoxicity receptors
NK	Natural Killer

PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PHA	Phytohemagglutinin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLC-γ	Phospholipase C-gamma
PMA	Phorbol 13-acetate 12-myristate
SAP	SLAM-associated protein
SH2	Src homology 2
SH2D1A	SH2 Domain-Containing Protein 1A
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule
SLAMF7	SLAM family member 7
TCR	T-cell receptor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

RESUMEN

La inmunovigilancia de células malignas es un proceso fundamental que permite a las células del sistema inmune reconocer y eliminar células cancerosas. Entre las células del sistema inmune, las células Natural Killer (NK) desempeñan un papel crucial dado su capacidad de reconocer y eliminar de manera innata a células que sufren de una transformación maligna. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia en la que se presenta una proliferación maligna de células linfoides bloqueadas en una etapa temprana de desarrollo y representa el cáncer pediátrico más común en la población infantil a nivel mundial. Las células NK se han convertido en elementos importantes para el desarrollo de inmunoterapias en las leucemias. Los inmunoreceptores de la familia SLAM, son conocidos por ser reguladores de la función citotóxica de las células NK. Sin embargo, el conocimiento acerca del papel que juegan estos inmunoreceptores en el contexto de la leucemia es limitado. Por lo anterior, en este trabajo realizamos el estudio de la función y modos de acción de los inmunoreceptores de la familia SLAM en la inmunovigilancia de células leucémicas mediada por las células NK. Se llevó a cabo el análisis de las frecuencias y niveles de expresión de 2B4, NTB-A y SLAMF7 de las células NK ($CD3^-$ $CD20^-$ $CD14^-$ $CD56^+$) de sangre periférica en 72 pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico comparados con 21 controles pareados por edad. Nuestros hallazgos demuestran que existe una disminución significativa en las frecuencias de expresión, así como en los niveles de expresión de inmunoreceptores SLAM en la superficie de las células NK de pacientes con LLA en comparación con controles sanos pareados por edad. Interesantemente, se encontró que entre los pacientes con LLA, el fenotipo de las células NK está dominado por una disminución concomitante en las frecuencias de expresión para estos tres receptores y que este fenotipo correlaciona con una disminución significativa en la función citotóxica dependiente de anticuerpo (ADCC) de las células NK de pacientes con LLA. Por otro lado, al analizar las frecuencias y niveles de expresión de los receptores SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en la superficie de las células leucémicas con fenotipo $CD45^{Dim}Linaje^-CD19^+CD20^+$ de médula ósea en 20 pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico comparadas con los linfocitos inmaduros de tipo B de cordón umbilical $CD45^{Dim}Linaje^-CD19^+CD20^+$ de 10 donadores sanos, también se encontró que la expresión de los receptores de la familia SLAM se encuentra alterada en la superficie de las células leucémicas. Específicamente, las frecuencias de expresión de CD48 y NTB-A, mostraron una disminución significativa en sus frecuencias de expresión en comparación con linfocitos inmaduros de tipo B de cordón umbilical de donadores sanos. Estos resultados sugieren que una disminución de los receptores SLAM en las células leucémicas representa un mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Para corroborar esta hipótesis, se empleó un modelo que nos permitiera evaluar la contribución de los receptores SLAM en modular la susceptibilidad de las

células leucémicas a la citotoxicidad mediada por células NK. Primeramente, se llevó a cabo la expresión ectópica de CD48 en la línea celular K562, la cual sirvió para realizar ensayos de citotoxicidad natural, la cual se evaluó mediante la expresión de CD107a mediante citometría de flujo en células NK primarias ($CD3^-$ $CD20^-$ $CD14^-$ $CD56^+$), a partir de células mononucleares (PBMC´S) aisladas de sangre periférica de 11 pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico. Nuestros resultados demostraron que la sola expresión de un miembro de la familia SLAM (CD48) es suficiente para aumentar la susceptibilidad de la célula leucémica a ser eliminada por células NK. Adicionalmente, se llevó a cabo la generación de conjugados biespecíficos CD19/SLAM, los cuales fueron empleados para recubrir de manera artificial la superficie de la línea celular leucémica SUP-B15 con receptores de la familia SLAM (SLAMF7, CD48 y NTB-A) para llevar a cabo ensayos de citotoxicidad, para los cuales se emplearon PBMC´S tratadas con IL2. Este ensayo se evaluó mediante la expresión de CD107a en células NK activadas ($CD3^-$ $CD20^-$ $CD14^-$ $CD56^+$) de 11 pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico. Los resultados obtenidos de estos ensayos nos muestran que el recubrimiento artificial de la superficie de las células leucémicas con receptores de la familia SLAM fue suficiente para aumentar el potencial citotóxico de las células NK de pacientes con LLA. Estos efectos fueron dependientes del reclutamiento y activación de PLC-gamma en las células NK. En contraste con la citotoxicidad, como principal mecanismo que favorece la función lítica de las células NK, los receptores SLAM no tuvieron un impacto significativo en la adhesión celular. Estos resultados, en su conjunto, sugieren que los receptores de la familia SLAM juegan un papel esencial en la inmunovigilancia de células leucémicas, debido a que son determinantes en influenciar la susceptibilidad de las células leucémicas a la citotoxicidad mediada por células NK. Es por esto, que los receptores SLAM pueden representar un importante blanco terapéutico en el tratamiento de LLA y posiblemente otras malignidades hematopoyéticas.

ABSTRACT

Immune surveillance of malignant cells is a fundamental process that enables immune system cells to recognize and eliminate cancer cells. Among immune system cells, Natural Killer (NK) cells play a crucial role due to their innate ability to recognize and eliminate cells undergoing malignant transformation. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a neoplasm characterized by the malignant proliferation of lymphoid cells blocked at an early stage of development and represents the most common pediatric cancer worldwide. NK cells have emerged as important elements in the development of immunotherapies for leukemias. The SLAM family immunoreceptors are known to regulate the cytotoxic function of NK cells. However, knowledge regarding the role of these immunoreceptors in the context of leukemia remains limited. In this study, we investigated the function and modes of action of SLAM family immunoreceptors in the immune surveillance of leukemic cells mediated by NK cells. We analyzed the frequencies and expression levels of 2B4, NTB-A, and SLAMF7 in NK cells (CD3- CD20- CD14- CD56+) derived from peripheral blood in 72 pediatric patients with ALL at diagnosis, compared to 21 age-matched controls. Our findings demonstrate a significant decrease in the expression frequencies and levels of SLAM immunoreceptors on the surface of NK cells from ALL patients compared to healthy age-matched controls. Interestingly, among ALL patients, the NK cell phenotype is dominated by a concomitant decrease in the expression frequencies of these three receptors, correlating with a significant reduction in antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) of NK cells from ALL patients. Additionally, when analyzing the frequencies and expression levels of SLAM receptors (CD48, NTB-A, and SLAMF7) on the surface of leukemic cells with the CD45DimLin-CD19+CD20+ phenotype from bone marrow in 20 pediatric patients with ALL at diagnosis, compared to immature B-type lymphocytes from umbilical cord blood (CD45DimLin-CD19+CD20+) of 10 healthy donors, we found that SLAM family receptor expression is altered on the surface of leukemic cells. Specifically, the expression frequencies of CD48 and NTB-A showed a significant decrease compared to immature B-type lymphocytes from healthy umbilical cord donors. These results suggest that a decrease in SLAM receptors on leukemic cells represents a mechanism for immune evasion. To corroborate this hypothesis, we employed a model to evaluate the contribution of SLAM receptors in modulating the susceptibility of leukemic cells to NK cell-mediated cytotoxicity. First, the ectopic

expression of CD48 was induced in the K562 cell line, which was used for natural cytotoxicity assays. These assays were evaluated by measuring CD107a expression through flow cytometry in primary NK cells (CD3- CD20- CD14- CD56+), isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 11 pediatric patients with ALL at diagnosis. Our results demonstrated that the mere expression of a single SLAM family member (CD48) was sufficient to increase the susceptibility of leukemic cells to NK cell-mediated elimination. Additionally, we generated bispecific CD19/SLAM conjugates, which were used to artificially coat the surface of the SUP-B15 leukemic cell line with SLAM family receptors (SLAMF7, CD48, and NTB-A) for cytotoxicity assays, using PBMCs treated with IL-2. These assays were evaluated by measuring CD107a expression in activated NK cells (CD3- CD20- CD14- CD56+) from 11 pediatric patients with ALL at diagnosis. The results demonstrated that the artificial coating of leukemic cell surfaces with SLAM family receptors was sufficient to enhance the cytotoxic potential of NK cells from ALL patients. These effects were dependent on the recruitment and activation of PLC-gamma in NK cells. In contrast to cytotoxicity as the primary mechanism favoring the lytic function of NK cells, SLAM receptors had no significant impact on cell adhesion. Collectively, these results suggest that SLAM family receptors play an essential role in the immune surveillance of leukemic cells by influencing their susceptibility to NK cell-mediated cytotoxicity. Thus, SLAM receptors may represent an important therapeutic target in the treatment of ALL and possibly other hematopoietic malignancies.

ÍNDICE

PUBLICACIONES RELACIONADAS I
CRÉDITOS II
AGRADECIMIENTOS III
DEDICATORIA V
SIGLAS Y ABREVIATURAS VI
RESUMEN VIII
ABSTRACT X
INTRODUCCIÓN 1
Células Natural Killer 1
Origen y desarrollo de las células NK 1
Biología de las células NK 1
Funciones efectoras de las células NK 3
Educación de las células NK 6
Reconocimiento de células blanco, receptores de activación e inhibición y respuesta efectora de las células NK 12
Receptores de la familia SLAM 16
Estructura, señalización y función de los receptores SLAM 17
Proteínas adaptadoras de la familia SAP 18
Regulación de las funciones efectoras de las NK a través de la familia SLAM 21
Las células NK en la inmunovigilancia contra el cáncer 26
Papel de los receptores 2B4, NTB-A y SLAMF7 en la regulación de las funciones efectoras de las células NK en la inmunovigilancia contra el cáncer 28
Leucemia 30
Leucemia Linfoblástica Aguda 31
Detección, clasificación y pronóstico 32
Sintomatología 34
Etapas del Tratamiento 34
JUSTIFICACIÓN 37
HIPÓTESIS 38
OBJETIVO GENERAL 39
OBJETIVOS PARTICULARES 39
MATERIALES Y MÉTODOS 40

Diseño del estudio 40
Aspectos éticos 40
Reclutamiento de muestras 40
Criterios de selección de muestras (pacientes) 41
Criterios de selección de muestras (controles) 41
Diagnóstico clínico 42
Muestras 42
Anticuerpos 45
Células 46
Cultivo de células mononucleares de sangre periférica, aislamiento de células NK primarias humanas y cultivos de líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda 46
Evaluación de la expresión de receptores SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK 47
Ensayos funcionales 47
Citotoxicidad natural y citotoxicidad mediada por anticuerpo reversa 47
Construcción (Infección retroviral) 48
Conjugados Biespecíficos 48
Ensayos de citotoxicidad en presencia de los ligandos de la familia SLAM 49
Análisis de la expresión de receptores SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en células leucémicas. 49
Ensayos de formación de conjugados 50
Estrategia para el análisis de citometría 51
Análisis estadístico 52
RESULTADOS 54
Análisis de la expresión de los receptores de la familia SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK de sangre periférica 54
Los pacientes con LLA muestran una disminución en la expresión de los receptores de la familia SLAM 56
Las células NK de pacientes pediátricos con LLA muestran una disminución concomitante en la expresión de los receptores de la familia SLAM. 58
Las células NK de pacientes con LLA muestran un fenotipo de diferenciación anormal 59
Evaluación de citotoxicidad natural de células NK de sangre periférica 61
Las células NK de los pacientes con LLA poseen una actividad citotóxica anormal 61
Evaluación de la expresión de los receptores de la familia SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK y su asociación con la Leucemia 63
Evaluación de la expresión de la familia SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en células leucémicas de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda 66

Las células leucémicas de los pacientes con LLA muestran una disminución concomitante en la expresión de los receptores de la familia SLAM 68

Las células NK de pacientes con LLA responden a la expresión ectópica de CD48 69

Modificar el conjunto de receptores SLAM en la superficie de las células leucémicas es suficiente para inducir la degranulación de las células NK 71

Los conjugados biespecíficos SLAM desencadenan la capacidad citotóxica de las células NK de pacientes con LLA 75

Los receptores SLAM no promueven la adhesión de células NK. 76

La señalización de PLC-γ se requiere para promover la eliminación de las células leucémicas dependiente de los receptores de la familia SLAM. 78

DISCUSIÓN 80

CONCLUSIÓN 89

BIBLIOGRAFÍA 90

INTRODUCCIÓN

Células Natural Killer

Origen y desarrollo de las células NK

Las células Natural killer (NK) son un tipo de linfocitos pertenecientes al sistema inmunológico innato, estas células se especializan en llevar a cabo la detección y eliminación de células infectadas por virus o células tumorales[23].

Las células NK derivan de un precursor linfoide común (LCP) en la médula ósea. Este precursor da lugar a varias poblaciones celulares: pro-linfocitos B, pre-linfocitos T, células linfoides innatas (ILC) y precursores de células NK (NK Ps)[4]. Sin embargo, se ha evidenciado que las células madre hematopoyéticas y los precursores comprometidos con la línea de células NK migran a sitios periféricos, donde sufren una diferenciación adicional. La presencia de células NK maduras y sus precursores inmaduros en diversos tejidos sugiere que estos podrían constituir sitios alternativos importantes para la diferenciación de las células NK, lo que podría resultar en la formación de células NK con características funcionales diferentes a las convencionales. La diferenciación de las células NK está regulada por citocinas, interacciones celulares y factores de transcripción (TF). Entre las citocinas clave para su desarrollo, la IL-15 desempeña un papel fundamental, actuando en conjunto con SCF, IL-7 y Flt3-L[5].

Las capacidades funcionales de las células NK maduras se asocian a las etapas finales de diferenciación, las células en etapas más tempranas de diferenciación no presentan actividad citolítica y se caracterizan por un patrón particular de secreción de citocinas, incluyendo IL-8, GM-CSF, TNF, CXCL12, IL-2 e IL-3, pero no IFN-γ[6].

Biología de las células NK

Las células NK se caracterizan tanto por su morfología, presentándose como linfocitos granulares grandes, como por la expresión de marcadores específicos en su superficie que les confieren el fenotipo de $CD56^{+}$, $CD3^{-}$. Estas células representan del 5 al 20% de los linfocitos presentes en sangre periférica[7].

Características Fenotípicas y Funcionales de los Subconjuntos de Células NK Periféricas

De acuerdo con la expresión CD56, estas células se subdividen en dos poblaciones conocidas como CD56^{dim} y CD56 ^{bright} las cuales poseen características fenotípicas y funcionales (Figura 1)[8].

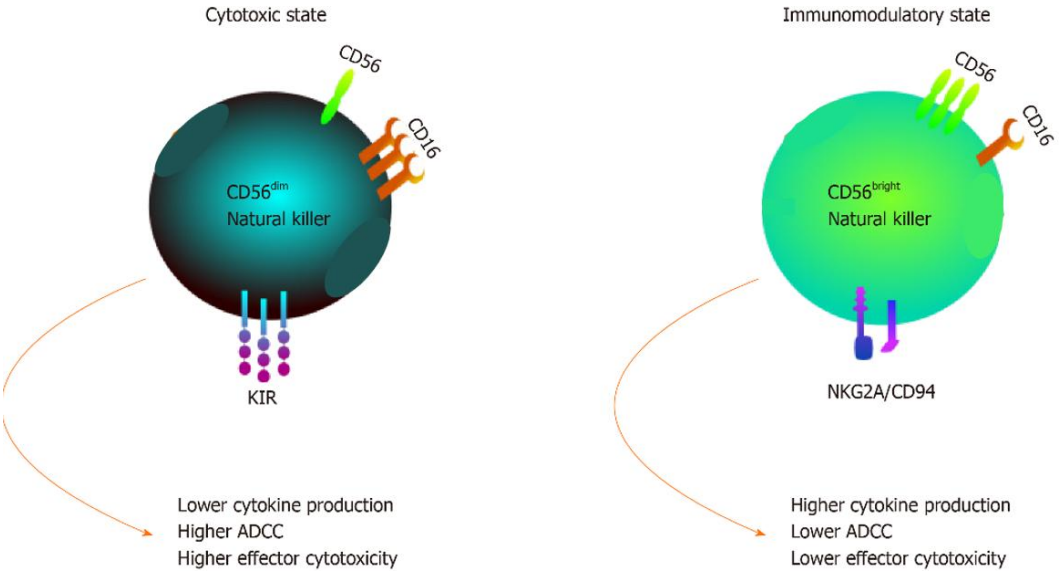


Figura 1. Los subconjuntos de células NK difieren tanto funcional como fenotípicamente. Funcionalmente, las células NK CD56^{dim} son citotóxicas y producen bajos niveles de citocinas en respuesta a la estimulación con monocinas. Sin embargo, son potentes mediadores de funciones efectoras citotóxicas debido a la alta expresión de CD16 en su superficie. Morfológicamente, las células NK CD56^{dim} y CD56^{bright} muestran perfiles de receptores diferentes; por ejemplo, las células NK CD56^{dim} exhiben niveles mucho más altos de receptores tipo Ig de los asesinos (KIR), mientras que las células NK CD56^{bright} en reposo presentan una alta expresión de CD94/NKG2A. ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; IL: Interleucina; KIR: Receptor tipo Ig. Modificado de, *Abdel et al., 2020.*

Las NK CD56^{bright} secretan en gran cantidad citocinas como interferón gamma (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α,) además existen estudios que han evidenciado que este fenotipo de NK puede ser un intermediario en el desarrollo de las células con fenotipo CD56^{dim}[49]. Las células CD56^{dim}, representan el 90% de las células NK que se encuentran en circulación y se caracterizan por ser altamente citotóxicas, por ende, son las responsables de la eliminación y/o lisis de las células blanco mediante un mecanismo conocido como citotoxicidad natural[8,10].

A diferencia de las células T CD8+, las células NK no requieren de diferenciarse para adquirir los elementos que les permiten mostrar una citotoxicidad mediada por células y la transcripción de citocinas proinflamatorias, entre otros componentes secretores. Debido a estos atributos, las células NK proporcionan la primera línea de defensa contra la infección por virus y células neoplásicas[11].

Funciones efectoras de las células NK

Las células NK desempeñan un papel fundamental en la inmunovigilancia, proceso mediante el cual el sistema inmunológico identifica y elimina aquellas células que han sido infectadas por virus o células que han sufrido un proceso de transformación (células neoplásicas)[12]. A diferencia de las células T y B, las células NK no expresan receptores para antígenos específicos[13], en su lugar estas células reconocen a las células blanco mediante un amplio y variado repertorio de receptores con funciones activadoras e inhibidoras. Un balance entre las señales de activación e inhibición de estos receptores es lo que determina la actividad citotóxica de las células NK [1415].

Los mecanismos principales involucrados en la citotoxicidad mediada por células NK incluyen la liberación de gránulos líticos cargados con proteasas y proteínas formadoras de poros como las granzimas y la perforina, la liberación de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y el interferón gamma (IFNγ), la regulación positiva de FASL y el ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)[14]. Los mecanismos citotóxicos antes mencionados se regulan a través de un evento conocido como sinapsis inmunológica lítica, la cual se describe como una interfaz dinámica que se forma entre una célula NK y la célula blanco[1617].

La formación de una sinapsis lítica funcional en las células NK se divide en una serie de etapas distintas: la etapa de iniciación, efecto y terminación, cada una de las cuales comprende pasos específicos. El progreso a través de cada etapa se encuentra cuidadosamente regulado, y esta estricta regulación es clave para la precisión con la que las células NK seleccionan y eliminan a las células blanco que encuentran durante el proceso de inmunovigilancia[1816].

La etapa de iniciación incluye la señalización intracelular inicial y la adhesión de la célula NK a su célula blanco. Primeramente, la célula NK es atraída al sitio donde se requieren sus funciones efectoras en respuesta a señales quimiotácticas, para posteriormente identificar a la célula blanco y promover la adhesión firme, la cual se facilita por las interacciones receptor-ligando de mayor afinidad (Figura 2a). La familia de integrinas, moléculas de adhesión, son cruciales en este proceso,

algunas de las integrinas expresadas por las células NK incluyen al antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA1; CD11a-CD18) y receptor de macrófagos 1 (MAC1; CD11b-CD18)[16].

Después del reconocimiento de la célula blanco y la iniciación de la sinapsis, en ausencia de señales inhibitorias predominantes, es posible dar paso a la etapa efectora. Los pasos clave de esta etapa comprenden el reclutamiento de actina filamentosa (F-actina), la polarización de los gránulos líticos y el centro organizador de microtúbulos (MTOC) hacia la sinapsis[16]. Después, los gránulos se acoplan a la sinapsis y están listos para el paso final de esta etapa: la fusión de la membrana del gránulo y la liberación del contenido citotóxico en el centro de la sinapsis (Figura 2b). La etapa de terminación de la sinapsis lítica de las células NK ocurre después de que se ha secretado el contenido de los gránulos líticos a la célula blanco, aunque la secuencia de eventos que suceden en esta fase aún es hipotética, se sabe que incluye un periodo de inactividad y disminución de la señal de los receptores activadores, seguido de la separación de las células NK de la célula blanco (Figura 2c)[1618].

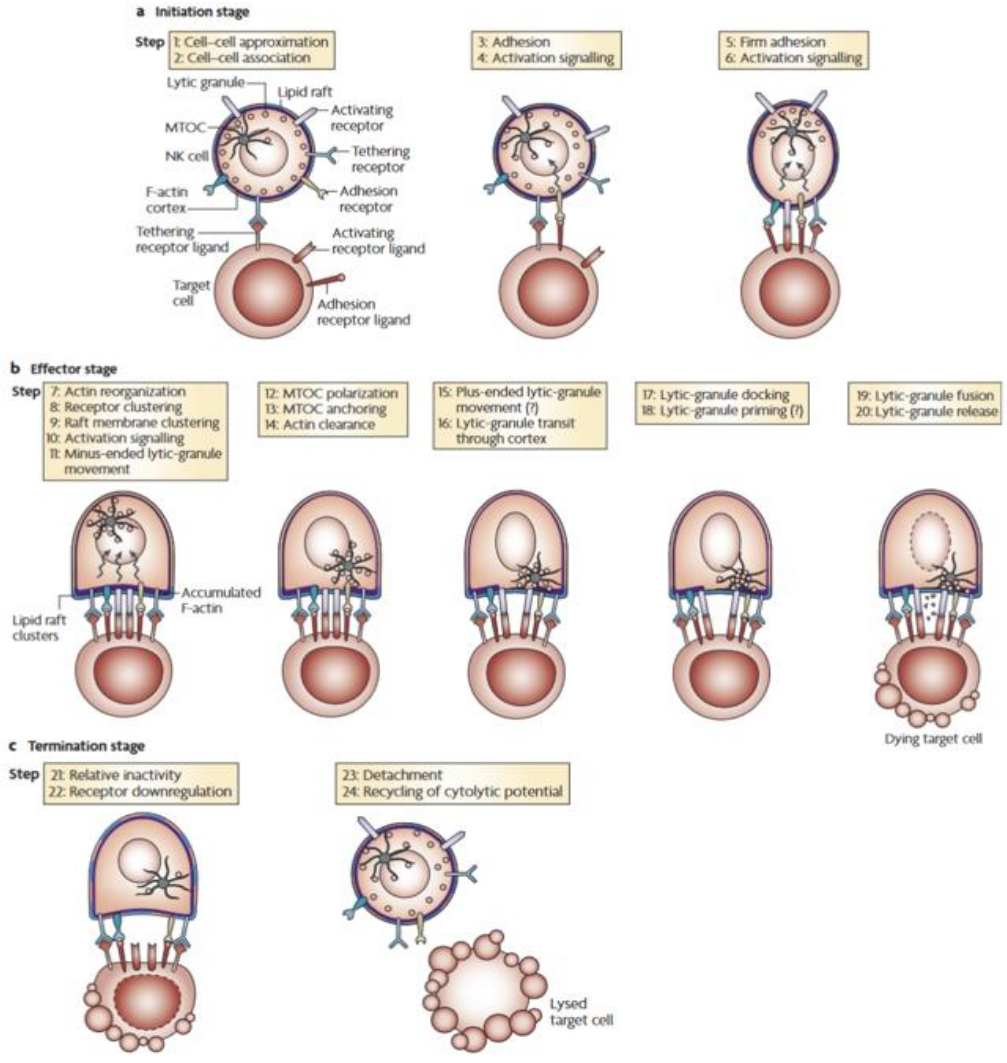


Figura *2.* Modelo para las etapas *de* la formación y función de la sinapsis lítica de las células NK. Se propone que la formación de una sinapsis lítica funcional de células natural killer (NK) se divide en tres etapas principales: iniciación (**a**), efector*a* (**b**) y terminación (**c**), cada una de estas etapas se subdivide en múltiples pasos. La etapa de iniciación comprende los eventos de adhesión y la señalización inicial para la activación de la célula NK. En la etapa efectora, los pasos clave incluyen la reorganización del actina, el agrupamiento de receptores, la polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y de los gránulos líticos, así como la fusión de los gránulos líticos con la membrana plasmática. Se propone que los pasos cruciales de la etapa de terminación incluyen un período de inactividad y separación. Modificado de, *Friedman et al., 2021*.

Como se mencionó anteriormente, ademas de la eliminación de células blanco a partir de la liberación de gránulos citotóxicos, las NK poseen tambien la capacidad de llevar a cabo la eliminacion de células blanco a través de la union de ligandos a los recepetores de muerte Fas (CD95) y TRAIL-R, los cuales se expresan en la superficie de células infectadas por virus o células neoplásicas[19].

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)[19].

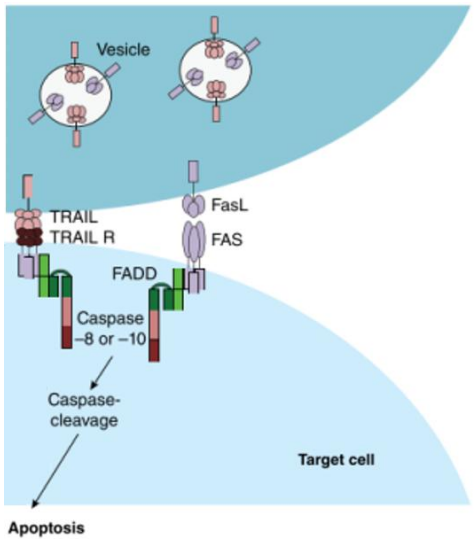


Figura 3. Citotoxicidad a través de receptores de muerte. En células NK activadas se induce la expresión de FasL y TRAIL y una vez que se unen a sus respectivos receptores sobre la célula blanco,

promueven la activación de caspasa 8 o 10, que favorecen la activación de otras caspasas. Este mecanismo conduce a la activación de nucleasas capaces de generar cortes en el DNA, y este daño finalmente conduce a un proceso de muerte denominado apoptosis celular. Modificado de, *Prager I et al., 2019.*

Educación de las células NK

Debido a que las células NK poseen potentes funciones citotóxicas e inmunoestimuladoras, estas células podrían representar un daño potencial para las células sanas; sin embargo, las células NK exhiben mecanismos de tolerancia a lo propio [20].

La educación de las células NK, se define como el proceso mediante el cual estas células adquieren la capacidad de distinguir entre células propias normales y células infectadas por virus o transformadas, asegurando que su respuesta citotóxica sea precisa y específica. Este proceso ocurre durante el desarrollo y maduración de las células NK, principalmente en la médula ósea y tejidos secundarios. Uno de los principios clave de la educación de las células NK es la interacción entre las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) propias y los receptores inhibitorios específicos (KIR)[2122].

En la búsqueda de comprender el proceso de maduración, se han propuesto varios modelos que describen diferentes aspectos de la maduración de las células NK a través del MHC-I. Cada uno de estos modelos presenta características únicas, pero también comparten aspectos clave. Por lo tanto, se considera que son complementarios, más que modelos mutuamente excluyentes del mismo proceso biológico[23].

Modelo de equipamiento (del inglés, arming). En este modelo las células NK adquieren su capacidad efectora después de la interacción de los receptores inhibitorios con las moléculas de MHC de clase I propias. Las señales promovidas por los receptores inhibitorios propician la maduración funcional de manera activa (Figura 4a). El término “dar permiso” (del inglés, lisencing) de las células NK, acuñado por Kim y Yokoyama, se usa comúnmente como sinónimo de células NK armadas, aunque también podría implicar otros mecanismos[24].

Modelo de desarme (del inglés, disarming). Este modelo enuncia que las células NK que carecen de receptores de inhibición para las células MHC-I están desarmadas para mantener la tolerancia de lo propio, lo que genera células NK en estado de anergia. Las interacciones con las

moléculas MHC-I previenen este proceso, permitiendo que la célula NK madure normalmente, lo cual facilita la conciliación de este modelo con un papel más convencional para la señalización de receptores inhibitorios (Figura 4b)[23].

Las diferencias entre estos modelos son principalmente que, en el modelo de equipamiento, las células NK son hiporreactivas por defecto, mientras que el modelo de las células NK desarmadas sugiere que estas células poseen la capacidad de responder en su estado inicial (hiperreactivas).

Modelo de interacción *cis*. Se basa en la capacidad de los receptores de KIR en humanos (Ly49 en ratón) para unirse a los alelos de MHC-1 en *cis*, es decir, en la misma membrana celular. Este modelo se basa en que los receptores KIR son capaces de transmitir señales inhibitorias incluso en ausencia de la interacción con sus ligandos. Según este modelo, las interacciones entre las moléculas MHC-1 y los receptores KIR en cis secuestran a estos últimos y evitan su reubicación en la sinapsis inmunológica. Como consecuencia, la influencia inhibitoria de los receptores KIR no comprometidos sobre la señalización de los receptores activadores disminuye, que hace que la célula NK sea más reactiva (Figura 4c)[23].

Modelo de reóstato. Se ha demostrado recientemente que las células NK presentan una mayor o menor reactividad dependiendo de la intensidad de la señal inhibitoria que reciben, lo que sugiere que la educación de estas células opera de manera cuantitativa. Este modelo, indica que la reactividad de las células NK puede ser regulada de una manera cuantitativa en lugar de ser binaria (incremento o decremento en la respuesta), dependiendo de la señal inhibitoria que recibe cada célula NK (Figura 4d)[25].

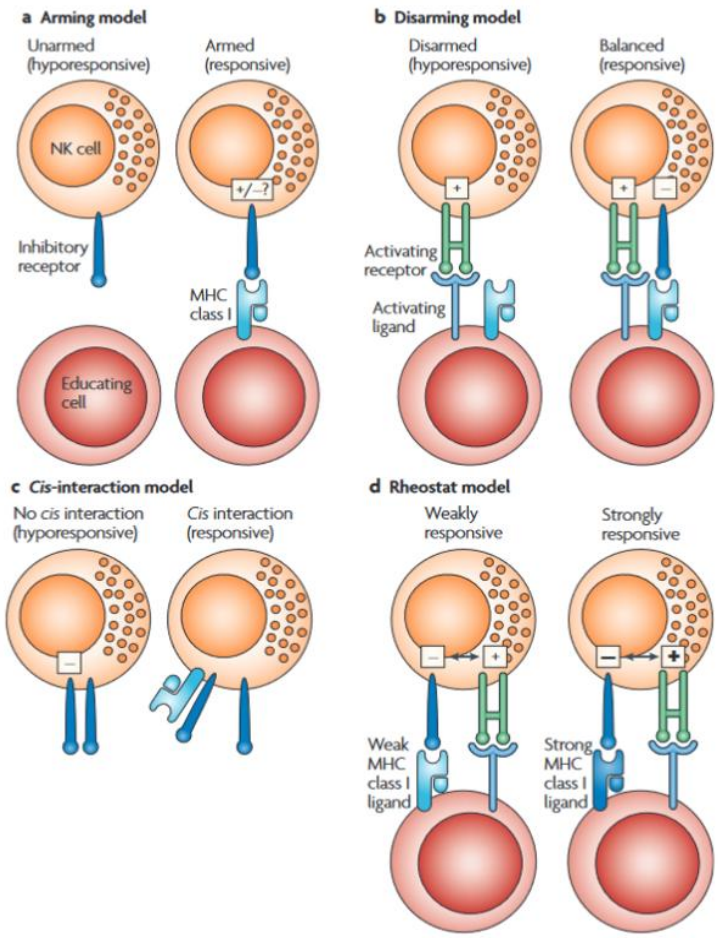


Figura 4. Modelos para la educación de las células NK. a) En el modelo de equipamiento (arming), la señalización a través de un receptor inhibitorio conduce a la competencia funcional de las células NK; en ausencia de este, la célula NK permanece hipo-reactiva. **b)** En el modelo de desarme (unarmed), la célula NK está activada por defecto; sin embargo, en ausencia de un receptor inhibitorio para las moléculas propias de MHC clase I, la célula NK se vuelve anérgica o hipo-reactiva. La presencia de un receptor inhibitorio rescata a la célula NK de la anergia y le permite ser reactiva. **c)** El modelo de interacción cis se basa en la capacidad de los receptores inhibitorios para unirse a las moléculas de MHC clase I en cis, es decir, en la misma membrana celular. Se ha sugerido que esta unión previene una señal inhibitoria independiente de ligando y, por lo tanto, transforma una célula NK hipo-reactiva en una célula NK reactiva; esta señal es transmitida por los receptores KIR no comprometidos que se agrupan en la sinapsis inmunológica. **d)** El modelo de reostato representa una visión dinámica de la educación de las células NK. Basado en la intensidad de la señal inhibitoria durante la educación de las células NK, la célula NK que responde equilibra su umbral de activación como un reostato, lo que permite que la maduración de las células NK se ajuste de manera óptima según la entrada inhibitoria. Modificada de, *Höglund et al., 2010.*

Estudios recientes han identificado nuevas señales que están involucradas en el proceso de educación de las células NK, estas señales están mediadas a través de interacciones con moléculas MHC no clásicas o incluso con moléculas que no pertenecen al MHC (Figura 5)[21]. Entre las moléculas MHC no clásicas encontramos a MHC-1b (HLA-E) y el receptor que lo reconoce es un receptor inhibitorio similar a lectina tipo C (CD94/NKG2A)(Figura 6)[26]. Esta molécula es importante en la educación de la tolerancia de las células NK a lo propio y contribuye a la inhibición de la inmunidad mediada por células NK contra infecciones y tumores. Las células NK que expresan NKG2A son eficientes en eliminar ciertos objetivos, especialmente aquellos deficientes de ligandos (HLA-E), lo que podría sugerir un papel educativo a través de la señalización de NKG2A[26].

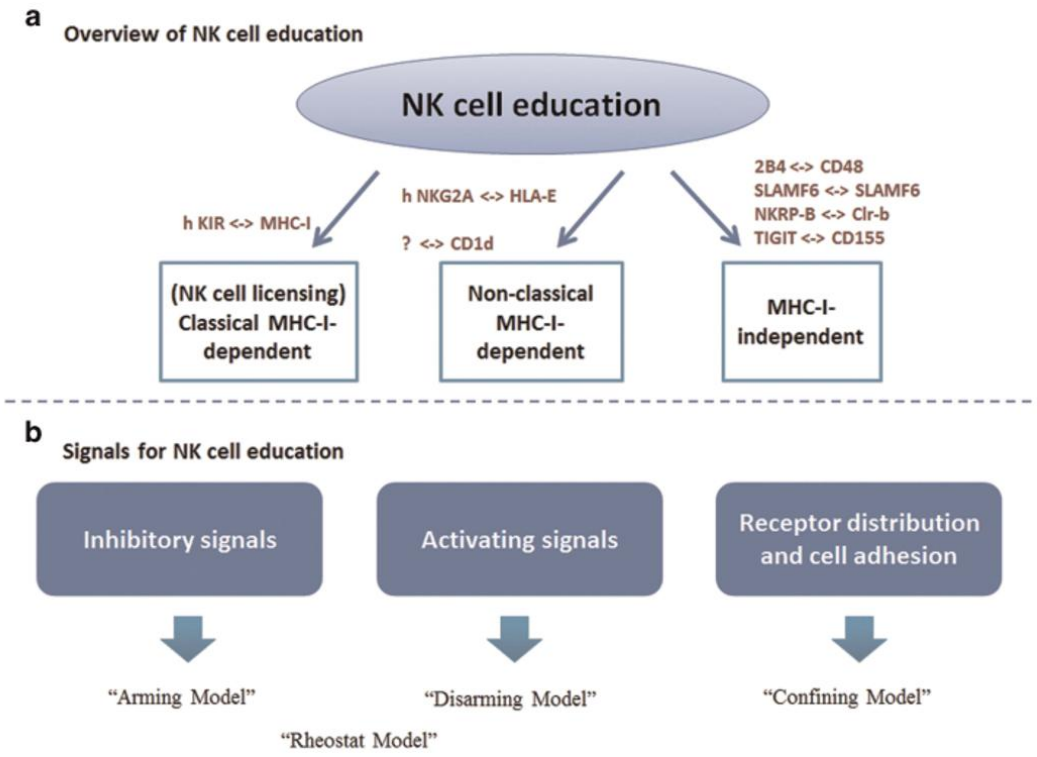


Figura 5. Esquema de la educación de las células NK. (a) Visión general de la educación de las células NK. La educación de las células NK, un concepto amplio sobre la adquisición de la función de las células NK y la tolerancia de lo propio, puede definirse como dependiente de MHC-I clásico, independiente de MHC-I no clásico e independiente de MHC-I. **(b)** Señales para la educación de las células NK. Las señales inhibitorias, activadoras y de adhesión están involucradas en la educación de las células NK. En el "Modelo de equipamiento", los receptores inhibitorios proporcionan señales críticas para la educación a través de sus motivos ITIM. El "Modelo de desarme" destaca el importante papel de los receptores activadores. Las células NKse desactivan (hipo-reactivas) si carecen de señales inhibitorias para equilibrar las estimulaciones activadoras crónicas. El "Modelo de Reostato"

propone una perspectiva cuantitativa de la educación de las células NK, sugiriendo que el aumento o la disminución de la respuesta de las células NK está controlado de manera cuantitativa por la intensidad de la señal inhibitoria. El "Modelo de Confinamiento" demuestra que la distribución confinada de los receptores es indispensable para la educación de las células NK. ITIM, motivo inhibitorio basado en tirosina de los inmunorreceptores; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; células NK, células asesinas naturales. Modificada de, *Yuke et al., 2017.*

CD1d1, es otra molécula MHC no clásica crucial para la maduración y activación de las células NK, esta molécula también es capaz de inhibir su actividad citotóxica[21]. Interesantemente ratones deficientes de CD1d1 muestran una actividad deficiente de las células NK (debido a un reconocimiento defectuoso de "la perdida de lo propio" y una citotoxicidad dependiente de NK G2D), a pesar de tener un desarrollo normal de estas células(Figura 6)[27]. Es posible que una interacción *trans* entre CD1d1 y un receptor inhibitorio desconocido mejore la respuesta de las células NK, proporcionando un mecanismo de educación que aún no ha sido identificado[21].

Dentro de las moléculas que no pertenecen al MHC, encontramos a miembros de la familia SLAM (del inglés, signaling lymphocytic activation molecule) como el ligando CD48 (ligando de 2B4), SLAMF6 (NTB-A, ligando propio) (Figura 6)[21]. Los miembros de la familia SLAM son conocidos por inhibir la repuesta de las células NK, en ausencia de su proteína adaptadora SAP (lo cual se explicará a mayor detalle posteriormente)[28]. Por otro lado, el ligando relacionado con lectinas tipo C Clr-b (ligando de NK RP1-B) y el receptor de polivirus CD155 (ligando de TIGIT), son conocidos por inhibir la respuesta de las células NK [21].

Tomando en cuenta lo anterior, se propuso un último modelo. El modelo del confinamiento (del inglés, confining), este modelo sugiere que el contacto célula-célula constituye el primer paso en inicial la citotoxicidad mediada por células NK [21]. En este tipo de contactos, los receptores activadores e inhibidores de las células NKse agrupan en la sinapsis, y luego se induce una señalización de adentro hacia afuera a través de moléculas de adhesión para formar conjugados estables y desencadenar la polarización de los gránulos citotóxicos[29].

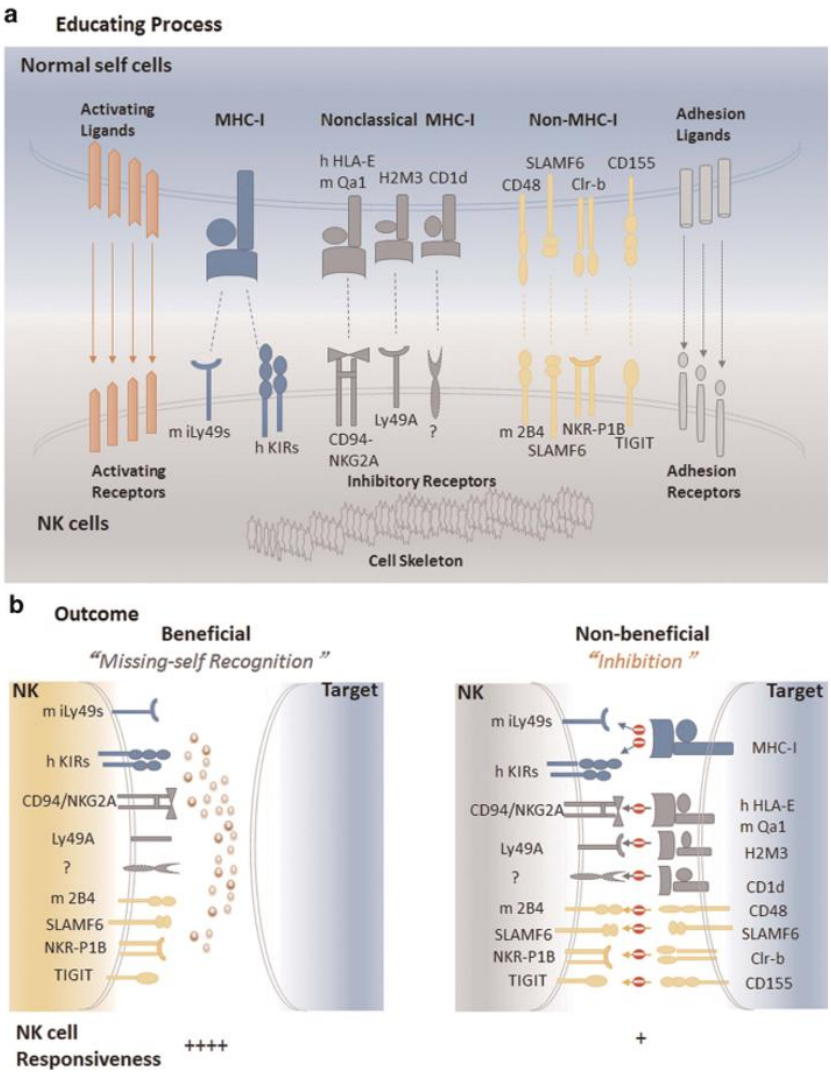


Figura 6. Representación esquemática del papel de la educación en el reconocimiento de células blanco. (a) Proceso de educación. Durante el desarrollo, las células NK adquieren maduración funcional a través de una adaptación al huésped. En este proceso, los receptores inhibitorios están directamente involucrados al interactuar con ligandos propios (dependientes o no de MHC-I) para educar a las células NK y que adquieran respuestas efectoras. **(b) Resultado.** Se muestran los roles diferenciales del proceso de educación en relación con la presencia de ligandos inhibitorios en las células blanco. La educación es exitosa, ya que permite que las células NK con receptores inhibitorios detecten la ausencia de lo propio. Sin embargo, cuando los ligandos inhibitorios son suficientes en las células blanco, la inhibición por la unión de los receptores inhibitorios con sus ligandos correspondientes impide la activación de las células NK educadas. Modificada de, *Yuke et al., 2017.*

Reconocimiento de células blanco, receptores de activación e inhibición y respuesta efectora de las células NK

Una de las características únicas de las células NK, es que poseen la capacidad de mostrar una respuesta citotóxica rápidamente en situaciones donde existe daño celular (señales de estrés), insultos microbianos, infecciones o señales de moléculas que no son propias. Debido a esto y a su potente citotoxicidad, su capacidad de activación debe estar cuidadosamente regulada, con la finalidad de que estas reaccionen de manera inespecífica contra células sanas.

Tomando en cuenta lo anterior, se formularon dos hipótesis que explican de qué manera las células NK reconocen y eliminan a la célula blanco. La hipótesis de la perdida de lo propio (del inglés, missing self), se formuló como un modelo de la tolerancia de lo propio por parte la célula NK. Klas Kärr y sus colaboradores descubrieron que las células NK eliminan preferentemente a las células que carecen de la expresión del MHC-1(ligandos para receptores de inhibición)(Figura 7)[30]. Debido a que todas las células sanas deben expresar el MHC-1, la pérdida de lo propio parece explicar cómo es que se lleva a cabo la protección de la agresión de las células NK en contra de las células sanas. La segunda hipótesis planteada es la de inducción de lo propio (del inglés, induced self), esta hipótesis plantea la expresión de moléculas inducidas como consecuencia de estrés o daño celular (ligandos para receptores de activación)(Figura 7)[31].

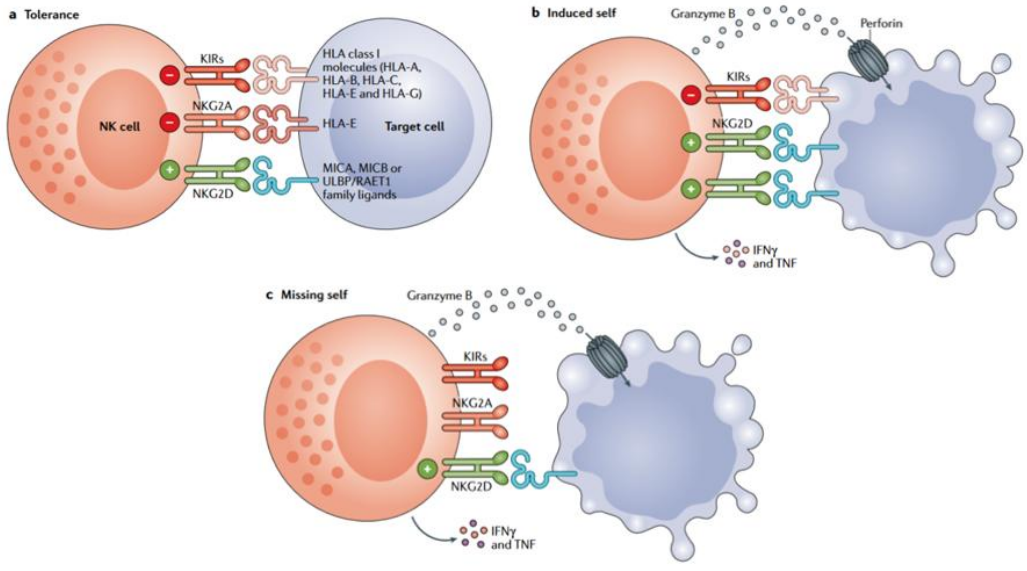


Figura 7. Las células NK responden a células infectadas por virus y transformadas mediante un equilibrio de señales. Las células NK expresan una variedad de receptores con funciones

activadoras o inhibidoras (o ambas), y el balance de las señales que se reciben a través de estos receptores determina la tolerancia o la activación de la citotoxicidad contra las células objetivo. **a)** Cuando el nivel general de señalización de los receptores inhibitorios supera al de los receptores activadores, la activación de las células NK se bloquea, lo que resulta en tolerancia hacia la célula que induce la señal. **b)** En caso de infección viral o transformación celular, las células suelen sobreexpresar ligandos estimuladores para los receptores activadores de las células NK, como NK G2D. Las interacciones resultantes inducen un nivel de señalización activadora que supera la señalización constitutiva a través de los receptores inhibidores (como los receptores tipo inmunoglobulina asesina (KIRs) y NKG2A), lo que activa la liberación de citocinas y la citotoxicidad de las células NK contra la célula objetivo. Este escenario se conoce como la respuesta de "inducción de lo propio". **c)** Cuando los ligandos de MHC clase I de los receptores inhibidores de las células NK se reducen, lo que ocurre comúnmente en células tumorales, la pérdida de señales inhibitorias y la señalización positiva sin restricción también conducen a la activación de las células NK. Este fenómeno se conoce como la respuesta de "perdida de lo propio". *Tomada de. Mayers et al., 2021.*

Como se ha mencionado anteriormente, las células NK expresan de manera constitutiva receptores de activación y de inhibición, los cuales son los responsables de desencadenar y generar una respuesta al interaccionar con sus correspondientes ligandos[14]. El balance delicado de las señales emitidas por parte de estos receptores dicta el destino de la respuesta de la célula NK (Figura 7).

Receptores de inhibición: Los principales receptores de inhibición son los que se comprenden en la familia de receptores KIR: KIR2DL1 (ligando HLA-C2), 2DL2, 2DL3 (ligando HLA-C1), 2DL5A, 2DL5B (ligando desconocido), 3DL1 (ligando HLA-BW4), 3DL2 (HLA-A), 3DL3 (ligando desconocido) y KIR2DL4 (ligando HLA-G)[32]. Debido a las señales de inhibición, las células que expresen niveles normales de MHC-I al unirse con su receptor KIR (inhibidor) correspondiente, se encuentran protegidas de una respuesta citotóxica mediada por células NK [33].

Por otro lado encontramos a la familia de receptores NK G2, el receptor de inhibición de esta familia es CD94/NKG2A (ligando HLA-E, molécula HLA-I no clásica), este receptor forma dímeros con la molécula CD94, este receptor se encuentra expresado mayormente en estadios tempranos de maduración de las células NK, sin embargo, su expresión se disminuye de manera significativa en los estadios maduros, lo anterior posee un impacto en la capacidad citotóxica de las células NK terminalmente diferenciadas[34]. Dentro de los receptores de unión a nectina los receptores de inhibición pertenecientes a este tipo son: TIGIT (del inglés, T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) el cual al unirse con su ligando CD155, disminuye la capacidad citotóxica de las células NK [35] y CD96, que comparte el mismo ligando y cuya señal disminuye la secreción de IFN-γ[36].

Los receptores LILR o receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina/CD85, que reconocen como ligando a la molécula HLA-I una molécula del MHC-I, se encargan de regular negativamente la activación de las células NK, y por ende, disminuir la capacidad citotóxica de las mismas, lo que favorece la evasión inmune y el desarrollo de procesos neoplásicos[37]. Otro receptor de inhibición es KLRG1 (del inglés, Killer cell lectin-like receptor G1) cuyo ligando es cadherina E, N y R[38].

Finalmente, receptores de inhibición como LAILR-1 (del inglés, Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor-1), SIGLEC (del inglés, Sialic acid recognizing Immunoglobulin-like Lectins), CEACAM (del inglés, carcinoembryonic-antigen-related cell-adhesion molecule) y CD161 son receptores no específicos de HLA (ligando colágeno, acido salicílico, CEACAM y OCIL respectivamente), estos receptores juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, inhibiendo la citotoxicidad de las células NK [394041].

Receptores de activación: La actividad citotóxica de las células NK se ve propiciada debido a las señales de estos receptores, los cuales se encuentran anclados en la superficie de la membrana de estas células y cuya acción se desencadena luego de que estos se han entrecruzado con sus respectivos ligandos en la célula blanco.

Dentro de los receptores KIR (Killer cell immunoglobulin-like receptors) encontramos receptores de activación como: KIR2DL4, DS1, DS2, DS3, DS4 (ligando HLA-G), DS5 (ligando HLA-C) y KIR3DS1 (ligando desconocido). Luego tenemos a los receptores que se encargan de señalizar para efectuar la citotoxicidad natural: NK p30, NK p44, NK p46 y NK p80.

En lo que se refiere a los receptores de la familia NK G2 y NK G2D, encontramos a CD94/NK G2C (ligando HLA-E) y NK G2D (MICA, MICB y ULBP4). Dentro de los receptores de unión a Nectina, los receptores de activación son: CRTAM y DNAM-1/CD226 (ligando CD112/CD155). Otros receptores de activación como: CD16 (FcγRIII) que es el receptor responsable de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), este receptor parece ser el único que posee la capacidad de promover funciones efectoras sin necesidad de la participación de receptores coestimuladores[42]. La citotoxicidad dependiente de anticuerpo posee gran relevancia en la destrucción de células tumorales y células infectadas por virus[43]. Y finalmente los receptores miembros de la familia SLAM, una familia de receptores que ha cobrado importancia debido a su abundante expresión y las funciones que desempeñan en las células NK [44].

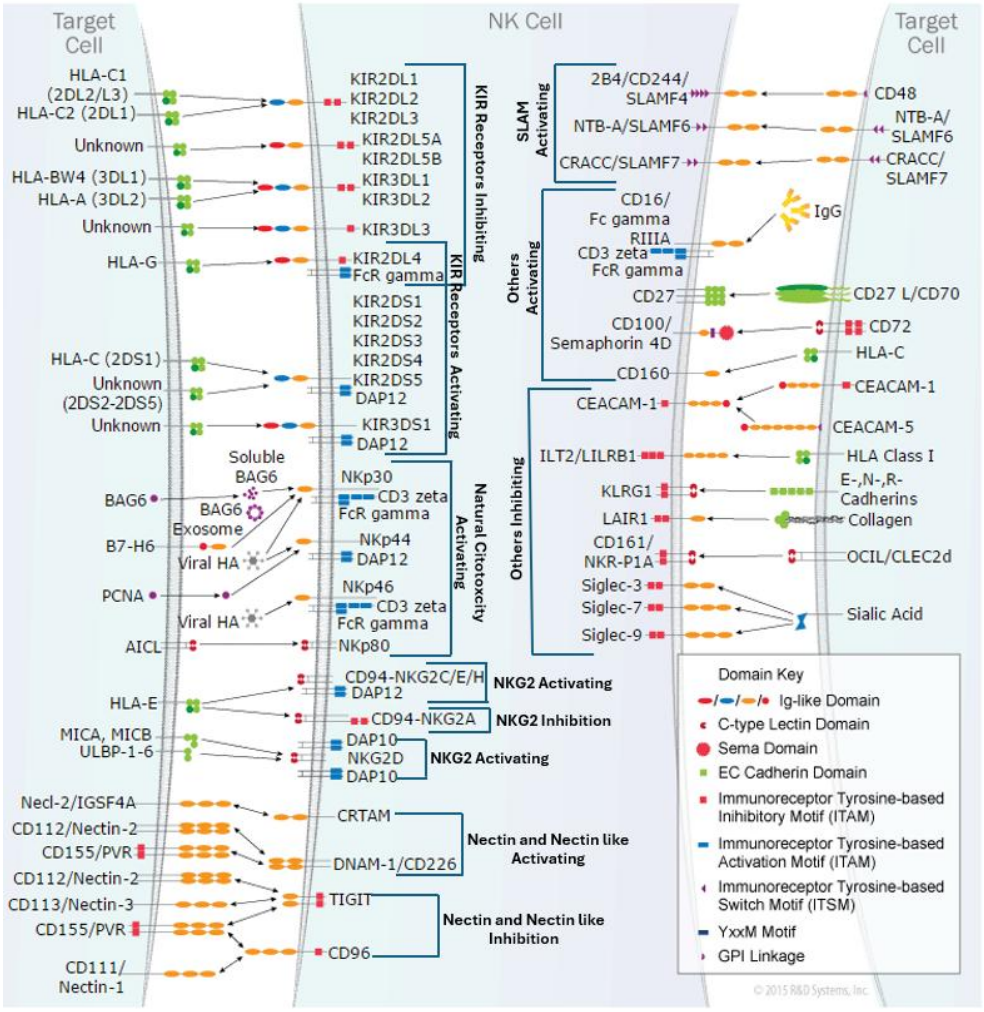


Figura 8. Receptores de las células Natural Killer. Modificado de, *R&D Systems, 2015.*

Aunque hoy en día se tiene una comprensión más clara de la biología y los mecanismos moleculares involucrados en la activación de las células NK, todavía se desconocen los mecanismos y la función precisa de los receptores de la familia SLAM, por lo que resulta importante comprender el papel que poseen estos receptores en la capacidad efectora de las células NK.

Como se mencionó anteriormente la capacidad citotóxica de las células NK resulta de suma importancia en la eliminación de las células transformadas y dicho mecanismo depende de la expresión adecuada y del balance de señales de los receptores de superficie anclados a membrana, así como de la interacción con sus respectivos ligandos en las células blanco[45]. Los receptores de células NK se pueden clasificar en al menos 3 grupos según su impacto en las funciones efectoras de las células NK, la primera categoría incluye todos aquellos receptores que favorecen la activación de las células NK mediante alguno de los siguientes mecanismos: adhesión, polarización granular y desgranulación. La segunda categoría la conforman los receptores de inhibición y finalmente la

tercera, los receptores con función dual o de interruptor, categoría en la cual se ubican los receptores de la familia SLAM.[46]

Receptores de la familia SLAM

Los receptores de la familia SLAM (del inglés, the signaling lymphocytic activation molecule) son receptores que se han asociado con funciones duales o de interruptor. Estos receptores son glicoproteínas transmembranales de tipo I y su expresión está restringida al compartimiento hematopoyético (Tabla 1). Esta familia está compuesta por SLAM (CD150), 2B4 (CD244), SLAMF7 (CRACC), Ly9 (CD229), CD48 (BLAST2), NTB-A (SLAMF6/CD352) y CD84. A excepción de 2B4, que reconoce como ligando a CD48 (otro miembro de la familia SLAM), todos los miembros de esta familia son auto ligandos y participan en el contexto de interacciones celulares heterotípicas u homotípicas [2847].

Tabla 1. Receptores de la familia de moléculas de activación linfocítica (SLAM)

Receptores SLAM	Expresión	Ligandos	Molecula adaptadora	Función	Molecula efectora	Efectos del acoplamiento del receptor
SLAM (CD150)	Células T Células B, Células dendríticas, macrófagos, plaquetas, células madre hematopoyéticas	SLAM	SAP, EAT-2, SHP2 y SHIP-1	Regulación de la producción de citocinas, polarización de células T_h1/T_h2, proliferación de células B y T	SHIP1, DOK1 DOK2,SHC, RAS–GAP, PKCθ	Células T: ↑ IFNγ DCs: ↑ IL-12, ↑ CXCL8 Macrófagos: ↑ IL-6, ↑IL-12 BCL-10, NF-κB
2B4 (CD244)	NK,células T CD8,γδ, basófilos, eosinófilos, mastocitos, progenitores multipotenciales	CD48	SAP, EAT-2, SHP1, SHIP2 y LAT	Citotoxicidad de células T y NK, molécula de co-estimulación de células NK	VAV1, SHIP1, CBL, LAT, PI3K	Células NK: ↑ IFNγ, ↑ lisis celular Células T CD8: ↑ IFNγ, ↑ IL-2, ↑ lisis celular Eosinófilos: ↑citocinas, ↑ peroxidasa, ↑ lisis celular
CD48 (BLAST2)	Células T efectoras/memoria $CD45RO^{hi}$ células B, monocitos y células dentríticas	2B4, CD2, FimH	No determinado	Activación de células T CD4, asociada a balsas lipídicas	Lck, Fyn	Células T: ↓ IFNγ ↓IL2, ↓ proliferación de células T Células B: ↓ IL3 por NK; ↓ CD40L activación
NTBA (Ly108)	Células T, células B, células NK, neutrófilos	NTBA	SAP, SHP1 y SHP2	Citotoxicidad de células NK	No determinado	Células NK: ↑ IFNγ, ↑ lisis celular Células T: ↑ IFNγ
Ly9 (CD229)	Células T, células B macrófagos	Ly9	SAP, EAT-2, SHP2 y AP2	Desconocida	FYNT	Células T: ↓ IFNγ
CD84	Muchos tipos celulares	CD84	SAP, EAT2, SHP2 y SHP1	Control de TCR inducido por la producción de IFN-γ	No determinado	Células T: ↑ IFNγ
SLAMF7 (CRACC)	Células T, células B, células NK, células dendríticas macrófagos	CRACC	SAP	Citotoxicidad de las células NK independiente de SAP	No determinado	NK: ↑ lisis celular

Debido a que estos receptores se expresan exclusivamente en células hematopoyéticas, su activación depende de la interacciones que se establecen entre estas células. Diversas investigaciones han logrado demostrar que los receptores de esta familia se encargan de regular eventos como: educación de las células NK, desarrollo celular, supervivencia celular, adhesión, inmunidad humoral, fagocitosis y citotoxicidad[4844].

Estructura, señalización y función de los receptores SLAM

Los genes de la familia SLAM están localizados dentro de un clúster de ≈ 400 kilo bases (kb) en el cromosoma 1q23, en humanos y ratones. Esta observación, junto con la estructura de exón-intrón conservada de los genes relacionados con SLAM, implica que la familia de SLAM se generó por duplicación secuencial de un único gen ancestro[49].

Los receptores SLAM poseen un segmento extracelular que consiste en dos dominios de tipo inmunoglobulinas (dominio variable, V, y un dominio constante, C2), un dominio transmembranal, y una cola citoplasmática que contiene múltiples motivos basados en tirosina TxYxxI/V (ITSM), donde T, es treonina, I es isoleucina, V es valina y X es cualquier aminoácido. La única excepción a esta organización estructural es CD48 el cual carece de dominios ITSM (Figura 9)[50].

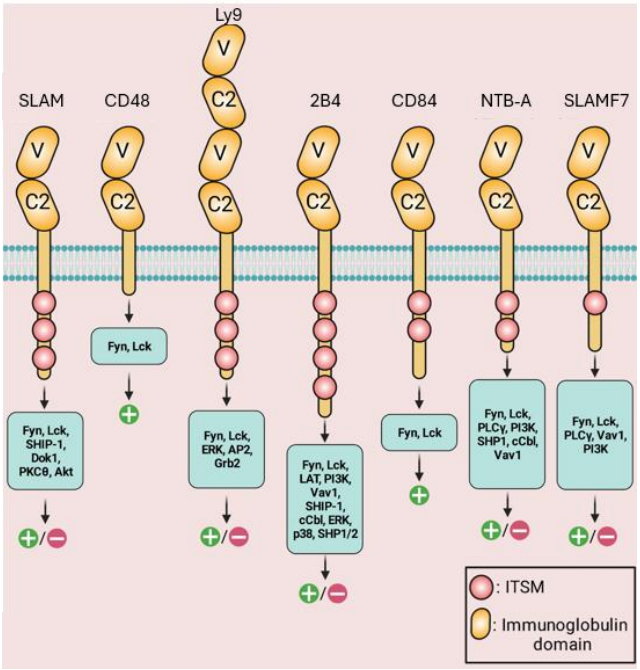


Figura 9. Estructura de los receptores SLAM, moléculas de señalización vía abajo y resultados de la señalización. Los dominios IgV (V) e IgC2 (C2), se encuentran de manera extracelular.

A través del dominio de tipo IgV, los receptores se unen a sus ligandos con gran afinidad. La cola citoplasmática de cada miembro de la familia posee ITSM, excepto CD48. 2B4 es el receptor con el mayor número de motivos ITSM, mientras que Ly9 presenta cuatro dominios de tipo inmunoglobulina en su dominio extracelular. Los símbolos positivos y negativos indican resultados de activación e inhibición, respectivamente. Modificado de, *Pooya et al., 2023*.

El motivo ITSM, juega un papel esencial en la determinación de las señales que se envían vía abajo de la cola citoplasmática de los receptores SLAM a las diferentes moléculas efectoras. La función de estos receptores está regulada por la familia de proteínas adaptadoras SAP (del inglés, SLAM-associated protein), las cuales se encargan de llevar a cabo los procesos de señalización que estimulan la función de células inmunes[51].

Proteínas adaptadoras de la familia SAP

La familia SAP consta de tres miembros: SAP (también conocido como SH2D1A o DSHP), EAT-2 (también conocido como SH2D1B, la proteína de transcripción asociada al sarcoma de Ewing-2) y, en roedores, ERT (también conocido como SH2D1C, transductor relacionado con EAT2)[52]. Los tres miembros se componen de un dominio SH2 (del inglés, Src homology 2) y una cola corta carboxilo-terminal de 23 aminoácidos, la cual es esencial para estimular la activación en las células NK [53]. EAT2 y ERT están más estrechamente relacionados entre sí que con SAP, estas moléculas se colocan en tándem en el cromosoma 1, se piensa que EAT2 y ERT probablemente fueron generados por duplicación de genes (Figura 10). En los seres humanos, el gen que codifica la ERT se ha convertido en un pseudo-gen no funcional[51].

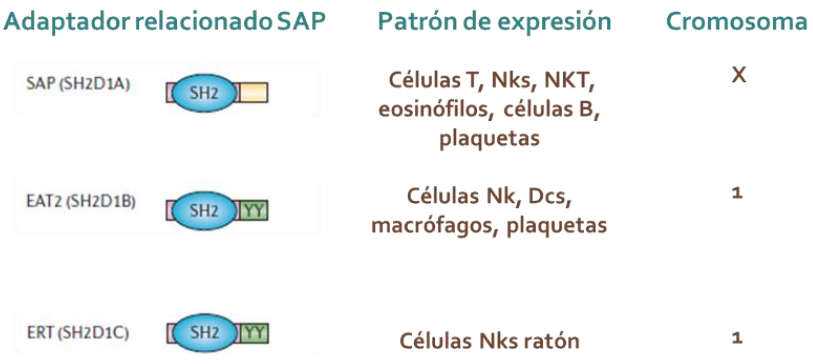


Figura 10. Estructura, localización cromosómica y patrón de expresión de adaptadores relacionados con SAP. SAP (proteína asociada a SLAM), EAT2 (transcrito 2- asociado al sarcoma

de Ewing) y ERT (transductor relacionado con EAT2) poseen un único dominio de homología 2 de SRC (SH2) seguido de una extensión C-terminal corta. A diferencia de SAP, EAT2 y ERT contienen tirosinas que son sitios de fosforilación en su cola C-terminal. Se indican los porcentajes de identidad de secuencia entre SAP y EAT2, y EAT2 y ERT; DC, célula dendrítica; NK, asesino natural; NK T, T natural-killer. Modificada de, *Veillette A* et al., *2006.*

Se ha reportado que SAP se expresa en células T, células NK, células Natural Killer T (NK T), eosinófilos, plaquetas y algunas células B. Contrario a esto, la proteína EAT2 se expresa en células NK, células dendríticas (DCs) y macrófagos.

Tanto SAP como EAT-2 funcionan como interruptores moleculares que determinan si los receptores de la familia de SLAM actúan como receptores que activan o inhiben la actividad de los receptores SLAM. En los últimos años, los datos han implicado a las familias SLAM y SAP en la activación de células TH2, generación de células de memoria de tipo B, producción de anticuerpos, activación de células NK, inhibición de células NK independiente de MHC y desarrollo de células NK T. Además de estar relacionadas con inmunodeficiencias humanas, autoinmunidad y neoplasias linfoides[54].

La asociación de los receptores de la familia SLAM con los adaptadores SAP e EAT2 esta mediada por motivos basados en tirosina (ITSM) en la región citoplásmica de los receptores SLAM y por el dominio SH2 de los adaptadores SAP. Estudios con SAP y EAT-2 indican que estos adaptadores se unen a la secuencia TIpYXXV / I (donde X denota cualquier aminoácido y pY denota fosfotirosina), que existe en una o más copias en todos los receptores de la familia SLAM, excepto CRACC, el cual contiene el motivo TVYXXV / I[44]. Este motivo no parece estar involucrado en el enlace de SAP o EAT2, cuando está fosforilado podría reclutar otros efectores del dominio SH2, como SHIP1(del inglés, SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase 1). Se ha demostrado que la través de mecanismos únicos, los adaptadores de SAP se acoplan a los receptores de la familia SLAM mediante señales intracelulares[49, 54].

Se conoce que la presencia de las proteínas de SAP habilita la transducción de señales de los receptores SLAM, a través de las señales de fosforilación de las tirosinas presentes en los ITSM de estos receptores. Esto sucede debido a que SAP posee la capacidad de reclutar una FYNT (isoforma especifica hematopoyética de[55] FYN) esta proteína cinasa está relacionada con la familia de proteínas cinasas Scr (PKT, por sus siglas en inglés, Protein Tyrosine Kinases). Esta función esta mediada por una interacción entre el dominio SH2 de SAP y el dominio SH3 de FYNT, lo que involucra un motivo de la arginina 78 (R78) de SAP. Este binomio SAP/Fyn induce la fosforilación de varios sustratos

cascada abajo incluyendo al factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav-1 (Figura 11) [51,56,57].

A diferencia de SAP, EAT-2 no contiene este motivo basado en R78, por lo tanto, EAT-2 recluta PLC-γ a través de una asociación que implica la tirosina en la cola carboxilo-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.[58]

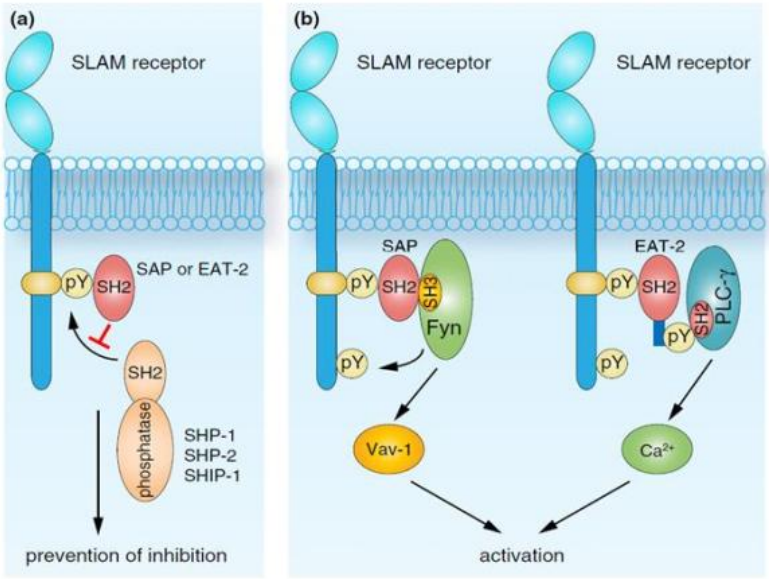


Figura 11. Señalización dual de las proteínas de SAP sobre los receptores SLAM (**a**) Una vez que los receptores SLAM se han unido a sus ligandos, se lleva a cabo el reclutamiento de las proteínas SAP (SAP y EAT-2) a través de los dominios SH2, a la tirosina fosforilada (pY) de los motivos ITSM de los receptores de la familia SLAM. Esta interacción impide la unión de los receptores de la familia SLAM a fosfatasas inhibitorias que contienen el dominio SH2, como SHP-1, SHP-2 o SHIP-1, evitando así la función inhibidora de los receptores SLAM. (**b**) los adaptadores de la familia SAP son capaces de transmitir señales de activación. SAP recluta a la quinasa Fyn de la familia Src, mediante una interacción que involucra el motivo que contiene la arginina 78 (R78) de SAP y el dominio SH3 de Fyn (izquierda). Fyn fosforila otros motivos basados en tirosina en el dominio citoplasmático de los receptores de la familia SLAM, y también fosforila Vav-1 para transmitir señales activadoras rio abajo. A diferencia de SAP, EAT-2 recluta a PLAC-gamma a través de una asociación que implica la tirosina C-terminal fosforilada de EAT-2 (tirosina 127) y el dominio SH2 de PLC-gamma (derecha). Asu vez PLC-gamma activa los flujos de calcio que también promueven la activación celular. *Wu & Veillette, 2016.*

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 [49]. 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 NK G2D, CD16 y, probablemente, DNAM-1, lo que conduce a una marcada supresión de la respuesta de las células NK hacia células blanco hematopoyéticas[5855]. Tal es el caso que se observa en pacientes que presentan la enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X (XLP), una inmunodeficiencia humana caracterizada por una respuesta inmune desregulada ante la infección por el virus Epstein-Barr (EBV)[59]. Esta desregulación conduce a una expansión descontrolada de células B, Ts y monocitos, ocasionando que el sujeto presente esplenomegalia y una producción excesiva de citocinas inflamatorias. Esto subraya la importancia de los receptores de la familia SLAM para una respuesta inmune regulada.

Regulación de las funciones efectoras de las NK a través de la familia SLAM

Los receptores de la familia SLAM juegan un papel crucial en la modulación de las funciones de las células NK, regulando su capacidad de eliminar células blanco. Entre los receptores más destacados de esta familia se encuentran 2B4, NTB-A y SLAMF7, que participan en la activación o inhibición de las células NK, dependiendo de la naturaleza de las señales que reciban y las interacciones con sus proteínas adaptadoras. A continuación, exploraremos las características, funciones y mecanismos de señalización de estos receptores en el contexto de las células NK.

El receptor 2B4, también conocido como SLAMF4 o CD244, como se mencionó anteriormente este receptor es el único cuyo ligando no es homofílico, lo que significa que no reconoce a otra molécula 2B4 como ligando, sino que se une a CD48, una glicoproteína relacionada con el glicofosfatidilinositol que se expresa en la superficie de células B, T, células plasmáticas y en menor medida en neutrófilos, monocitos y células CD34+, pero no en plaquetas ni glóbulos rojos. Además, se expresa también por progenitores de células linfoides innatas (ILC), que regulan la diferenciación de estas células.

2B4, fue identificado por primera vez como un receptor activador de células NK en ratones y, posteriormente, también en humanos. Posterior al reconocimiento de su ligando CD48, la señal de 2B4 se activa y se lleva a cabo la polarización de la maquinaria citolítica de las células NK. Primeramente, se lleva a cabo el reclutamiento de 2B4 mediante balsas lipídicas[60], seguido de la

fosforilación de los ITSMs citoplasmáticos y finalmente se lleva a cabo la interacción de SAP y otras moléculas de señalización. Todos estos procesos inician una cascada de señalización que conducen a la formación de la sinapsis inmunológica y a la liberación dirigida de perforina y granzima B desde los gránulos citotóxicos, además se induce la liberación de citoquinas como IFN-gamma y TNF-alfa[4261].

Aunque se tiene conocimiento de que la activación de 2B4 puede ser suficiente por si sola para estimular a las células NK que han sido activadas por IL-2, también posee la capacidad de coestimular de manera eficaz la actividad de otros receptores activadores de células NK, como NK p30, NK p46, CD16 y otros[626364]. Por otro lado, la activación de las células NK mediada por 2B4 puede ser bloqueada mediante la co-activación de receptores inhibidores como KIR2DL1 o CD94/NKG2A[65]. Este mecanismo es parte de la tolerancia de las células NK de lo propio, esto debido a que su ligando CD48 se expresa en todas las células hematopoyéticas de un individuo sano. Sin embargo, también permite que las células NKse activen a través de 2B4 por células hematopoyéticas transformadas o infectadas que hayan perdido la expresión de MHC-I (Figura 12)[66].

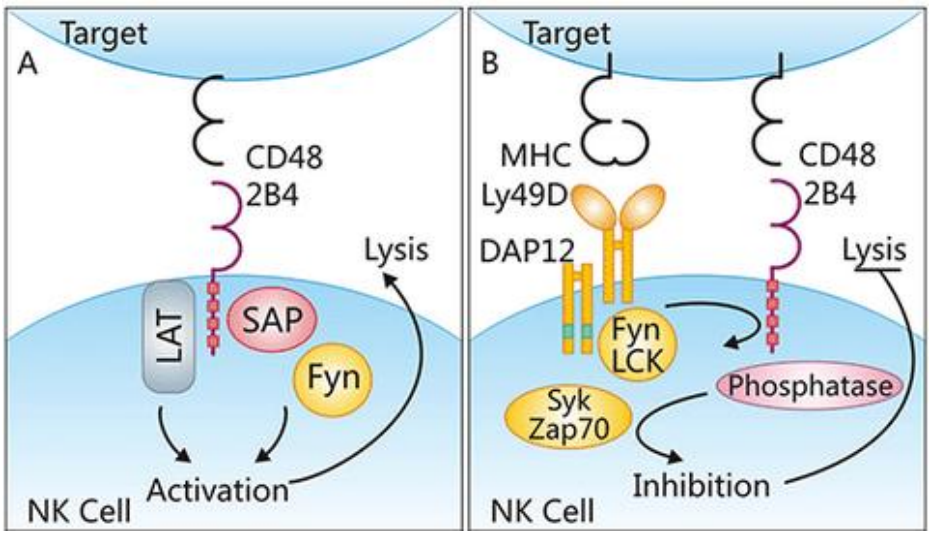


Figura 12. Modelos de señalización de activación e inhibición de 2B4. A) La activación mediada por 2B4 se establece una vez que este receptor ha reconocido a su ligando CD48 en una célula blanco, después de este evento se lleva a cabo la fosforilación de las secuencias ITSM por cinasas de la familia Scr. 2B4 se asocia tanto con LAT como con SAP directamente. LAT se encarga de activar a PLC-gamma y Grb2, mientras que SAP se une al dominio SH3 Fyn, lo que promueve la activación de moléculas efectoras rio debajo de la transducción de señales. **B)** Tanto en ratones como en humanos las células NK inmaduras o de individuos que presentan la enfermedad XLP, la unión de un receptor que contiene ITAM en una célula NK por el ligando correspondiente en una célula blanco potencial,

conduce a la activación de cinansas de la familia Syk, como Syk y Zap-70, lo que provoca eventos de señalización rio abajo que desencadenan la degranulación y la producción de citocinas. Cuando 2B4 es co-activado por CD48 en una célula blanco, 2B4 se forforila por la cinasa Scr. Posterior a esto una proteína inhibidora que contiene dominio SH2 es reclutada a la secuencia ITSM de 2B4. La fosfatasa entonces actúa sobre cinasas o moléculas adapatadoras cercanas para inhibir las funciones de las células NK. Modificado de, *McNerey et al., 2004.*

Además, se conoce que en ciertas patologías el ligando CD48 se encuentra sobreexpresado, por ejemplo, en el caso de la infección por el virus EBV, lo que resulta en una estimulación aumentada del receptor 2B4 y por lo tanto la activación desmedida de las células NK de estos individuos[67]. Este fenómeno ocasiona que exista una reducción de la expresión de 2B4 en la superficie de las células NK de estos individuos, lo que disminuye la capacidad de las células NK para mantenerse activas a largo plazo, promoviendo así un ajuste fino de su actividad[68]. Este fenómeno ocasiona que las células NKse vuelvan menos efectivas en la eliminación de las células infectadas a medida que el virus establece una infección latente[68].

En las células NK en reposo, la expresión de SAP es muy baja y la estimulación de 2B4 solo puede desencadenar la citotoxicidad de estas células cuando es coestimulada con receptores activadores adicionales de las células NK. Se ha demostrado que la estimulación de las células NK con IL-2 e IL-12 aumentan la expresión de SAP[69]. En estas células NK, la activación de 2B4 por sí sola ha demostrado ser suficiente para inducir su capacidad citotóxica, lo que demuestra una correlación entre la expresión regulada de SAP y la función del receptor 2B4[69]. Se conoce mucho menos de la función que poseen los receptores NTB-A y SLAMF7 en las células NK.

El receptor NTB-A, también conocido como SLAMF6 o Ly108, es otro miembro de importancia de la familia SLAM, este es un receptor homofilico, lo que significa que se une a otra molécula de NTB-A en la superficie de una célula vecina o una célula blanco. Al igual que 2B4, NTB-A contiene ITSMs que son fosforilados en respuesta a la activación de cinasas de la familia Scr. Esto permite la unión de proteínas adaptadoras como SAP o EAT-2, que son necesarias para la transducción de señales activadoras. De esta manera la presencia de las proteínas adaptadoras de SAP determina la activación de las células NK, mientras que su ausencia puede alterar la función de este receptor hacia una señal inhibitoria (Figura 13).

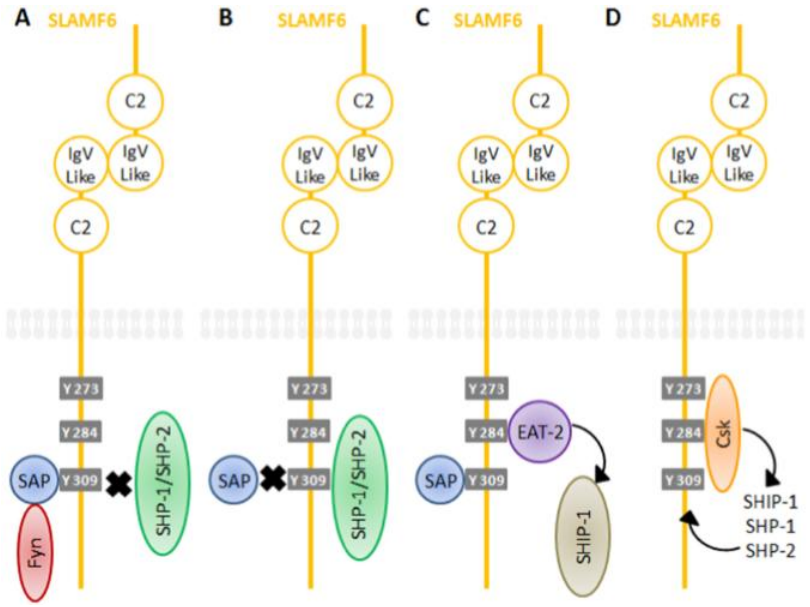


Figura 13. Señalización dual de la función del receptor NTB-A. Bajo el reclutamiento de las proteínas adaptadoras de SAP a los ITSM fosforilados, el receptor NTB-A actúa como un receptor activador. **A)** mientras que la cinasa Fyn se una a SAP a través del residuo de arginina 78 de SAP, bajo el reclutamiento de SHP-1 y SHP-2 y SHIP-1, NTB-A actúa como un receptor de inhibición **B)** en ausencia de SAP, NTB-A puede funcionar como un receptor de inhibición. **C)** NTB-A también puede reclutar a EAT-2, a través de una tirosina diferente, lo que conduce a la activación celular como resultado de la fosforilación de SHIP-1. La cianasa inhibidora Csk **D)** puede reclutar fosfatasas adicionales mediante la fosforilación de otros ITSM.

La activación de NTB-A en células NK humanas, ya sea mediante el entrecruzamiento mediado por anticuerpos, proteínas de fusión NTB-A o interacción homofílica con células que expresen NTB-A, estimula tanto la citotoxicidad de las células NK como la producción de IFN-gamma y TNF-alfa. Esto le confiere al receptor NTB-A en un regulador positivo de la función de las células NK. Al igual que 2B4, este receptor puede co-estimular de manera efectiva otras señales activadoras de las células NK. De manera interesante, como ocurre con 2B4 en sujetos con XLP, la activación de NTB-A también se encuentra alterada, y su activación en células NK deficientes de SAP provoca una fuerte inhibición de la función de estas células.

Receptor SLAMF7, también conocido como CRACC o CD319, es un receptor al igual que NTB-A, de naturaleza homotípica y está mayormente expresado en células citotóxicas humanas. Este receptor a diferencia de 2B4 y NTB-A, solo posee un ITSM en su dominio citoplasmático y pose la capacidad de unirse únicamente a EAT-2, pero no a SAP.

Este receptor se fosforila después de haber reconocido a su ligando y recluta a EAT-2, lo que promueve la fosforilación de SLAMF7 a través de una cinasa Crs. La señalización de este receptor provoca la fosforilación de PLC-gamma 1, esta vía de señalización aumenta la polarización de gránulos líticos y la velocidad con la que ocurre la liberación de estos hacia la célula blanco, lo que se traduce en una mayor capacidad citotóxica por parte de las células NK. Se ha reportado además que el entrecruzamiento de este receptor en presencia de EAT-2 parece incrementar la fosforilación de Akt, la cual es un indicador de la activación de la cinasa PI3K, la cual participa durante el proceso de polarización y degranulación en las células NK.

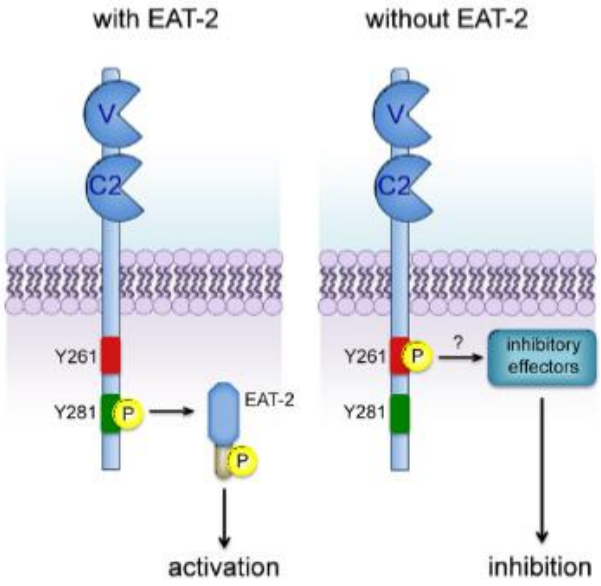


Figura 14. Señalización dual del receptor SLAMF7 a través de la proteína adaptadora EAT-2. una vez que se promueve el entrecruzamiento de SLAMF7 en células NKse favorece la capacidad citotóxica de estas células, y este efecto se logra después del reclutamiento de EAT-2 a la tirosina 281 (Y281) localizada dentro de un motivo ITSM. Por otro lado, cuando se involucra la activación de SLAMF7 en ausencia de EA-2, se promueven potentes efectos inhibitorios, y este efecto depende de la tirosina 261 (Y261), la cual parece reclutar a la fosfatasa SHIP-1. Este modelo muestra que SLAMF7 exhibe una función dual en células murinas, el cual va a depender de la presencia o ausencia de EAT-2. Tomada de, *Veillette et al., 2013.*

Se conoce que en ausencia de la proteína adaptadora EAT-2, SLAMF7 ejerce funciones inhibitorias, tras llevarse a cabo la fosforilación de su tirosina 261 (Y261) (Figura 14).

Estudios previos han demostrado que los receptores de la familia SLAM son cruciales para mediar la eliminación de células hematopoyéticas transformadas. Esto se debe en parte a la expresión

restringida de los receptores de la familia SLAM en las células hematopoyéticas. De hecho, la expresión ectópica de los receptores de la familia SLAM en células no hematopoyéticas las vuelve susceptibles a la lisis por parte de las células NK que expresan adaptadores de la familia SAP[28].

Las células NK en la inmunovigilancia contra el cáncer

Como se mencionó anteriormente las células NK son la primera línea de defensa contra infecciones virales y células transformadas. Se sabe que este tipo celular es un elemento de importancia en la inmunovigilancia del cáncer, debido a la capacidad que poseen de poder diferenciar las células sanas de las células cancerígenas, a través del reconocimiento de alteraciones físicas o químicas conservadas que acompañan el proceso de transformación a células malignas[7071].

Particularmente mediante un fenómeno que se le conoce como pérdida de lo propio o "missing self" que corresponde a la pérdida de la expresión de moléculas de MHC de clase I, lo que las diferencia del resto de las células sanas, permitiendo la evasión de las señales de inhibición que se manifestarían al presentar de manera normal las moléculas MHC de clase I. Esencialmente este fenómeno desencadena la respuesta citotóxica por parte de las células NK, hacia las células cancerígenas de diferentes tejidos, incluidas las células neoplásicas de origen hematopoyético[72].

La capacidad citotóxica de las células NK para eliminar células cancerígenas sin sensibilización o estímulo previo es un fenómeno que se describió hace aproximadamente 40 años. A este tipo de citotoxicidad se le conoce como citotoxicidad natural, la cual se desencadena por un balance de señales entre los receptores de activación e inhibición de las células NK, posterior al reconocimiento de la célula blanco. A demás de este tipo de citotoxicidad, encontramos otro mecanismo efector de las NK el cual se caracteriza por el reconocimiento de células blanco que fueron previamente marcadas con anticuerpos y a través del cual la célula NK ejercerá una actividad citotóxica mediada por anticuerpo, también conocida como ADCC (del inglés Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) (Figura 15)[7322].

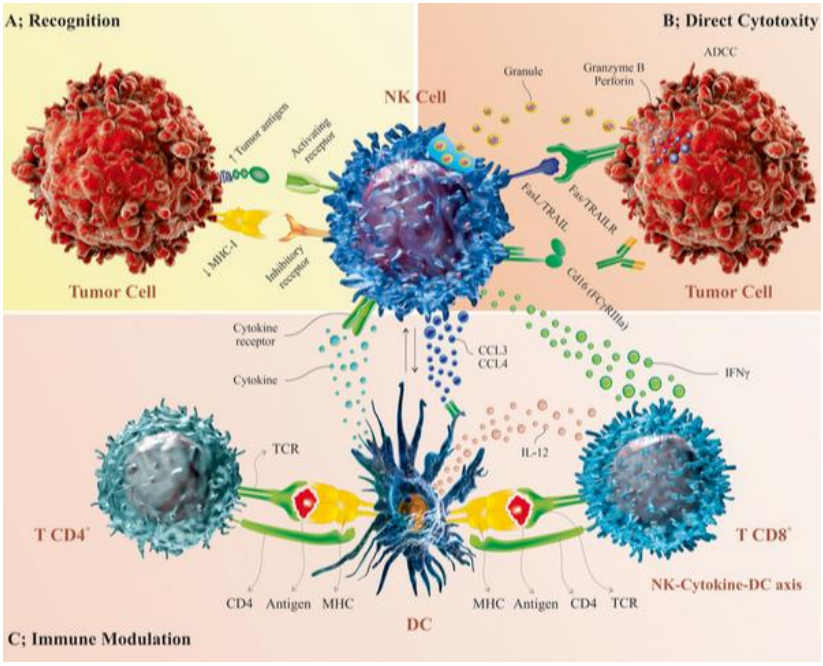


Figura 15. Citotoxicidad mediada por células NK contra las células tumorales afecta tanto a la inmunidad innata como adaptativa. A) Como células innatas citotóxicas, las células NK pueden identificar ligandos inducidos por estrés y la reducción en la expresión de MHC-I, mediante sus propios receptores activadores e inhibidores, respectivamente. B) Tras su activación, las células NK pueden estimular la eliminación de células transformadas mediante la liberación de gránulos citotóxicos cargados con granzima B y perforina, la interacción de receptores/ligandos de muerte, y también por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). C) Además las células NK activadas pueden producir una gama de citocinas y quimiocinas que desencadenan la maduración y el reclutamiento de células dendríticas (DCs), lo que lleva a la modulación de la respuesta de células T colaboradoras (Th). Tomada de, *Faroogh et al., 2021*.

A través de diferentes estudios sobre la actividad citotóxica de las células NK se ha demostrado que existe una correlación entre la citotoxicidad alterada de las células NK y un mayor riesgo de desarrollar cáncer, evidencia que conduce a la idea de que la manifestación y el proceso del cáncer están íntimamente relacionados con una respuesta inmune anormal o mal dirigida.[7475]

Por lo tanto, una explicación exhaustiva de los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales las células NK eliminan células neoplásicas resulta ser una tarea importante para explorar el papel de este tipo celular en la vigilancia y en la terapia inmune.

Papel de los receptores 2B4, NTB-A y SLAMF7 en la regulación de las funciones efectoras de las células NK en la inmunovigilancia contra el cáncer

Estudios previos han demostrado que los receptores de la familia SLAM son cruciales para mediar la eliminación de células hematopoyéticas transformadas. Esto se debe en parte a la expresión restringida de los receptores de la familia SLAM en las células hematopoyéticas. De hecho, la expresión ectópica de los receptores de la familia SLAM en células no hematopoyéticas las vuelve susceptibles a la lisis por parte de las células NK que expresan adaptadores de la familia SAP.[28]

Los receptores mejor estudiados en el contexto de la inmunovigilancia contra el cáncer en esta familia son 2B4, NTB-A y SLAMF7. Se ha demostrado que su expresión anormal o señalización defectuosa contribuyen a una disminución en la capacidad citotóxica de las células NK para eliminar células neoplásicas. Como antecedente de la importancia de estos receptores en la actividad citotóxica de las células NK en contra de células blanco de origen hematopoyético, encontramos el estudio realizado por Zhongjun y colaboradores (2009), en el que a través de modelos murinos demostraron 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. Estos resultados presuponen que la afectación en la señalización de estos receptores desencadenan un patrón de inhibición de la función citotóxica en contra de células de origen hematopoyético (Figura 16)[28].

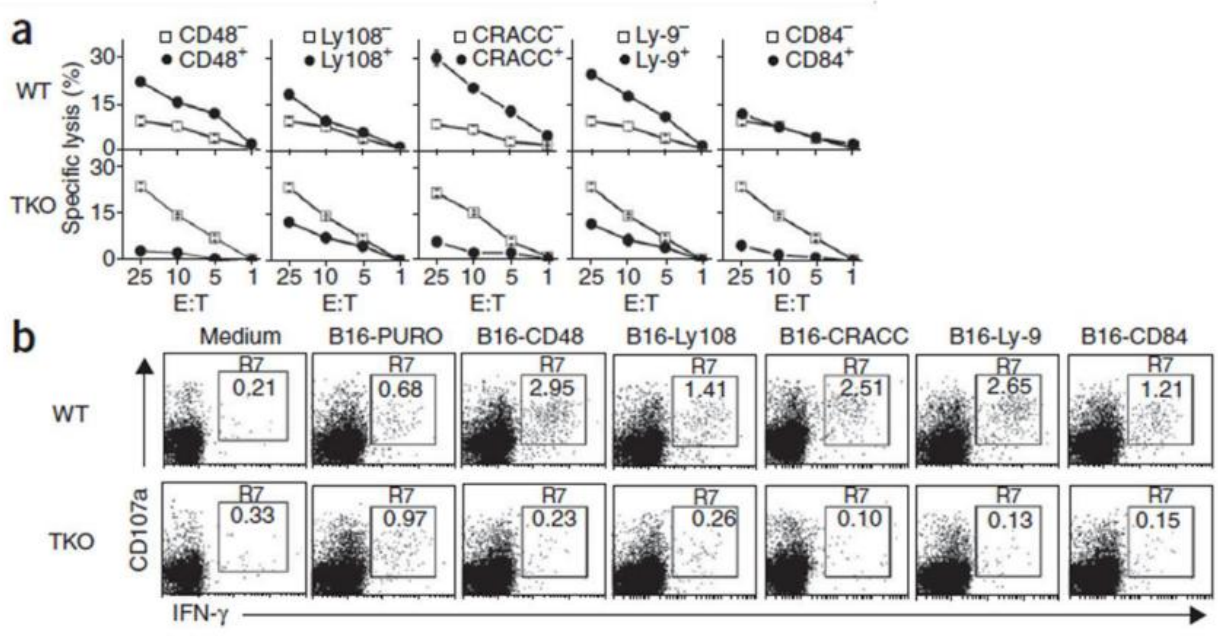


Figura 16. La ausencia de las proteínas adaptadoras de la familia SAP inactiva la función de los receptores de la familia SLAM en células NK. ***a)*** Ensayo de liberación de 51Cr donde se evalúa

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-γ 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

Células NK deficientes en la expresión de SAP o EAT-2 muestran importantes alteraciones funcionales que les imposibilita eliminar células hematopoyéticas malignas, lo anterior se evidencia en experimentos realizados en ratones nulos en la expresión de SAP y EAT-2 resultando totalmente refractarios al rechazo de trasplantes de esplenocitos que pierden la expresión de MHC clase I (Figura 17)[57].

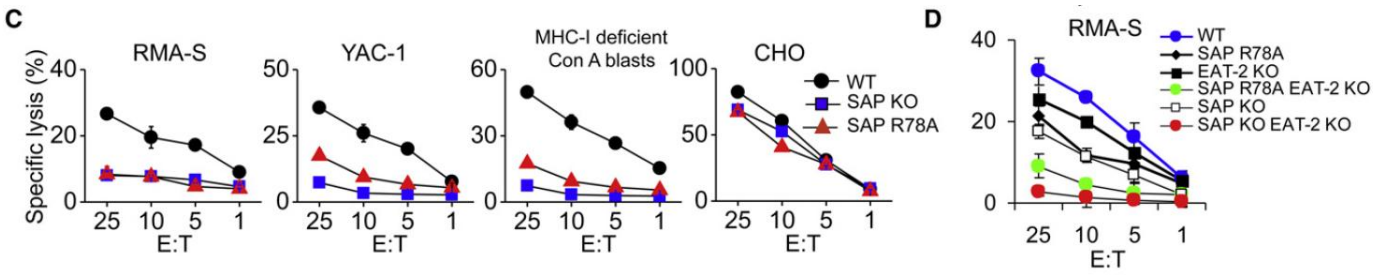


Figura 17. La unión de SAP al sitio de unión Fyn es crítico para la activación de las células NK. Se probó la citotoxicidad ex vivo con células NK de hígado y líneas celulares blanco RMA-S, YAC-1, esplenocitos deficientes de MHC-I y CHO.

Se ha evidenciado también, que la afectación de los miembros de la familia SLAM y su proteína adaptadora SAP se manifiestan en ciertas neoplasias, tal es el caso del Mieloma Múltiple (MM) en donde a pesar de que las células transformadas manifiestan una expresión elevada del CD48, las células NK de estos pacientes poseen baja expresión de 2B4 lo cual se vio asociado con el escape de las células tumorales ante el sistema inmune[76]. Este hallazgo evidencia la importancia del equilibrio entre las señales de estos receptores ante sus ligandos en la célula blanco, para que exista una adecuada función citotóxica.

Por otra parte, Coma et al., (2017), observaron una disminución en la expresión de CD48 en células B de leucemia linfocítica crónica (LLC) en comparación con células B de sujetos sanos[77]. Lo que conduce a una señalización alterada del receptor 2B4 en las células NK de estos pacientes, esta alteración ocasiona una disminución de la función citotóxica de las células NK, contribuyendo así a la inmunidad comprometida observada en pacientes con LLC. A demás, las células NK expandidas a

través del compromiso del eje CD48/2B4, mostraron una mayor capacidad antitumoral junto con la habilidad de poder infiltrar el microambiente tumoral, lo que condujo a una mejora en la eficacia terapéutica en la LLC[78].

Por el contrario, en lo que respecta a SLAMF7 y NTB-A, se ha reportado que la expresión de dichos receptores se encuentra elevada en los pacientes con Mieloma Multiple (MM), mientras que su expresión está restringida en las células normales. En algunos estudios preclínicos, SLAMF7 fue el objetivo del mAb humanizado, HuLuc63 (Elotuzumab), dicha molécula se encarga de inhibir la unión de las células MM a las células del estroma de la médula ósea e induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra las células MM[79].

En lo que respecta a la leucemia mieloide aguda (AML) se ha detectado un silenciamiento epigenético por metilación de CD48, lo que conlleva a que las células leucémicas presenten una evasión inmune ante las células NK, este escenario manifestó una afectación en la sobrevida de los pacientes con dicha patología. Este estudio también revela que el uso de Decitabina puede revertir la evasión inmune y ayudar a las células NK a reconocer y eliminar a las células de AML[76].

Actualmente, se desconoce la expresión de estos receptores en el contexto de la leucemia linfoblástica y su implicación en la función aberrante de las células NK observada en esta neoplasia, la cual representa una enfermedad de gran importancia debido a que ocupa uno de los primeros lugares en la población pediátrica de México. Por lo anterior, es de gran importancia conocer si alteraciones en la expresión y/o función de los receptores de los receptores 2B4, NTB-A y SLAMF7 contribuyen con una alteración en la respuesta efectora de células NK en la inmunovigilancia de esta patología.

Leucemia

La leucemia es una enfermedad de carácter neoplásico que afecta el desarrollo de los glóbulos blancos. De acuerdo con el tiempo de progresión y de la población afectada, esta enfermedad se clasifica en: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia linfoblástica aguda (LLA)[80].

Esta neoplasia representa el cáncer de mayor incidencia y mortalidad entre todos los canceres en la población infantil a nivel mundial, representando el 28.3% del total de incidencias y el 29.9% del total de muertes[81]. En México, esta neoplasia ocupa representa el 34.7% de incidencias y el 49.5% de mortalidad. En el 2020, México fue considerado el sexto país a nivel mundial con mayor incidencia y el quinto lugar con mayor mortalidad en leucemia infantil. Entre los tipos de leucemia descritos con

anterioridad la LLA representa el 80% de las leucemias presentadas en la edad pediátrica[82]. En México el Sistema Nacional de Información de Salud (SINAIS) reporta que este tipo de leucemia es la causa del 5.6% de todas las muertes en la población infantil, representando así la segunda causa de muerte en niños y adolescentes[83].

Leucemia Linfoblástica Aguda

La leucemia linfoblástica aguda se caracteriza por la transformación maligna de una célula progenitora linfoide inmadura. Estos precursores linfoides presentan una alta tasa de proliferación y de reordenamientos genéticos; características que favorecen la aparición de mutaciones espontáneas y de otras alteraciones citogenéticas que facilitan la transformación maligna[8485].

Actualmente la etiología de esta patología permanece incierta, sin embargo, se le ha atribuido el carácter de multifactorial, debido a que se conoce que existen diversos factores importantes en la susceptibilidad del desarrollo de esta neoplasia. Mas del 75% de los pacientes que presentan esta neoplasia presentan anomalías genéticas primarias, por lo que el factor genético juega un papel importante en la etiología de las leucemias agudas[86]. Lo anterior se sustenta en que existe una estrecha asociación de las LLA y algunas translocaciones cromosómicas[8687] (Tabla 2), y además se conoce que determinadas enfermedades genéticas cursan con mayor incidencia de esta patología (síndrome de Down, Klinefelter, neurofibromatosis, Schwachman, Bloom, Farconi, etc.)[87].

Tabla 2. Translocaciones cromosómicas más frecuentes en LLA

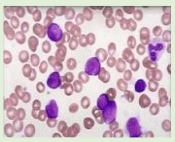
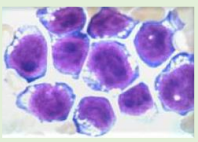
Translocación	Frecuencia	Genes alterados	Características
t (1:19) (q23;p13)	5-6%	E2A-PBX1	Fenotipo pre-B hiperleucocitosis. Necesario tratamiento intensivo
t (1:22) (q34;p11)	3-5%	BCR-ABL	Cromosoma Philadelphia. Tratamiento imatinib. Hiperleucocitosis
t (4:11) (q21;p23)	2%	MLL-AF4	Estirpe B. Asociada a LLA lactante. Hiperleucocitosis. Pronóstico pobre
t (12:21) (p12;q22)	25% de las LLA Pre-B	TEL-AML	Fenotipo B. Buen pronóstico. Marcada sensibilidad a la asparraginasa

Entre los factores medioambientales que pueden propiciar el desarrollo de esta patología destaca la exposición a radiaciones ionizantes y la exposición a ciertas sustancias químicas como el benceno[88], por último, se ha dado mucha importancia al papel de los virus en el estudio de la etiología de las leucemias. Esto se debe a que la mayoría de las LLA se producen en un periodo en el que el individuo está en pleno desarrollo de su sistema inmune, lo que lo vuelve más vulnerable a los efectos oncogénicos de determinados agentes virales, hasta el momento el virus que presenta una clara asociación con la susceptibilidad de desarrollar esta enfermedad es el virus de Epstein-Barr (EBV)[89].

Detección, clasificación y pronóstico

El diagnóstico de esta enfermedad requiere de una confirmación mediante un aspirado de médula ósea, con el que se realiza el análisis morfológico. La clasificación propuesta por la Sociedad Franco Americano Británico (FAB), es una clasificación basada en la morfología de las células leucémicas. Bajo este sistema la LLA presenta tres variantes morfológicas L-l, L-2 y L-3[90]. El análisis del fenotipo inmunológico resulta de gran importancia para determinar el linaje celular afectado, lo que establece la clasificación actual de las entidades clínico-biológicas según la OMS. Además, las anomalías citogenéticas identificadas en las células leucémicas no solo permiten definir subtipos pronósticos, sino que también son la base para la elección del tratamiento adecuado (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros empleados para la clasificación FAB de las leucemias. Tomado y editado de Organización Mundial de la Salud, 2008; Sabattini et al 2010; Campo et al, 2011.

CLASIFICACIÓN FAB DE LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS			
Característica	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Grande	Grande
Cromatina celular	Fina o en grumos	Fina	Fina
Forma nuclear	Regular, hendiduras	Irregular, hendiduras	Regular, oval y redondo
Nucléolo	Indistinguible	Grande, >1 por célula	Grande >1 por célula
Cantidad de citoplasma	Escaso	Moderado	Abundante
Basofilia citoplasmática	Leve	Leve	Prominente
Vacuolas citoplasmáticas	Ausentes	Ausentes	Presentes
Morfología			
CLASIFICACIÓN INMUNOFENOTIPICA DE LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA			
Pre-B Temprana	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24		
Pre-B común	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10		
Pre-B tardía o transicional	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20		
Pre-B	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC		

Células B o maduras	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC, IgS
T-temprana	cD3, CD5, CD+
T- cortical	CD5, CD2, CD3, CD1
T-madura	Ccd3, CD5, CD2, CD3

c/C, citoplasmático; S, membrana.

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 mm^3 o más de 10 años son clasificados como de alto riesgo; mientras que los pacientes con una cuenta de leucocitos menor a 50,000 x mm^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 cuya clasificación pertenece a un riesgo estándar presentan un mejor pronostico que los pacientes que están clasificados en alto riesgo. En general, las tasas de supervivencia de los niños de riesgo estándar llegan a ser hasta del 98% en países desarrollados[91].

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.

Infiltración de células leucémicas a ciertos órganos: La infiltración de blastos al líquido cefalorraquídeo, o a los testículos (en niños), reduce la probabilidad de remisión de la enfermedad. 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 que presentan hiperdiploidía (más de 50 cromosomas en células leucémicas), tienden a tener mayor probabilidad de alcanzar la remisión de la enfermedad, particularmente si cuentan con copias adicionales de los cromosomas 4, 10 o 17. En contraste con los pacientes que presentan hipodiploidía (menos de 46 cromosomas) que suelen enfrentar un pronóstico menos favorable.

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. 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, por lo que son considerados para trasplante de células troncales hematopoyéticas alogénicas [7]. Niños cuya enfermedad mínima residual es menor a 0.01% en los días 33 y 78 presentan una sobrevida libre de eventos a los 5 años.

La estratificación de riesgo de los pacientes ha permitido que se logren avances importantes en la supervivencia de niños con LLA de países desarrollados (90% a 5 años)[91].

Sintomatología

A medida que los linfoblastos sustituyen a la hematopoyesis normal se manifiestan 5 síndromes clínicos que son: Síndrome anémico, hemorrágico, febril, lisis tumoral, infiltrativo.

Acompañados de las siguientes manifestaciones clínicas: trombocitopenia, neutropenia, organomegalia, pancitopenia o bicitopenia, leucocitosis y blastos en la médula ósea o sangre periférica[90].

Etapas del Tratamiento

Inducción a la remisión: En esta fase se pretende destruir la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se prescriben medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de ADN, como vincristina, prednisona y L-asparginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorubicina. Estos no producen daño a la médula ósea normal y actúan pronto; sin embargo, no son útiles para el tratamiento a largo plazo. Con estos medicamentos se han reportado tasas de remisión completa por arriba del 98%[92].

Consolidación: Con la recuperación de la hematopoyesis se inicia el tratamiento de consolidación, que debe iniciarse pronto, después de la fase previa. En esta fase el objetivo es destruir las células residuales que han superado la etapa previa; se pueden emplear medicamentos que afectan la síntesis de ADN y que pueden destruir las células en reposo o fuera del ciclo G0 del ciclo celular. Aquí se administran altas dosis de metotrexato, con o sin 6-mercaptopurina, L-asparginasa y citarabina, o bien combinación de dexametasona, vincristina, L-asparginasa, doxorrubicina y tioguanina, con o sin ciclofosfamida [92].

Terapia de mantenimiento**:** Esta fase tiene como objetivo destruir las últimas células residuales leucémicas. En esta etapa se administran medicamentos que intervienen en la síntesis de ADN, como mercaptopurina y metotrexato, se genera la mielosupresión. Estos fármacos son tolerados adecuadamente y se administran durante dos o tres años [92].

Cada una de estas etapas del tratamiento son esenciales para un resultado exitoso. En todos los pacientes se lleva a cabo una fase de intensificación de la terapia después de una inducción a la remisión. La intensidad, tanto de la terapia de inducción como postinducción se determina mediante factores de pronósticos clínicos y biológicos que se utilizan para las asignaciones de tratamiento basadas en el riesgo.

Existen casos en los que aun cuando se concluye el tratamiento hay reincidencia de la leucemia, esta condición repercute negativamente en el pronóstico del paciente que la manifieste. Esta condición ha sido relacionada con la enfermedad mínima residual (EMR), que se define como la presencia de poblaciones residuales de células leucémicas en la MO una vez concluido el esquema de tratamiento. La identidad de esta población celular no ha sido del todo establecida, pero se ha reportado que estas poblaciones conservan marcadores que han permitido identificar diferentes subpoblaciones que presentan grados muy variados de diferenciación, proliferación y capacidad de autorrenovación.

Como se mencionó anteriormente, gracias a que en las últimas décadas se han logrado avances significativos en el tratamiento de la LLA, además de su adecuada estadificación de riesgo del paciente, se ha logrado, que en países desarrollados los porcentajes de sobrevida libre de eventos alcance a los cinco años cerca del 80% [93]. Sin embargo, en México la supervivencia global a los 4 años se encuentra alrededor del 65%; a pesar del uso de los mismos esquemas de quimioterapia de países desarrollados. Así mismo, se reporta que alrededor del 30% de los niños con LLA fallecen por causas relacionadas con la enfermedad o su tratamiento, por lo que la investigación sobre la etiología y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas se vuelven sumamente necesarias para nuestra población. Recientemente, se ha evidenciado la disminución en la capacidad citotóxica de pacientes pediátricos con LLA con respecto a grupo control sano, así mismo se sugiere que dicha disminución puede verse explicada debido a una baja expresión de la proteína adaptadora SAP en pacientes que presentan una cuenta leucocitaria mayor a 50,000 x mm^3. Así mismo se demuestra que existe una asociación significativa positiva baja (r^2=0.261) (p= 0.030)entre la expresión de dicha proteína y la capacidad efectora de las células NK (Figura 18)[94].

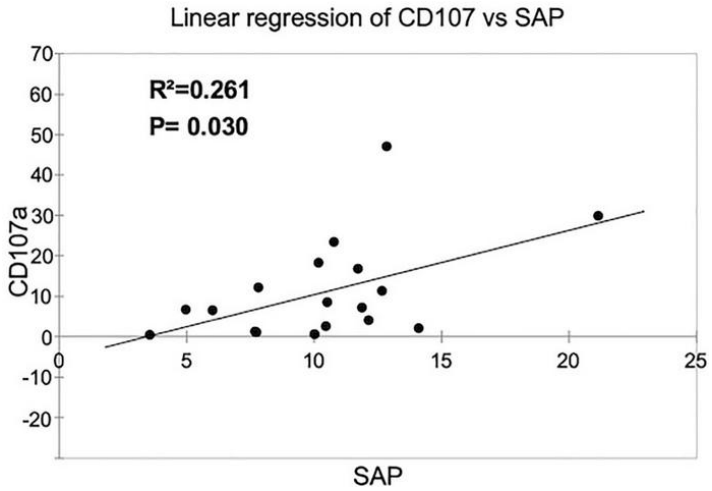


Figura 18. Correlación positiva entra la expresión de SAP y una reducción en la citotoxicidad de las células NK en pacientes con LLA-B con un recuento de leucocitos superior a 50,000/mm^3. Estudio de correlación positiva en 18 pacientes con LLA de tipo pre-B, en los cuales fue posible determinar tanto la citotoxicidad mediada por células NK como la expresión de SAP. Los valores R^2 y *P* se indican en la figura. Tomada de Valenzuela. *et al.*, 2020.

En este sentido y puesto a la relevancia que poseen los miembros de la familia SLAM en la capacidad efectora de las células NK frente a las células transformadas, en este trabajo nos enfocamos en conocer la biología de las células NK en un escenario leucémico, llevando a cabo la evaluación de la expresión de los receptores de la familia SLAM (2B4, CD48, NTB-A y SLAMF7) tanto en células NK como en las células leucémicas y analizando la capacidad citotóxica en pacientes con leucemia linfoblástica aguda al momento del diagnóstico con la finalidad de comprender el papel que juegan los receptores de la familia SLAM en la leucemia linfoblástica.

JUSTIFICACIÓN

Las células NK desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune debido a que representan la primera línea de defensa contra infecciones virales y células transformadas, por lo que resultan ser un elemento de gran importancia en la inmunovigilancia contra el cáncer, por su capacidad de diferenciar las células sanas de las células cancerígenas, a través del reconocimiento de alteraciones físicas o químicas conservadas que acompañan el proceso de transformación a células malignas, esencialmente este fenómeno desencadena la respuesta citotóxica hacia las células cancerígenas de diferentes tejidos, incluidas las células neoplásicas de origen hematopoyético.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer pediátrico con mayor prevalencia a nivel mundial y México es uno de los países con mayor incidencia y mortalidad por leucemia en población infantil. Las células NK han surgido como un blanco importante en el desarrollo de inmunoterapias para esta enfermedad. A pesar del progreso en el estudio de las células NK y la LLA, aún queda mucha información por descubrir sobre los principales mecanismos que permiten a las células NK el reconocer y eliminar células cancerosas como las leucemias linfoblásticas.

Este trabajo, representa un intento por conocer la función y modos de acción de los receptores de la familia SLAM en el reconocimiento y eliminación de la células leucémicas por las células NK. El conocer y describir el papel que desempeñan los receptores SLAM en la respuesta inmune contra la leucemia linfoblástica nos permitirá identificar nuevas maneras de manipular la respuesta inmune para lograr una eficiente eliminación de las células cancerosas.

HIPÓTESIS

Los receptores de la familia SLAM son determinantes en influenciar la susceptibilidad de la leucemia linfoblástica a la citotoxicidad mediada por las células NK. En consecuencia, la reconfiguración de la expresión de estos receptores restaura el potencial citotóxico de la célula NK.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de los inmunoreceptores SLAM en células Natural Killer y células leucémicas de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda al momento del diagnóstico, así como la respuesta citotóxica de la célula NK en función de la expresión de los receptores SLAM.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión de receptores de la familia de SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) de células NK en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA.
2. Evaluar la funcionalidad de las células NK mediante ensayos de citotoxicidad natural y dependiente de anticuerpo (ADCC) de pacientes pediátricos con LLA.
3. Identificar la existencia de asociaciones entre la expresión de los receptores de la familia de SLAM, la función citotóxica de NK y las diferentes variables clínicas implicadas en esta enfermedad.
4. Evaluar la expresión de los receptores de la familia SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en células leucémicas de muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA al momento del diagnóstico.
5. Determinar el papel de los receptores SLAM en modular el potencial citotóxico de las células NK dirigido hacia la leucemia linfoblástica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo analítico y multicéntrico en hospitales públicos de la Ciudad de México, con la finalidad de evaluar la expresión de los inmunoreceptores tipo SLAM (2B4, NTB-A, CD48 y SLAMF7) en células Natural Killer y en células leucémicas de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda al momento del diagnóstico. El análisis de las muestras biológicas de los pacientes se realizó en ciego, debido a que dichas muestras se obtuvieron antes del diagnóstico clínico, por lo que no se contaba con un diagnóstico confirmado.

Aspectos éticos

El protocolo bajo el cual se llevó a cabo esta investigación se registró en la comisión nacional de la investigación científica y ética del IMSS al cual se le asignó el número de registro: R-2016-785-042 a nombre del Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré. Este protocolo fue aprobado por los comités de investigación y ética de los hospitales participantes. Las muestras de los pacientes y controles analizados en este estudio se adquirieron con previo consentimiento de los padres de los menores de acuerdo con la declaración de HelsiNKi.

Reclutamiento de muestras

El reclutamiento de muestras se llevó a cabo en hospitales que pertenecen al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y el Seguro Social (SS) de la ciudad de México. A continuación, se enlistan los hospitales de los cuales se obtuvieron las muestras de pacientes y controles.

<u>Hospitales de casos LLA</u>

1. Hospital General de México, SS.
2. Centro Médico Nacional 20 de noviembre, ISSSTE.
3. Centro Médico Nacional Siglo XXI- Oncología, IMSS.
4. Centro Médico Nacional Siglo XXI- Hematología, IMSS.
5. Hospital Pediátrico Moctezuma, SS.
6. Hospital Juárez de México, SS.
7. Hospital Regional ISSSTE Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia, ISSSTE.
8. Hospital Regional 1ero de octubre, ISSSTE.

<u>Hospitales de individuos controles</u>

1. Hospital General Regional Ignacio Zaragoza, ISSSTE.
2. Hospital General Dr. Gustavo Baz Prada, SS.
3. Hospital General Las Américas, SS.
4. Hospital General La Perla Nezahualcóyotl, SS.
5. Hospital Pediátrico La Villa, SS.
6. Hospital General de Zona 98, IMSS
7. Hospital General Regional Zona 72, IMSS.

Criterios de selección de muestras (pacientes)

Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 15 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 24 horas.

Criterios de selección de muestras (controles)

Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 15 años atendidos en hospitales de primero y segundo nivel, preferentemente de la misma institución (SS, IMSS, ISSSTE, GDF)
- Concurrentes ± 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 24 horas.

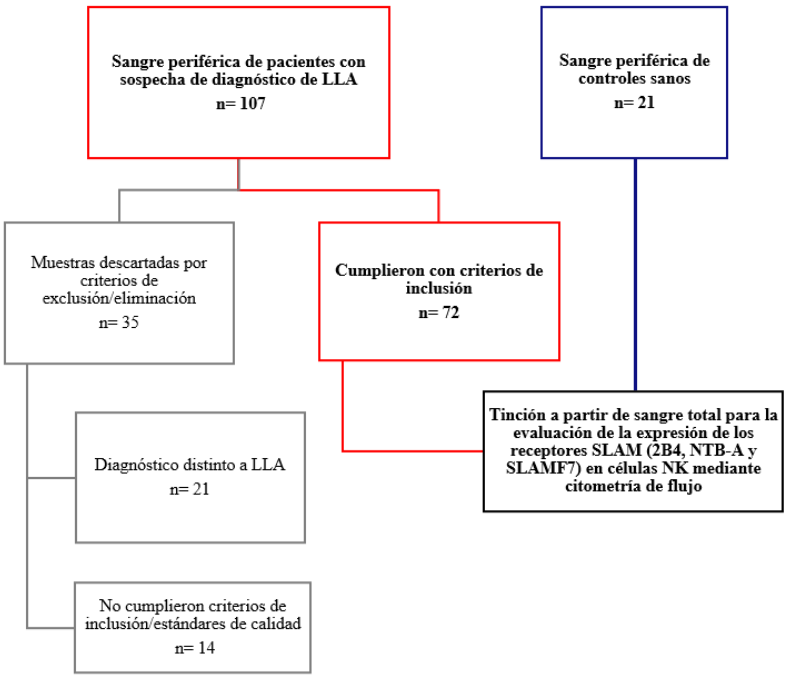
Diagnóstico clínico

El diagnóstico de los pacientes 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 (translocaciones: ETV6-RUNX1; TCF3-PBX1; MLL-AFF1, BCR-ABL1), según la clasificación de neoplasias linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2008.

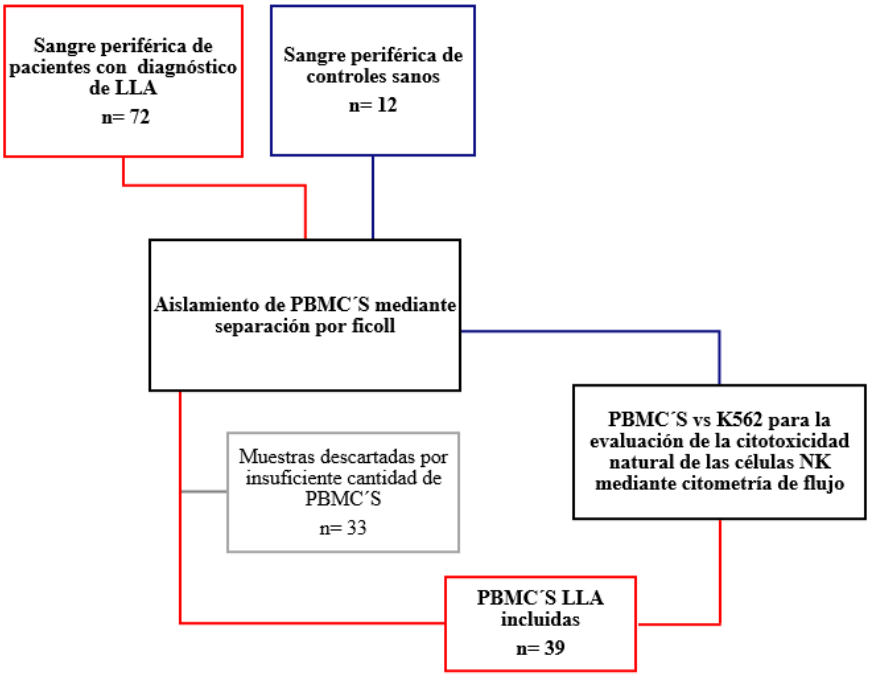
Muestras

Se emplearon muestras de sangre periférica, médula ósea y cordón umbilical 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 24 horas a partir de la toma.

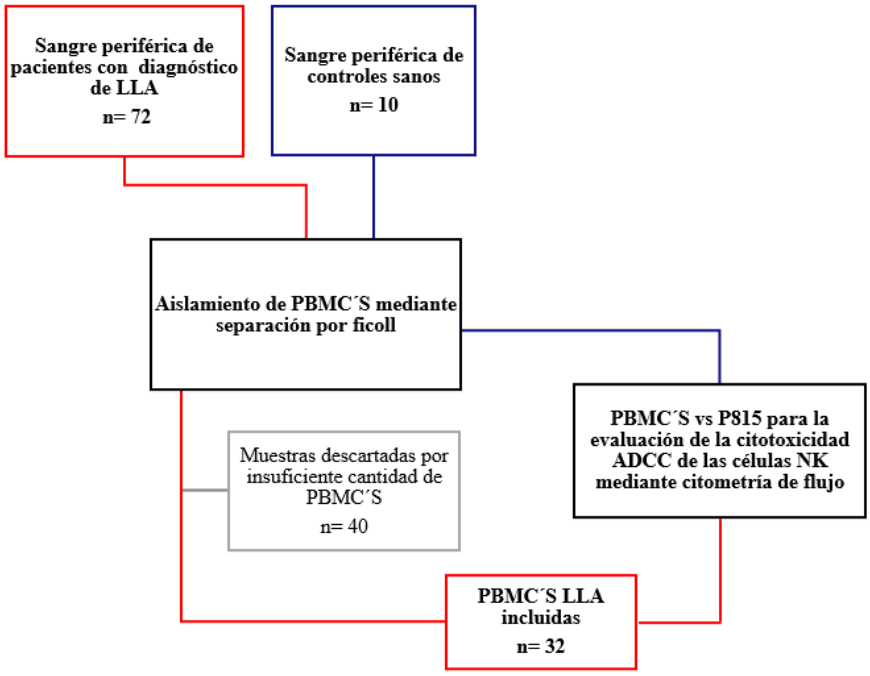
Para evaluar la expresión de los receptores SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK de pacientes con LLA se emplearon las siguientes muestras:



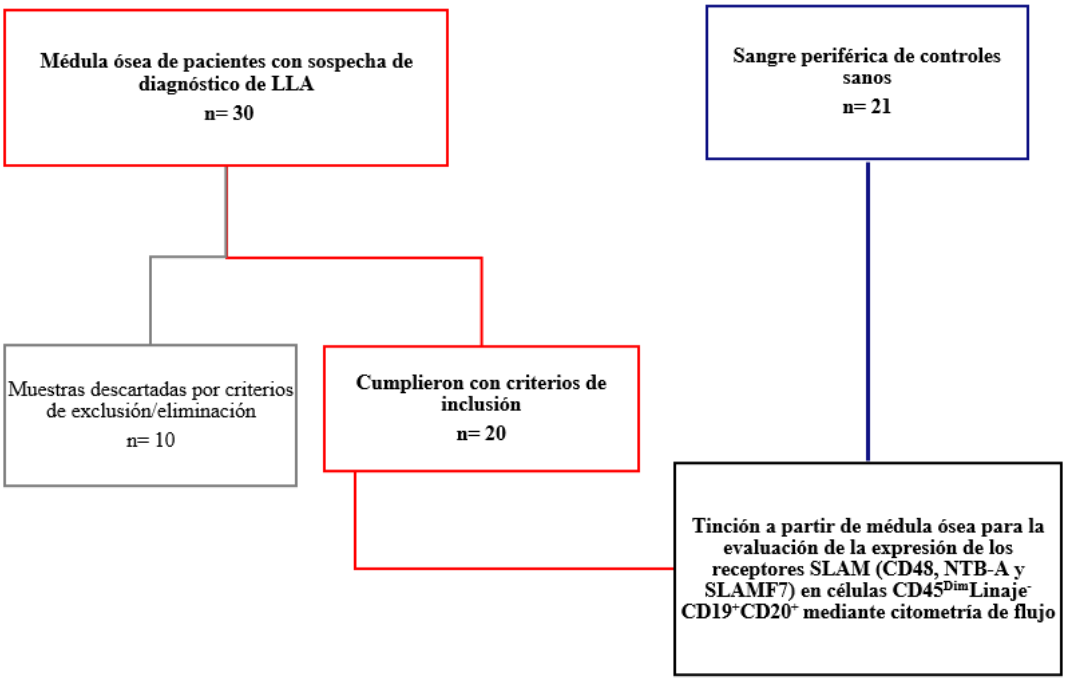
La evaluación de la funcionalidad de las células NK mediante ensayos de citotoxicidad natural de pacientes con LLA se llevó a cabo empleando las siguientes muestras:



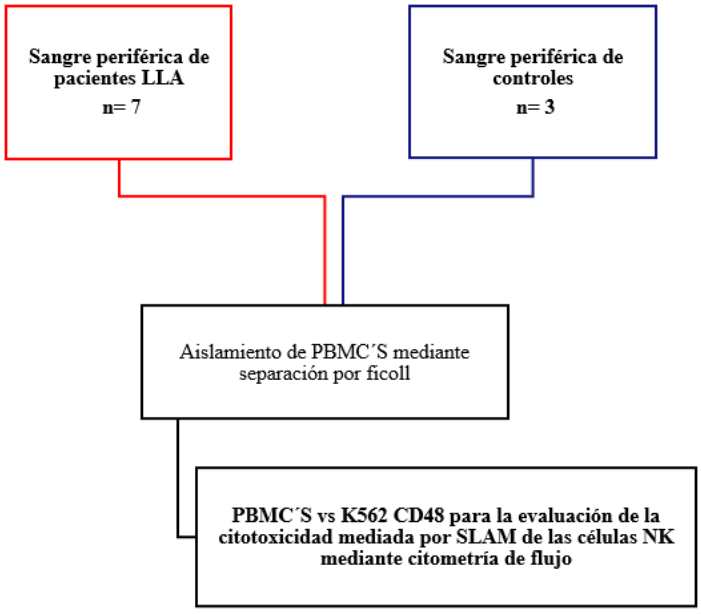
Para la evaluación de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (CD16) en células NK de pacientes con LLA se emplearon las siguientes muestras:



La evaluación de la expresión de los receptores SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en células leucémicas se llevó a cabo mediante el empleo de las siguientes muestras:

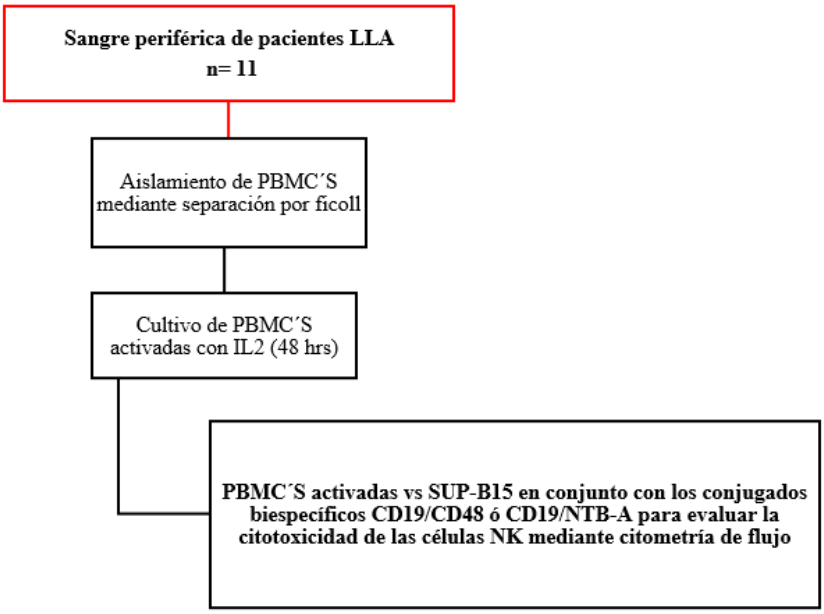


Para determinar el papel de los receptores SLAM en modular el potencial citotóxico de las células NK dirigido hacia la leucemia linfoblástica se llevó a cabo la evaluación de la citotoxicidad mediada por un receptor SLAM (CD48) en células NK de pacientes con LLA empleando las siguientes muestras:



Para determinar el papel de los receptores SLAM en modular el potencial citotóxico de las células NK dirigido hacia la leucemia linfoblástica, se llevó a cabo la evaluación de la citotoxicidad

en presencia de conjugados biespecíficos CD19/SLAM, para lo cual se emplearon las siguientes muestras:



Anticuerpos

Se identificó la población de células NK empleando el siguiente esquema de tinción: anti-CD56 (5.1H11) acoplado al fluorocromo APC, anti-CD3 (OKT3), anti-CD20 (2H7) y anti-CD14 (63D3) acoplados a FITC.

Para la caracterización de los receptores de la familia SLAM en células NKse llevó a cabo el siguiente coctel de anticuerpos: anti-SLAMF7 acoplado a PERCPCY5.5, anti-2B4 acoplado a BV510 y NTB-A acoplado a PE/Vio 770.

Para llevar a cabo la identificación de ligandos en células B inmaduras y células leucémicas, se utilizaron los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 acoplados a PE para detectar la población de blastos. La identificación de ligandos se llevará a cabo con anti-NTB-A acoplado a PE Vio770, anti-CD48 acoplado a PERCPCY5.5 y anti-SLAMF7 acoplado a APC.

Para llevar a cabo la caracterización funcional se empleó anti-CD107a acoplado a PE además del colorante de viabilidad.

Células

Se emplearon células mononucleares derivadas de sangre periférica, las cuales se aislaron por gradiente de Ficoll Paque (PREMIUM). Células NK purificadas a partir de Buffy Coat y las líneas celulares P815 (ATCC), K562 (ATCC), SUP-B15 (ATCC), RS4 (ATCC), REH (ATCC).

Cultivo de células mononucleares de sangre periférica, aislamiento de células NK primarias humanas y cultivos de líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda

Las células mononucleares derivadas de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), las líneas celulares P815 (ATCC), K562 (ATCC) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco™ Advanced RPMI 1640 Medium) suplementado con 5 % de suero fetal bobino (BYproductos) inactivado por calentamiento, L-glutamina, estreptomicina y penicilina (Gibco™), y 2-Mercaptoetanol (Gibco™) a 1X. Para algunos ensayos, las PBMCs o células NK purificadas se trataron por 48 horas con 100 UI/mL o 1000 UI/mL de IL-2 humana recombinante, IL-12 (10 ng/mL), IL-15 (50 ng/mL) o IFN-β (10 ng/mL) (todas de PeproTech), según lo indicado. Las células NK humanas fueron aisladas mediante selección negativa utilizando el kit MojoSort Human NK Cell Isolation Kit (BioLegend) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de las células NK aisladas CD56+CD3− fue superior al 90 %.

Las líneas celulares RS4 (ATCC), REH (ATCC), SUP-B15 (ATCC) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco™ Advanced RPMI 1640 Medium) suplementado con 10 % de suero fetal bobino (BYproductos) inactivado por calentamiento, L-glutamina, estreptomicina y penicilina (Gibco™), y 2-Mercaptoetanol (Gibco™) a 1X. La línea celular Phoenix fue cultivada en medio DMEM (Gibco™ Advanced DMEM Medium) suplementado con 5 % de suero fetal bobino, L-glutamina, estreptomicina y penicilina. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en un ambiente humidificado35 y 5 % de CO2 (dióxido de carbono). El conteo de células y la viabilidad se realizó en cámara de Neubauer utilizando azul de tripano (Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4%) como colorante de viabilidad celular.

Evaluación de la expresión de receptores SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK

Para llevar a cabo la caracterización fenotípica de los receptores SLAM se empleó el siguiente panel de anticuerpos, previamente diseñado y estandarizado en este proyecto:

Tabla 4. Panel de caracterización fenotípica de los receptores SLAM en células NK

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona
anti-CD56	APC	5.1H11
anti-CD3	FITC	OKT3
anti-CD20	FITC	2H7
anti-CD14	FITC	63D3
anti-SLAMF7	PerCP/Cy5.5	162.1
anti-2B4	Pacific Blue	C1.7
anti-NTB-A	PE / Vio 770	REA339

Se utilizaron 75uL de sangre total, 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

Citotoxicidad natural y citotoxicidad mediada por anticuerpo reversa

Para la caracterización funcional de las células NK, se llevaron a cabo ensayos de degranulación, realizados con células mononucleares (PBMC´s) de sangre periférica obtenidas mediante la separación por gradiente de Ficoll-Paque (PREMIUM) y utilizando como células blanco las líneas celulares K562 parental, para evaluar la citotoxicidad natural y P815 para medir la citotoxicidad mediada por anticuerpo reversa a través de CD16.

Dichos ensayos se llevaron a cabo colocando PBMC´S en co-cultivos independientes con las líneas blanco K562 Y P815. En el caso del ensayo de citotoxicidad mediada por el anticuerpo, las células P815 fueron incubadas por 30 min con anti-CD16 (2.5ug-1x106 células). Para ambos ensayos se utilizaron 2x106 células/mL y se incubaron en una concentración 1:1 (célula blanco: PBMC’s)

durante 3 horas a 37 °C, 5 % de CO_2 (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 ($CD56^+$, $CD3^-$) 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.

Construcción (Infección retroviral)

Para la expresión de CD48 (ligando de CD48) en la línea celular K562, se empleó el vector retroviral bicistrónico pFB-GFP (Addgene), que codifica para la proteína fluorescente verde. La secuencia codificante de CD48 fue clonada dicho vector utilizando los sitios de restricción de la enzima EcoRI. Una vez generada la construcción, se transfirieron 10 µg de DNA plasmídico según fuera el caso de las condiciones generadas (pFB-GFP para la condición del vector vacío y CD48 en pFB-GFP) a la línea celular Phoenix (una línea empacadora de virus) para producir las partículas virales infectivas.

La transfección se realizó utilizando medio OPTI-MEM (Gibco™) y 10 µg de lipofectamina 2000 (Invitrogen™) para cada condición. Las células transfectadas fueron incubadas una noche a 37 °C y 5% CO_2, al día siguiente, el sobrenadante de las células Phoenix fue retirado y remplazado por medio RPMI nuevo y completo, después de 24 horas, el sobrenadante fue recuperado y filtrado (0.22 µm), dicho sobrenadante fue utilizado para transducir 500 mil células K562, las cuales fueron infectadas en dos rondas utilizando 2 ml de sobrenadante filtrado de las células Phoenix. A los 4 días posinfección se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo; las células positivas para GFP se sortearon utilizando el citómetro BD FACSAria III (BD Biosciences).

Después del sorting celular, las células K562 $CD48^-$ (vector vacío) alcanzaron una eficiencia de transducción cercana al 90 %, por otro lado, las células K562 $CD48^+$ alcanzaron una eficiencia de transducción por arriba del 95%.

Conjugados Biespecíficos

Los conjugados biespecificos fueron elaborados mediante el acoplamiento de anti-CD19mAb (HIB19) junto con alguno de los ligandos de la familia SLAM (proteína recombinante para CD48, NTB-A, o SLAMF7) a nanoperlas magnéticas recubiertas con proteína G. Inicialmente 300 millones de perlas se colocaron en un tubo de citometría estéril y se lavaron dos veces con 1 ml de solución de incubación (PBS 1x y Tween 0.05%), dichos lavados se llevaron a cabo colocando el tubo de

citometría en un magneto (MOJOSORT) durante 5 min y posteriormente descartando la fracción liquida. Después se elaboró una mezcla con 50 µg de anti-CD19 y 50 µg del ligando de la familia SLAM NK (CD48, NTB-A, o SLAMF7) la cual se agregó a las perlas previamente lavadas, posterior a esto se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación. Al finalizar la incubación las perlas se lavaron dos veces con 2 ml de PBS usando nuevamente el magneto de separación. Finalmente, las perlas acopladas se resuspendieron en 1 ml de PBS.

Ensayos de citotoxicidad en presencia de los ligandos de la familia SLAM

Las células PBMCs fueron incubadas con células K562 positivas para GFP, que expresaban o no CD48 (2 × 10^5), en placas de 96 pozos durante 3-4 horas a 37°C en una proporción de 1:1 (efector). Luego, las células se recolectaron y se tiñeron durante 30 minutos sobre hielo con los anticuerpos monoclonales FITC-anti-CD3, CD14, CD20, APC-anti-CD56 y PE-anti-CD107a (Biolegend). Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % antes de la adquisición de los datos. La degranulación de las células NKse analizó cuantificando el porcentaje de células NK ($CD56^+$, $CD3^-$) que expresaban $CD107a^+$ en la superficie celular. Las muestras se adquirieron usando un citómetro BD FACS ARIA II (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo v10 (Tree Star).

En algunos ensayos, las células PBMC's o las células NK purificadas (tratadas o no con citoquinas) fueron incubadas con células blanco (RS4, REH o SUP-B15) en una proporción de 1:1 (2 × 10^5 células) en presencia de conjugados biespecíficos (CD19/CD48, CD19/SLAMF7 o CD19/NTB-A) en una proporción de 1:20 (célula) en placas de 96 pozos durante 3-4 horas a 37°C. Para evaluar la desgranulación de las células NK en presencia de inhibidores, las células NK fueron pretratadas con DMSO (vehículo), el inhibidor de PLC-γ U73122 (2.5 µM) o el inhibidor de PI3K LY294002 (25 µM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron, se resuspendieron en medio fresco y se incubaron con las células blanco SUP-B15 en una proporción de 1:1 (2 × 10^5 células) y una proporción de 1:20 (célula) en placas de 96 pocillos durante 3-4 horas a 37 °C.

Análisis de la expresión de receptores SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en células leucémicas.

Este análisis se llevó a cabo empleando sangre de medula ósea de pacientes pediátricos con LLA y sangre de cordón umbilical de controles sanos, de los cuales se alicuotaron 50 µl y se incubaron

durante 30 minutos a 4 °C empleando el siguiente panel de anticuerpos, previamente diseñado y estandarizado en este proyecto:

Tabla 5. Panel de caracterización de los receptores SLAM en células leucémicas.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona
anti-CD56	APC	5.1H11
anti-CD3	FITC	OKT3
anti-CD235a	FITC	2H7
anti-CD14	FITC	63D3
anti-CD10	BV510	HI10a
anti-CD19	PE	HIB19
anti-CD20	PE	2H7
anti-CD48	PerCP/Cy5.5	BJ40
anti-NTB-A	PE/Vio 770	REA339
anti-SLAMF7	APC	REA150

Posteriormente, se lavaron las células, se lisaron los glóbulos rojos con un tampón de lisis 1X (BD Pharm Lyse™ Cat: 555899) y se fijaron con paraformaldehído al 2% para su adquisición posterior. Se empleó como control negativo la fluorescencia menos uno. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Canto II (BD Bioscience). Las células analizadas se definieron con el fenotipo: CD3-, CD56-, CD235a-, CD14-, CD45low+, CD19+, CD20+. El análisis final de la expresión de cada ligando de células NKse realizó utilizando el software FlowJo 7.6.5.

Ensayos de formación de conjugados

Previo al ensayo de conjugados, las células NK pretratadas con IL-2 fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal CD56 acoplado a APC. Las células SUP-B15 se tiñeron con Cell Tracker Orange CMRA (Thermo Fisher Scientific). Luego, se lavaron y mezclaron las células NK (5×10^5/ml) y SUP-B15 (2×10^6/ml) y se centrifugaron a 500 rpm durante 3 minutos (4°C) para permitir la formación de conjugados. Finalmente, las células fueron estimuladas incubándolas a 37°C durante 0, 5 y 10 minutos. Las reacciones se detuvieron añadiendo paraformaldehído al 0.5% en PBS frío. Las muestras se adquirieron utilizando un citómetro BD FACSARIA II (BD Biosciences) y la formación de conjugados se analizó con el software FlowJo v10 (Tree Star).

Estrategia para el análisis de citometría

Las muestras y los experimentos se analizaron con citometría de flujo empleando la estrategia planteada en la Figura 20; partiendo de la exclusión de agregados con los parámetros de tamaño de área y altura, seguido de la determinación de la región de linfocitos por tamaño y granularidad, evaluando así dentro de esta región la población de células $CD56^{+}CD3^{-}$ (células NK) para el caso de la fenotipificación de los receptores SLAM en esta población.

En lo que respecta a los análisis de citotoxicidad natural y citotoxicidad mediada por anticuerpo, posterior a la determinación de linfocitos se excluyeron las células muertas con ayuda del colorante de viabilidad LIVE/DEAD Fixable Violet Dead cell identificando dentro de esta región la población de células $CD56^{+}$, $CD3^{-}$, $CD14^{-}$, $CD20^{-}$ (células NK) (Figura 19).

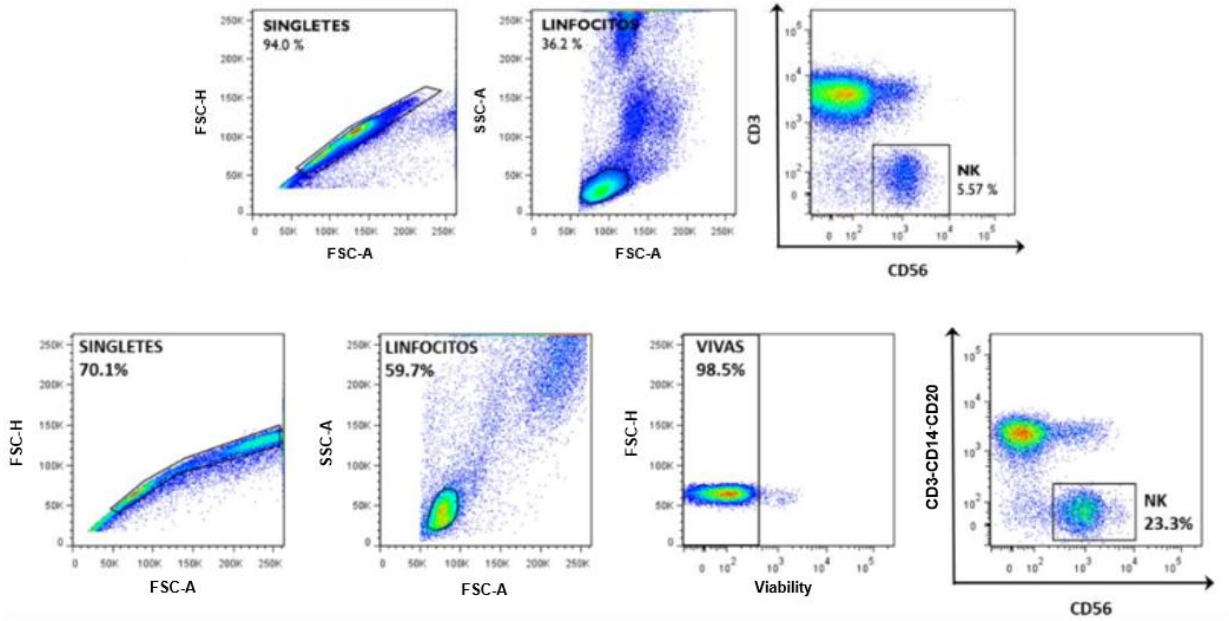


Figura 19. Estrategia para el análisis de citometría. A) Estrategia para el análisis de fenotipificación. Exclusión de agregados, determinación de linfocitos y evaluación de la población $CD56^{+}CD3^{-}$ (NK) y $CD8^{+}$ $CD3^{+}$ (T citotóxicas) **B) Estrategia para el análisis de citotoxicidad.** Exclusión de agregados, determinación de linfocitos, exclusión de células muertas y evaluación de la población $CD56^{+}CD3^{-}CD14^{-}CD20^{-}$.

En lo que respecta al análisis de ligandos en células leucémicas se seguirá la estrategia planteada en la Figura 20, partiendo de la exclusión de agregados con los parámetros de área y altura, seguido de la determinación de la región de linfocitos por tamaño y granularidad, evaluando así dentro de esta región la población de células $CD45^{low,}$ Linaje $^{-}$ ($CD3^{-}CD56^{-}CD235a^{-}CD14^{-}$), que corresponde

a la población de células inmaduras, población a partir de la cual se tomará la población $CD19^{+}CD20^{+}$ para posteriormente analizar en la población mayoritaria ya sea $CD10^{+}$ o $CD10^{-}$ los receptores CD48, NTB-A y SLAMF7.

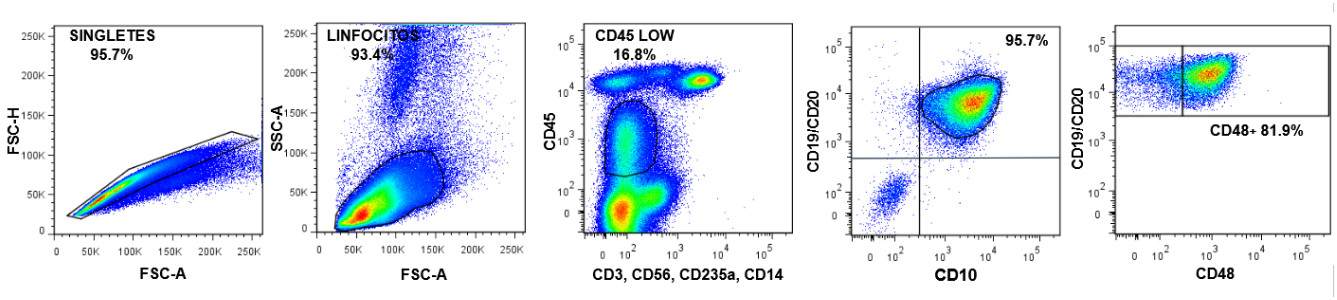


Figura 20. Estrategia para el análisis de citometría. Estrategia para el análisis de ligandos en blastos. Exclusión de agregados, determinación de linfocitos, población $CD45^{low}Linaje^{-}$ ($CD3^{-}CD56^{-}CD235a^{-}CD14^{-}$) y análisis en población $CD19^{+}CD20^{+}CD10^{+/-}$.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo la evaluación de la distribución con respecto a la normalidad para las variables cuantitativas empleando la de Shapiro-Wilk tomando en cuenta un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo para rechazar la hipótesis nula de que las variables evaluadas contaban con una distribución de tipo paramétrico. Tras esta evaluación las variables de estudio de tipo continuas resultaron mostrar una distribución no paramétrica, por lo tanto, los datos fueron analizados con la prueba estadística no paramétrica para valores independientes, U de Mann-Whitney con hipótesis de una cola. Las gráficas y análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa Graphpad prism 5.01.

Se realizaron análisis bivariados y regresiones logísticas con variables categóricas empleando la percentil 50 de los inmunoreceptores del grupo control como punto de corte. La razón de momios fue ajustada por variables confusoras como: edad, sexo, infecciones durante el primer año de vida y antecedente de alergias y los Intervalos de Confianza (IC) establecidos fueron del 95 %. Dichos análisis se llevaron a cabo en el programa SPSS. Simbología de significancia estadística: *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$ y ****: $p<0.00001$.

Se realizó un análisis multivariado entre la expresión de los marcadores y las variables de riesgo en los pacientes con leucemia. Se llevaron a cabo regresiones logísticas de casos y controles, con el percentil 50 de la expresión de los marcadores analizados ajustadas a edad, sexo, infecciones y alergias, calculando odds ratio (OR) con intervalos de confianza del 95% (IC 95%) con el software

SPSS IBM. Se realizaron análisis booleanos, los cuales se graficaron en diagramas de Venn con ayuda del paquete R versión 6.1.0. software.

RESULTADOS

Análisis de la expresión de los receptores de la familia SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK de sangre periférica

El análisis de la expresión de los receptores SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK de sangre periférica de pacientes con LLA se llevó a cabo en ciego, debido a que de manera inicial se analizaron 107 muestras de sangre periférica con posible diagnóstico de LLA. Sin embargo, se excluyeron 21 pacientes cuyo diagnóstico no correspondió a LLA y 14 muestras que no cumplieron con los estándares de calidad requeridos para su procesamiento. Finalmente, la población de estudio se conformó por 72 pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de LLA, junto con el grupo control de 21 individuos pediátricos pareados por edad con los pacientes.

El grupo control se conformó por diez individuos (47.6%) del sexo femenino y once (52.4%) de sexo masculino, trece (61.90 %) de los controles presentaron infecciones durante el primer año de vida y ocho (38.09 %) presentaron antecedentes de alergias. El grupo de pacientes incluye a treinta y dos (44.4%) pacientes del sexo femenino y cuarenta (55.5%) del sexo masculino, cuarenta y seis (63.9 %) de los pacientes presentaron infecciones durante primer año de vida y doce (16.7%) presentaron antecedentes de alergias (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de variables clínicas entre pacientes y controles incluidos en el estudio.

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

En la tabla se observa que las únicas diferencias significativas entre la población de controles y pacientes se encontraron en los antecedentes de alergia. Esto puede explicarse mediante una hipótesis ampliamente respaldada por algunos autores, que plantea que las alergias actúan como un factor protector frente a la leucemia. Este fenómeno podría justificar la baja frecuencia de pacientes con LLA que presentan un historial alérgico.

En la población de pacientes con LLA incluidos en este estudio la variable clínica correspondiente a una cuenta leucocitaria superior a 50,000 se presentó en catorce de los pacientes (19.44%). Por su parte, la presencia de rearreglos genéticos fue identificada solo en cinco pacientes (6.94%). El tipo de leucemia predominante fue Pre-B, representando el 97.22%. En cuanto a las características de desenlace, el 9.72% tuvo una recaída y el 11.11% de los pacientes falleció (Tabla 7).

Tabla 7. Características clínicas de tipo pronóstico y desenlace de los pacientes

	***n*=72**
	ALL
N=72	*n* (%)
Cuenta leucocitaria	
< 50,000	58 (80.55)
≥ 50,000	14 (19.44)
Rearreglo	
No Detectado	67 (93.05)
Detectado	5 (6.94)
Immunofenotipo	
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)

Estas variables se consideraron en los análisis realizados para conocer si existen asociaciones entre los niveles de expresión de los receptores SLAM de las células NK y las variables clínicas de la enfermedad.

Previo al análisis de la expresión de los receptores de la familia SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7), se realizó un análisis del porcentaje de células NK totales de sangre periférica, así como de sus subpoblaciones (NK CD56^{dim} y CD56^{bright}). Este análisis tuvo como objetivo determinar si nuestro grupo de estudio presentaba alteraciones en el porcentaje de esta población celular. Para ello, se compararon las frecuencias relativas de estas poblaciones entre pacientes y controles (Figura 21).

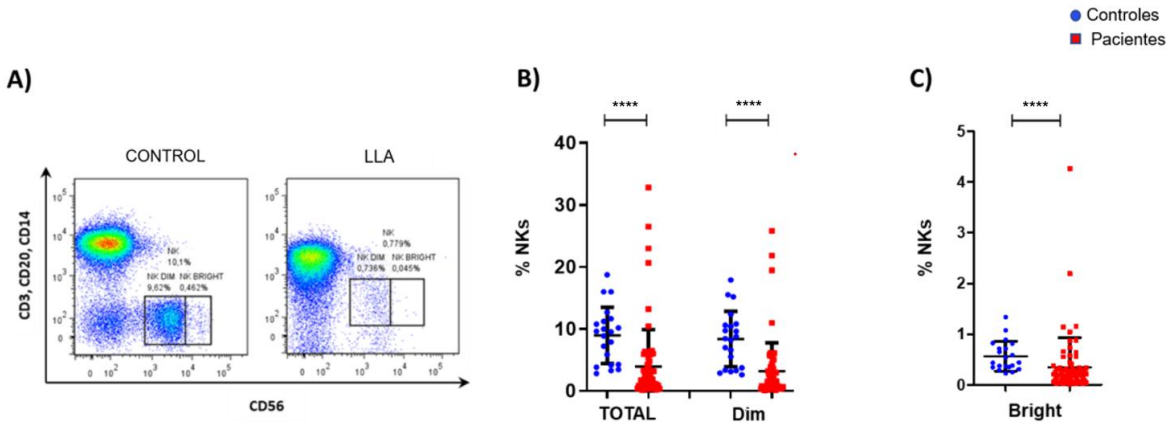


Figura 21. **Porcentaje de células NK totales, subpoblaciones CD56^{dim} y CD56^{bright} en sangre periférica de controles y pacientes pediátricos con LLA.** A) Imagen representativa de población total y subpoblaciones de células NK CD56^{dim} y CD56^{bright} en controles y pacientes. B) Porcentajes de población total de células NK y subpoblaciones CD56^{dim} y C) CD56^{bright} en controles (n=21) y pacientes (n=72). **** $p < 0.0001$. Las barras de las gráficas indican el promedio y la desviación estándar.

Los pacientes mostraron una frecuencia de células NK totales significativamente menor que el grupo control ($p < 0.0001$). De la misma forma las subpoblaciones CD56^{Dim} y CD56^{Bright} mostraron frecuencias significativamente menores ($p < 0.0001$) que el grupo control.

Los pacientes con LLA muestran una disminución en la expresión de los receptores de la familia SLAM

A continuación, se llevó a cabo el análisis de la expresión de los receptores 2B4, NTB-A y SLAMF7 en células NK de pacientes y controles. Los resultados obtenidos mostraron que los pacientes pediátricos con LLA presentan una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de células NK que expresan los receptores de la familia SLAM aquí estudiados al momento del diagnóstico en comparación con los controles (2B4 y NTB-A $p< 0.0001$, SLAMF7 $p= 0.0002$) (Figura 22).

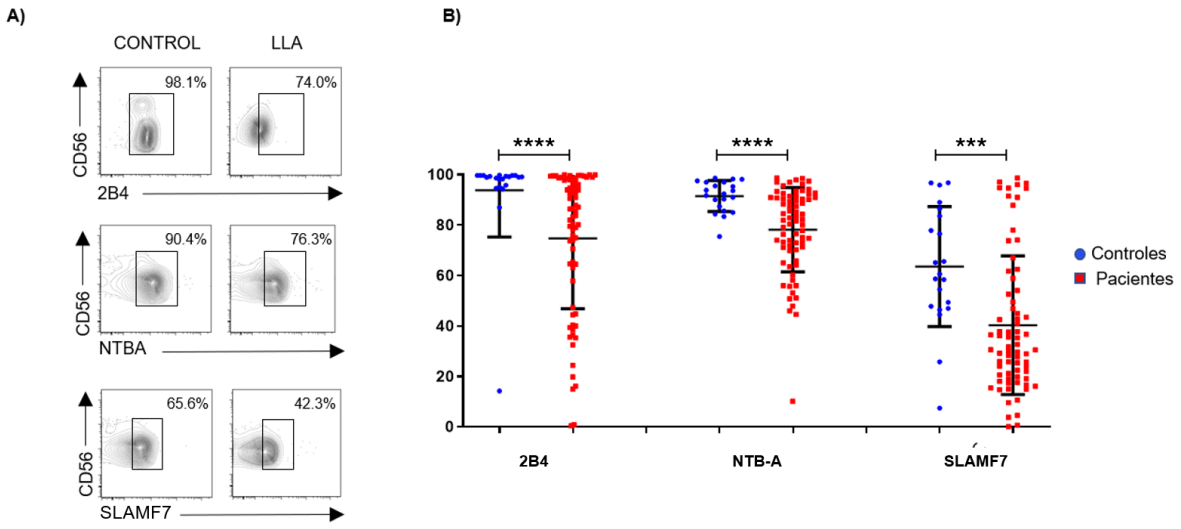


Figura 22. Análisis de la expresión de los receptores de la familia SLAM en células NK totales en controles pareados por edad y pacientes pediátricos con LLA. A) imágenes representativas de la fenotipificación de 2B4, NTBA y SLAMF7 en controles pareados por edad y pacientes**, B)** Porcentaje de células NK que expresan 2B4 (****: $p < 0.0001$), NTBA (****: $p < 0.0001$), y SLAMF7 (***: $p = 0.0002$), en controles (n=21) y pacientes (n=72). Las barras de las gráficas indican la media y la desviación estándar.

Por otra parte, encontramos que la expresión relativa de los receptores SLAM en los pacientes con LLA al momento del diagnóstico presentan también una disminución estadísticamente significativa frente a los controles (2B4 $p = 0.0083$, NTB-A $p = 0.0002$ y SLAMF7 $p = 0.0004$) (Figura 23). Lo anterior que nos deja ver que los pacientes con LLA poseen anomalías en la expresión de la familia SLAM, dato que resulta ser de suma importancia, ya que como se sabe dicho repertorio se ve involucrado, principalmente, en el proceso de activación de la capacidad efectora de las células NK.

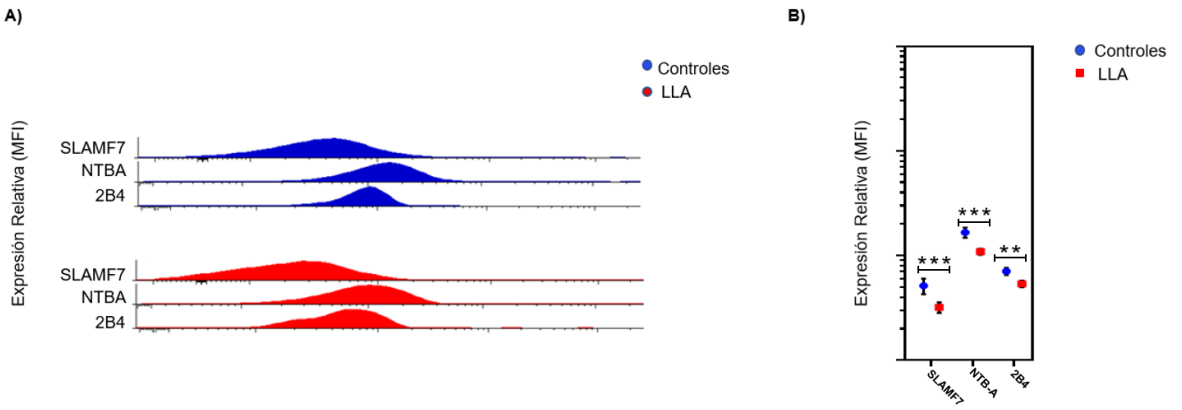


Figura 23. Evaluación de la Intensidad Media de Flourescencia (MFI) de la familia SLAM en células NK totales de controles y pacientes pediátricos con LLA. A) Histogramas representativos de la MFI de SLAMF7, NTBA y 2B4 evaluados en células NK totales de pacientes (n=72) y controles (n=21) (escala logarítmica). **B)** Gráfica (escala logarítmica) de MFI de receptores SLAM evaluados en células NK de controles y pacientes (SLAMF7 ****p*=0.0004, NTB-A ****p*=0.0002 y 2B4 ** *p*=0.0083). Las barras de las gráficas indican la media y la desviación estándar.

Las células NK de pacientes pediátricos con LLA muestran una disminución concomitante en la expresión de los receptores de la familia SLAM.

Teniendo en cuenta que se observó una reducción significativa tanto en las frecuencias de expresión, así como la intensidad media de fluorescencia de los receptores de la familia SLAM en las células NK de pacientes con LLA en comparación con controles sanos, se analizaron los patrones de expresión concurrentes para tales receptores mediante análisis booleano. Los pacientes se distribuyeron en dos categorías según el percentil 50 (por arriba del percentil 50, >p50; por debajo del percentil 50, p<50). El p50 fue calculado con base en las frecuencias de expresión para cada uno de los receptores SLAM de células NK de los controles (2B4 p50= 99%, NTB-A p50=92.40% y SLAMF7=60.60%). Se analizaron siete posibles combinaciones de fenotipos diferentes y los perfiles de fenotipos se analizaron con el paquete R versión 6.1.0. software (Figura 24).

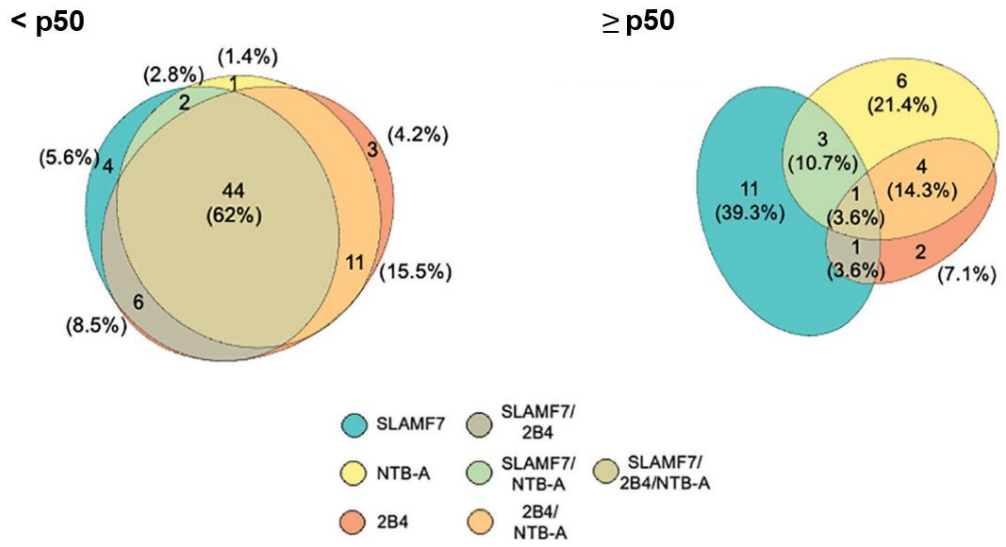


Figura 24. Evaluación de coexpresión de receptores SLAM en células NK de pacientes con LLA. Diagramas de Venn que muestran el número de funciones, según lo definido por la compuerta booleana, simultáneamente exhibidos por las células NK en pacientes por debajo del percentil 50 (panel derecho) o igual o por encima del percentil 50 (panel derecho).

Se encontró que el 62% de los pacientes poseen una frecuencia menor a la p50 de expresión concurrente de los receptores SLAM en sus células NK. Por el contrario, únicamente un paciente (3,6%) muestra una frecuencia mayor simultanea de la expresión concurrente de los receptores SLAM. Los datos sugieren que, el fenotipo dominante entre los pacientes con LLA en términos de expresión concurrente, es aquel en el que existen menores frecuencias de células NK positivas para los receptores SLAM.

Las células NK de pacientes con LLA muestran un fenotipo de diferenciación anormal

Por otra parte, se sabe que a partir de una población de NK totales se pueden definir diferentes subconjuntos de células NK de acuerdo con los estados de diferenciación, lo anterior mediante la expresión diferencial de sus receptores, como NKG2A que con la pérdida gradual de su expresión y la adquisición secuencial de CD57 y miembros de la familia KIR ayudan a determinar diferentes estados de diferenciación [95,96]. Por lo tanto, decidimos investigar si la LLA puede afectar a los subconjuntos de células NK analizando la expresión de NKG2A y CD57 en células NK de sangre periférica tanto de controles sanos como de pacientes en el momento del diagnóstico.

De manera interesante se obtuvo que los porcentajes de células NK que expresan $NKG2A^{+}$ $CD57^{-}$ (NK inmaduras) aumentaron significativamente (p= 0.0242) en pacientes con LLA en

comparación con controles sanos, mientras que el porcentaje de las células NK de tipo NKG2A^{-} CD57^{+} (maduras) disminuyeron de manera significativa (p= 0.0474) en los pacientes frente a los controles (Figura 25). Indicando que los pacientes con LLA presentan una diferenciación anormal de células NK.

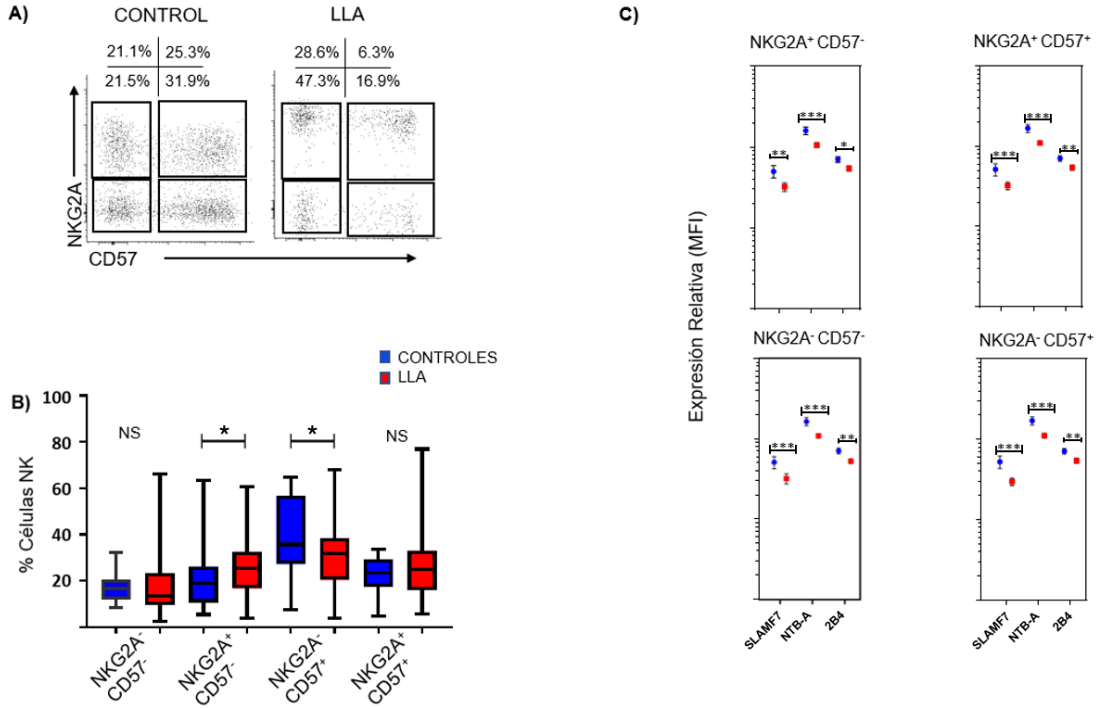


Figura 25. Evaluación de subpoblaciones de células NK en estadios de maduración definidos por los niveles de expresión de NKG2A y CD57, en controles y pacientes pediátricos con LLA. **A)** Imagen representativa de la distribución de subpoblaciones de células NK en diferentes estadios de maduración en controles y pacientes. **B)** Gráfica de caja y bigote, en donde se representan la mediana y el rango intercuartil, de la distribución de subpoblaciones de células NK de controles y pacientes. **C)** Evaluación de MFI de los receptores SLAM en subpoblaciones de las células Nk de controles y pacientes de acuerdo con el estadio de maduración. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

De acuerdo con lo obtenido anteriormente decidimos analizar la expresión relativa de los receptores de la familia SLAM (MIF) en los cuatro principales subconjuntos de células NK distinguidos por la expresión diferencial de NKG2A y CD57. Como se muestra en la figura 25C, la baja expresión de SLAMF7, NTBA y 2B4 fue significativamente consistente en los cuatro subconjuntos principales del conjunto de células NK periféricas.

Evaluación de citotoxicidad natural de células NK de sangre periférica

Debido a la alteración encontrada en el fenotipo de los receptores SLAM, nos preguntamos si esta alteración podría estar ligada a que las células NK exhiban una función citotóxica alterada. Por lo que se llevó a cabo la evaluación de la capacidad citotóxica de las células NK de 39 pacientes con LLA y 12 controles, mediante el reto con la línea celular K562. Los resultados obtenidos nos muestran que la mediana de la expresión de CD107a en las células NK de los pacientes no mostró diferencias significativas en comparación con los controles, por lo que no podemos sugerir que exista una alteración del fenotipo funcional (Figura 26).

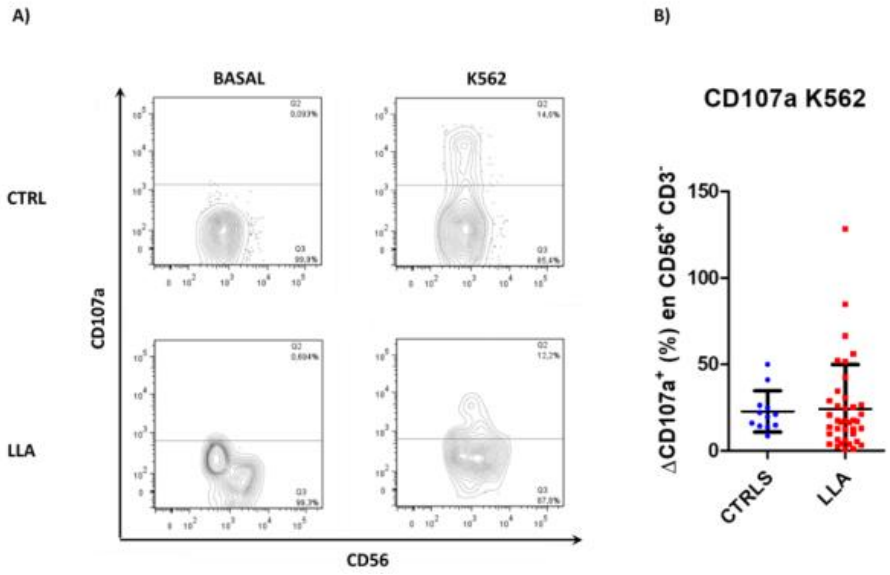


Figura 26. Evaluación de citotoxicidad natural de células NK de controles y pacientes pediátricos con LLA contra células blanco K562. A) Imagen representativa de ensayos de degranulación con K562. B) ΔCD107a de ensayos de degranulación con células NK de controles (n=12) y pacientes (n=39).

Las células NK de los pacientes con LLA poseen una actividad citotóxica anormal

Se llevó a cabo también la evaluación de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo reversa (CD16) en células NK en 32 pacientes con LLA y de 10 individuos controles mediante el reto contra la línea celular P815, en presencia o no del anticuerpo anti-CD16. Los resultados obtenidos muestran que las células NK de pacientes pediátricos con LLA poseen una disminución estadísticamente significativa (p = 0.0129) frente a los individuos controles en respuesta al entrecruzamiento de CD16 (Figura 27 A y B).

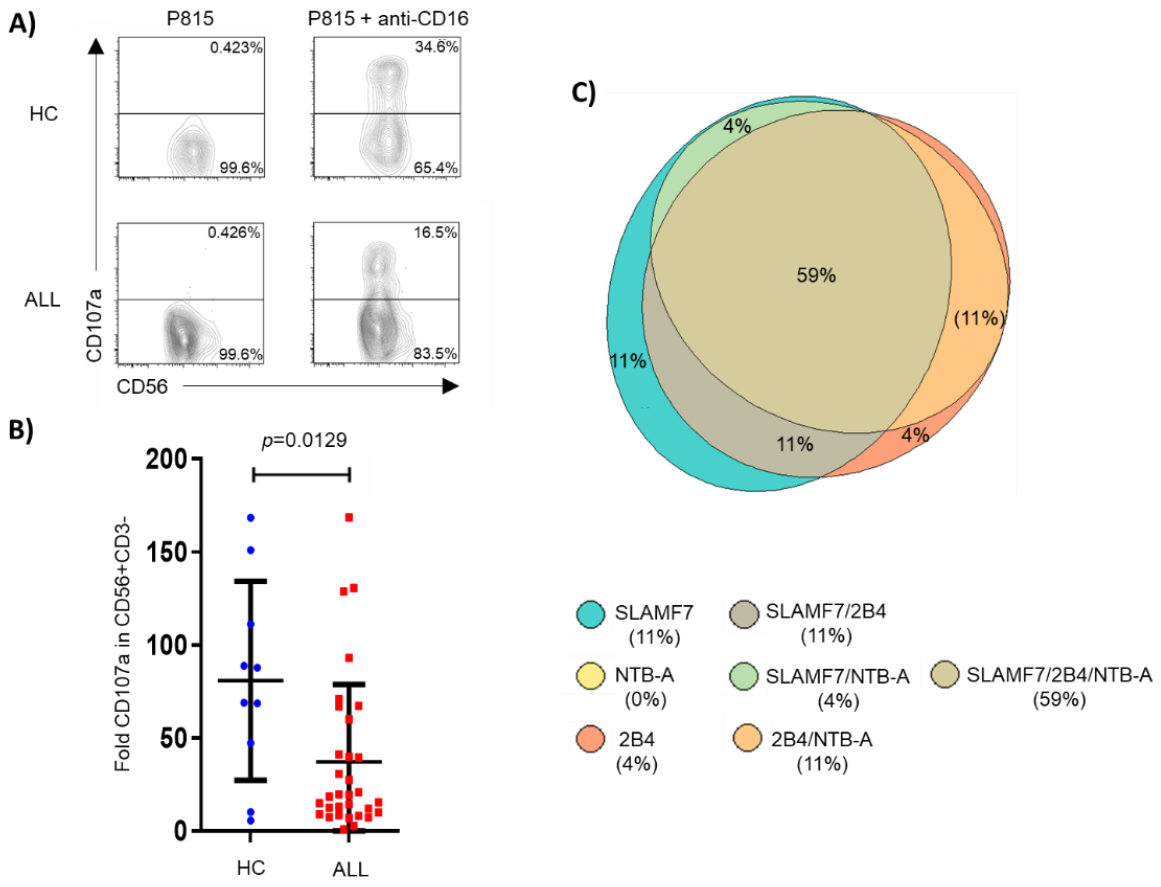


Figura 27. Evaluación de la capacidad citotóxica de células NK de pacientes pediátricos con LLA y controles pareados por edad. A) Imagen representativa de citotoxicidad mediada por anticuerpo, **B)** Citotoxicidad mediada por anticuerpo en pacientes y controles, **C)** Análisis de coexpresión de receptores SLAM en pacientes con degranulación disminuida.

Una vez observados los patrones de expresión en células NK de pacientes con LLA, nos preguntamos si existía algún patrón de coexpresión de los receptores SLAM en aquellos pacientes que presentaron una capacidad citotóxica disminuida de acuerdo con los ensayos de citotoxicidad antes mencionados. Por ello, analizamos la expresión concomitante de los receptores SLAM en células NK de aquellos pacientes con una desgranulación por debajo de la percentil 50 de los controles (p50=78.42), mediante análisis booleano.

De manera interesante, encontramos que el 59% de los pacientes que presentan una citotoxicidad dependiente de anticuerpo anormal cuentan con una disminución concomitante en la expresión de los receptores de la familia SLAM aquí estudiados (Figura 27 C), lo que nos sugiere que

existe una relación entre el fenotipo anormal de dicha familia y la disminución en la capacidad efectora mediada por CD16.

Evaluación de la expresión de los receptores de la familia SLAM (2B4, NTB-A y SLAMF7) en células NK y su asociación con la Leucemia

Con el objetivo de conocer si existen asociaciones entre la alteración de la expresión de los receptores SLAM, su función citotóxica en las células NK y la LLA se llevaron a cabo análisis de regresión logística entre controles y pacientes, ajustando la razón de momios con las posibles 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%.

En ambos análisis, las variables de densidad de expresión de estos receptores (MFI), la frecuencia de células NK positivas para los receptores SLAM, las subpoblaciones de células NK analizadas en este estudio y la función citotóxica (ΔCD107), fueron categorizadas de acuerdo con el percentil 50 de los individuos controles.

De los resultados obtenidos del análisis de regresión logística, encontramos que una mayor expresión de **SLAMF7** (MIF ≥ 364,0200) (ORa=0.29; IC: 0.10-0.82; p<0.05), **2B4** (MIF 715,0100) (ORa=0.32; IC: 0.11-0.88; p<0.05) y **NTB-A** (MIF 1517,5700) (ORa=0.26; IC: 0.09-0.75; p<0.05) en células NK se asocian negativamente con la LLA, aun cuando la razón de momios fue ajustada por las distintas variables confusoras Esto sugiere que los pacientes poseen una menor densidad de expresión de los SLAM que los controles. De la misma forma sucede para el porcentaje de células NK de pacientes que expresan los receptores SLAM (Tabla 8). **SLAMF7** (%NK positivas ≥ 60.60) (ORa=0.26; IC: 0.09-0.72; p<0.05 cuando fue ajustado por sexo, edad y alergias y p<0.01 cuando fue ajustado por sexo y edad; y por sexo, edad e infecciones), **2B4** (%NK positivas ≥ 99) (ORa=0.20; IC: 0.07-0.57, p<0.01) **NTB-A** (%NK positivas ≥ 92.40) (ORa=0.22; IC: 0.08-0.62, p<0.01.)

Tabla 8. Análisis de regresión logística para la asociación entre las características de las células NK (MIF y %NK positivas, como variables categóricas) y el riesgo de leucemias linfoblásticas agudas en niños mexicanos.

Características de las células NK	OR	Sexo y edad	Sexo, edad e infecciones	Sexo, edad y alergias
		aOR (95% IC)	aOR (95% IC)	aOR (95% IC)
MIF ≥p50				
SLAMF7	**0.29 (0.10-0.82) ***	**0.28 (0.10-0.80) ***	**0.28 (0.10-0.79) ***	**0.31 (0.11-0.91) ***
2B4	**0.20 (0.07-0.57) ***	**0.13 (0.04-0.46) ***	**0.30 (0.10-0.85) ***	**0.33 (0.11-0.96) ***
NTBA	**0.22 (0.08-0.62) ***	**0.21 (0.07-0.60) ***	**0.27 (0.09-0.76) ***	**0.32(0.11-0.96) ***
%NK positivas ≥p50				
SLAMF7	**0.26 (0.09-0.72) ***	**0.25 (0.09-0.70) ****	**0.24 (0.08-0.68) ****	**0.25 (0.09-0.73) ***
2B4	**0.20 (0.07-0.57) ****	**0.13 (0.04-0.46) ****	**0.13 (0.04-0.46) ****	**0.14(0.04-0.51) ****
NTBA	**0.22 (0.08-0.62) ****	**0.21 (0.07-0.60) ****	**0.21 (0.07-0.60) ****	**0.24(0.08-0.73) ***
%Subpoblaciones ≥p50				
NK CD56 ^{dim}	**0.05(0.01-0.20) *****	**0.05(0.01-0.18) *****	**0.04 (0.01-0.16) *****	**0.04 (0.01-0.18) *****
NK CD56 ^{bright}	**0.27 (0.09-0.75) ***	**0.25 (0.09-0.72) ***	**0.25 (0.09-0.72) ***	**0.28 (0.09-0.83) ***
NK Total	**0.10(0.03-0.33) *****	**0.08 (0.20-0.29) *****	**0.07 (0.02-0.26) *****	**0.07 (0.02-0.29) *****
ΔCD107 ≥p50				
ΔCD107 K562	0.74 (0.20-2.78)	0.74 (0.20-2.78)	0.74 (0.20-2.80)	0.83 (0.20-3.43)
ΔCD107 P815	**0.16 (0.03-0.84) ***	**0.16 (0.03-0.84) ***	**0.16 (0.03-0.85) ***	0.24 (0.04-1.63)

OR: odds ratio; aOR: odds ratio ajustado; MIF: intensidad media de fluorescencia; CI: intervalo de confianza; >p50: igual o por encima del percentil 50. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p> 0.001$. Los valores en negritas representan resultados estadísticamente significativos.

Por otro lado, también se encontró que un elevado porcentaje de población total de células NK (≥ 9.53) (OR= 0.10; IC= 0.03-0.33); $p<0.001$), así como de subpoblaciones $CD56^{dim}$ (≥ 8.45) (OR= 0.05; IC=0.01-0.20; $p<0.05$) y $CD56^{bright}$ (≥ 0.43) (OR= 0.27; IC: 0.09-0.75; $p<0.001$) se asocia negativamente con la LLA, aun cuando la razón de momios se ajustó por las variables confusoras. Por lo que, de manera independiente de la edad, sexo, infecciones o alergias, los pacientes con LLA muestran un menor porcentaje de la población total de células NK, como de las subpoblaciones

$CD56^{dim}$ y $CD56^{bright}$. Por otro lado, en el análisis de regresión logística de los ensayos de citotoxicidad, se encontró que una ADCC elevada ($\Delta CD107 \geq 78.42$) se asocia negativamente con la LLA (OR= 0.16; IC=0.03-0.84; $p<0.05$) se asocia negativamente con la LLA. Sin embargo, se identificó que las alergias actúan como una variable confusora en este tipo de ensayos mediados por CD16. Al ajustar la razón de momios considerando el historial alérgico, la asociación inicial dejó de ser significativa (OR = 0.24; IC: 0.04-1.63).

Posterior a estos análisis, se realizó un análisis bivariado para evaluar la asociación entre las frecuencias y densidades de expresión de los receptores SLAM y las variables de riesgo de recaída y/o muerte. A partir de este análisis se encontró una asociación negativa, entre la variable de riego de edad mayor a 10 años y el porcentaje de células NK que expresan 2B4 (%NK positivas ≥ 99) (ORa=0.20; IC: 0.04-0.99, $p<0.05$) (Tabla 9).

Tabla 9 Asociación entre las características de las células NK y las variables clínicas de los pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (n = 72).

Receptores SLAM	**Edad >= 10** *n*=29 OR (IC 95%)	**Sexo masculino** *n*=40 OR (IC 95%)	**Cuenta leucocitaria >=50,000** *n*=14 OR (IC 95%)	**Rearreglo** *n*=5 OR (IC 95%)	**Inmunofenotipo T** *n*=2 OR (IC 95%)	**Recaída** *n=7* OR (IC 95%)	**Muerte** *n=8* OR (IC 95%)
% NK positivas p>**50**							
CRACC	1.54 (0.51-4.72)	2.05 (0.63-6.66)	0.52 (0.10-2.63)	2.52 (0.38-16.60)	NC	1.46 (0.25-8.33)	NC
2B4	**0.20 (0.04-0.99)***	5.69 (1.16-27.92)	0.29 (0.03-2.48)	NC	NC	4.12 (0.80-21.30)	0.62 (0.07-5.52)
NTBA	0.31 (0.08-1.24)	1.08 (0.33-3.52)	0.64 (0.13-3.25)	1.04 (0.11-10.09)	NC	0.67 (0.07-6.03)	NC
MIF p>**50**							
CRACC	0.31 (0.08-1.24)	2.63 (0.73-9.47)	0.57 (0.11-2.95)	1.61 (0.13-19.08)	NC	2.26 (0.34-14.98)	NC
2B4	0.93 (0.29-3.01)	2.02 (0.60-6.73)	0.95 (0.22-4.05)	1.47 (0.12-17.36)	3.00 (0.18-50.98)	5.08 (0.76-33.71)	0.55 (0.06-5.07)
NTBA	0.85 (0.25-2.92)	1.04 (0.31-3.45)	0.63 (0.12-3.30)	1.77 (0.15-21.09)	NC	0.85 (0.09-8.25)	0.66 (0.07-6.18)

OR: odds ratio; aOR: odds ratio ajustado; MIF: intensidad media de fluorescencia; CI: intervalo de confianza; >p50: igual o por encima del percentil 50. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p>0.001$. Los valores en negritas representan resultados estadísticamente significativos.

Evaluación de la expresión de la familia SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en células leucémicas de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda

Debido a que anteriormente se ha demostrado que las células NK de pacientes con LLA poseen una reducción significativa en la expresión de los receptores de la familia SLAM en comparación con controles sanos, se llevó a cabo la evaluación de los receptores de la familia SLAM en las células leucémicas de pacientes con LLA al momento del diagnóstico. La expresión de los ligandos SLAMF7, NTB-A y CD48 se analizó en células leucémicas de médula ósea de 20 pacientes con LLA cuyas características clínicas se encuentran en la Tabla 10. Los controles empleados para llevar a cabo este análisis fueron células inmaduras obtenidas de sangre de cordón umbilical de 10 donadores sanos.

Tabla 10. Variables clínicas de pacientes empleados en el análisis de receptores de SLAM en células leucémicas.

Clinical variables	ALL cases n=20 (%)
Child's sex	
Female	10 (50%)
Male	10 (50%)
Age group (years)	
1-9	10 (50%)
≥10	10 (50%)
Leukocyte Count	
<50,000	19 (95%)
≥50,000	1 (5%)
Immunophenotype	
Pre-B	20 (100%)
NCI Risk	
High Risk	10 (50%)
Standard Risk	10 (50%)
Relapse	
No	19 (90%)
Yes	2 (10%)
Death	
No	16 (80%)
Yes	4 (20%)
Rearrangement	
Detected	3 (15%)
TCF3/PBX1 ETV6/RUNX1	2 (10%) 1 (5%)
Not detected	17 (85%)

Los resultados del análisis por citometría de flujo mostraron que las frecuencias de las células leucémicas SLAMF7^{+} en la médula ósea eran inferiores al 5% o apenas detectables. Dichas

frecuencias resultaron comparables a lo observado en las células inmaduras tipo B de la sangre de cordón umbilical (UC) de los controles sanos (Figura 28 A).

En contraste, las frecuencias de las células leucémicas NTB-A^+ presentaron una disminución estadísticamente significativa ($p<0.0001$) en comparación con las células de UC del control sano (Figura 28 A). De la misma manera las frecuencias de las células leucémicas $CD48^+$ mostraron una disminución significativa ($p= 0.0061$) en comparación con las células control de UC. Sin embargo, a diferencia de SLAMF7 y NTB-A, se observó que el 47% de los pacientes poseen frecuencias de células leucémicas $CD48^+$ comparables a los controles, mientras que el 53% de los pacientes tuvieron una disminución drástica para este ligando en comparación con las células de los controles (Figura 28 A).

Debido a que este patrón de distribución no se encontró en los donantes sanos, decidimos segregar a los pacientes en dos grupos según el percentil 50 (P50), con base en la media de los controles (Figura 28 B). Al llevar a cabo el análisis estadístico de estos grupos en comparación con las frecuencias de los controles, se obtuvo una significancia estadística de $p<0.0001$ en el grupo de pacientes cuyas células leucémicas presentaron frecuencias de $CD48^+$ por debajo de la P50 en comparación con los controles.

Posterior a esto se analizó la densidad de expresión de estos receptores en la superficie de las células leucémicas, de dicho análisis de obtuvo que los niveles de expresión de SLAMF7 fueron comparables entre los controles y las células leucémicas de pacientes con LLA (Figura 28 C). Se encontró una diferencia significativa en los niveles de expresión de NTB-A entre los controles y los pacientes (Figura 28 B), no así para CD48, a menos que el análisis se realizara de acuerdo con los dos grupos previamente segregados por el P50 (Figura 28 D). Estos datos muestran que la expresión global de CD48 y NTB-A en las células tumorales leucémicas de los pacientes pediátricos con LLA se redujo significativamente en comparación con las células de controles sanos.

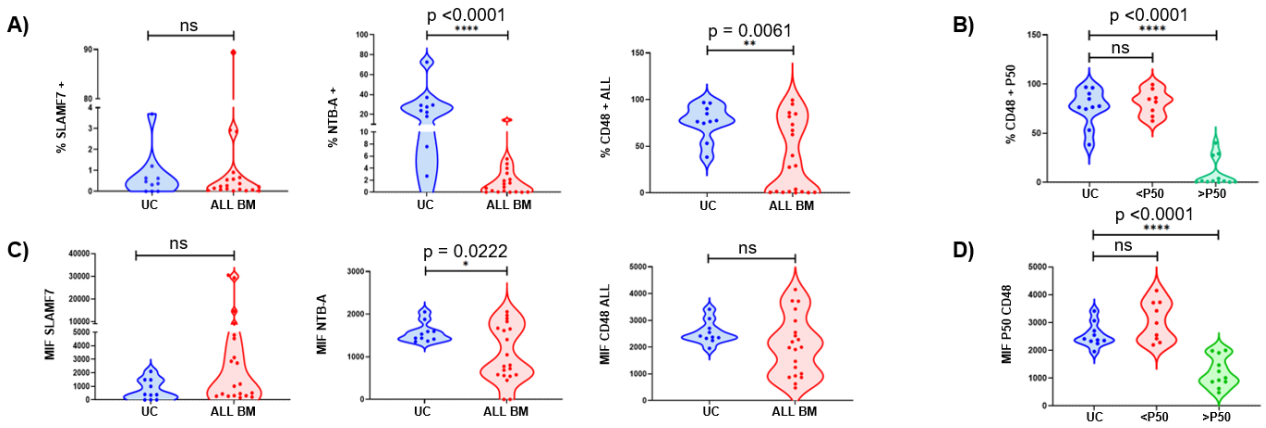


Figura 28. Fenotipificación de los receptores de la familia SLAM en células leucémicas de pacientes con LLA. (A) Las frecuencias de SLAMF7^{+}, CD48^{+} o NTB-A^{+} evaluados en células leucémicas con fenotipo CD45^{Dim}Linaje^{-}CD19^{+}CD20^{+} de 20 pacientes pediátricos con LLA comparadas con las células inmaduras de tipo B de cordón umbilical de 10 donadores sanos. Las líneas verticales indican la desviación estándar. B) Frecuencias de células leucémicas CD48^{+} P50 de pacientes con LLA comparado con controles sanos. Las líneas horizontales representan el valor de la media. Los valores de P reportan la significancia estadística evaluada con la prueba de U-Mann Whitney de una cola. (C) Niveles de expresión relativa para SLAMF7, CD48 o NTB-A en células leucémicas de pacientes con LLA comparadas con células B inmaduras de controles sanos. Los valores se representan como intensidad media de fluorescencia (MFI). D) Niveles de expresión relativa para CD48 P50 de pacientes con LLA comparado con controles sanos. HC: Controles sanos; ALL: Leucemia linfoblástica aguda; NS: no significativo.

Las células leucémicas de los pacientes con LLA muestran una disminución concomitante en la expresión de los receptores de la familia SLAM

Tomando en consideración que las células de los pacientes mostraron una reducción significativa en las frecuencias de expresión de CD48 y NTB-A, analizamos la expresión concomitante de los tres receptores SLAMFR evaluados entre los pacientes con LLA. Los pacientes se distribuyeron en dos categorías basadas en el percentil 50, calculado de acuerdo con la expresión de cada uno de los SLAM de los controles. Se obtuvieron cuatro combinaciones fenotípicas diferentes a partir de los análisis booleanos elaborados en los grupos antes mencionados (Figura 29).

Encontramos que, en la cohorte de pacientes con LLA, el 60 % (n=12) presentaba una disminución concomitante en la expresión de SLAMF7, CD48 y NTB-A (Figura 29, panel izquierdo). En contraste, solo un paciente (5 %) mostró una expresión concurrente normal de los tres receptores

SLAM evaluados (Figura 29, panel derecho), el 35% restante de los pacientes muestra una disminución en solo uno de los receptores SLAM o en dos de ellos. Por lo tanto, estos datos nos sugieren que, entre los pacientes pediátricos con LLA, las frecuencias de células leucémicas con una disminución concomitante en la expresión de SLAMF7, CD48 y NTB-A son dominantes sobre las células tumorales con reducción en solo un tipo de receptor SLAM.

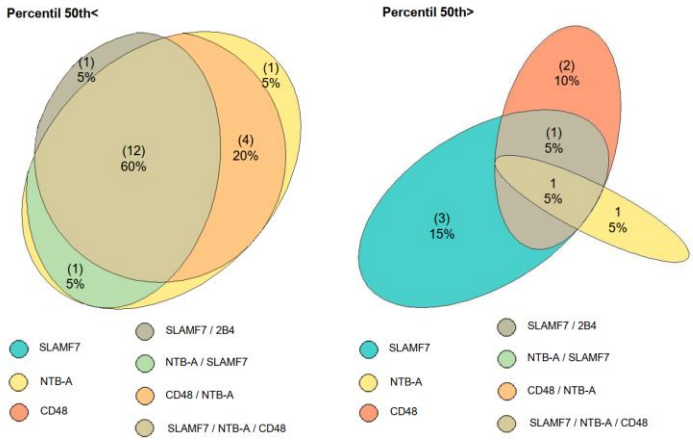


Figura 29. Evaluación de coexpresión de receptores SLAM en células leucémicas de pacientes con LLA. Los diagramas de Venn muestran el número de funciones, definidas mediante análisis booleano, que exhiben simultáneamente las células leucémicas en pacientes por debajo del percentil 50 (paneles izquierdos) o por encima del percentil 50 (panel derecho) para SLAMF7, CD48 y NTB-A. Las siete combinaciones posibles están representadas con diferentes colores y el número de pacientes con cada combinación se indica como porcentaje.

Las células NK de pacientes con LLA responden a la expresión ectópica de CD48

El hallazgo de que la expresión de CD48 y NTB-A se encontrara alterado de manera significativa en las células leucémicas de los pacientes pediátricos con LLA, nos llevó a plantear la hipótesis de que la pérdida o disminución en los niveles de expresión de estos receptores podría representar una ventaja para las células leucémicas dotándolas de la capacidad de evadir el reconocimiento y la lisis mediada por células NK. Con el fin de comprobar esta hipótesis, nos dimos a la tarea de evaluar si la expresión de un solo receptor de la familia SLAM en las células blanco modifica su susceptibilidad a la lisis mediada por células NK.

Primeramente, se evaluó la expresión de los receptores de la familia SLAM (CD48, NTB-A y SLAMF7) en distintas líneas celulares leucémicas (K562, RS4, REH y SUP-B15), como se muestra en la Figura 30. Las líneas celulares RS4, REH y SUP-B15 mostraron que tanto CD48, NTB-A o SLAMF7 se expresaron en al menos una de las tres líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda

evaluadas. En contraste, la línea de leucemia mieloide crónica K562 no expresó los receptores SLAMF7 ni CD48 y presentó una baja expresión para el receptor NTB-A (Figura 30 A). Por lo tanto, elegimos la línea celular K562 para generar una variante que expresara CD48 y así poder llevar a cabo ensayos de degranulación con estas células blanco (Figura 30 C).

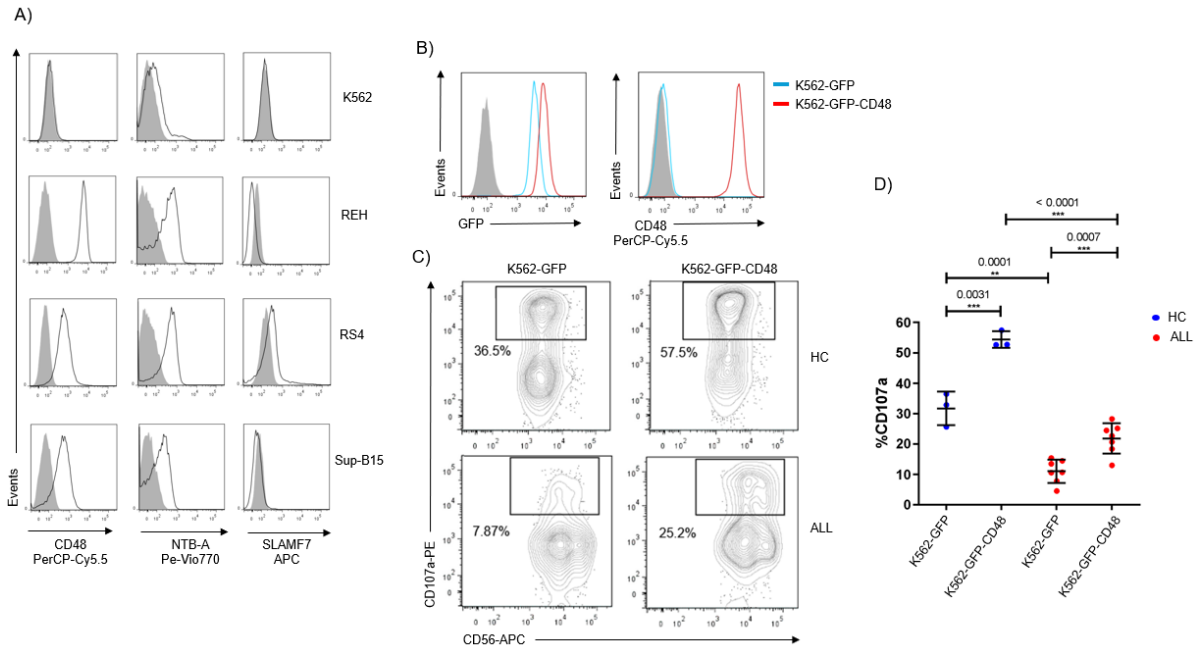


Figura 30. Las células NK de los pacientes con LLA responden a la expresión ectópica de CD48 en células leucémicas. (A) Análisis de los receptores de la familia SLAM en diferentes líneas celulares de leucemia. El histograma gris representa el control de autoflorescencia; los histogramas vacíos corresponden a los respectivos mAbs. (B) De la misma manera que en el inciso (A) el histograma gris representa el control de autoflorescencia, la expresión de GFP y CD48 fue analizada en la línea K562 transfectada con el vector pFB-GFP (histograma azul) y en la línea K562 transfectada con pFB-GFP-CD48 (histograma rojo). (C) Imagen representativa de los ensayos de degranulación en células NK primarias de pacientes con LLA (n= 7) y de controles sanos pareados por edad (n= 3). D) Estadística de los ensayos de degranulación en células NK primarias de pacientes con LLA y controles sanos. Las barras del gráfico representan la mediana y la desviación estándar-

Los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad empleando la línea celular K562 $CD48^+$ se observó en las células NK de sangre periférica de donantes sanos un aumento significativo de su función citotóxica, debido a que los porcentajes de células NK $CD107a^+$ en respuesta a K562 $CD48^+$ fueron significativamente mayores (p=0.0031) en comparación con K562 $CD48^-$ (Figura 30 C y 30 D). En el caso de los pacientes, se obtuvo como resultado que las frecuencias de células NK

CD107a^{+} obtenidas en respuesta a la línea K562 parental (sin expresión de CD48) estuvieron significativamente reducidas (p=0.0001) en comparación con lo obtenido en los controles (Figura 30 C, columna izquierda).

De manera interesante, en los pacientes con LLA, la simple expresión de CD48 en la línea celular K562 fue suficiente para incrementar significativamente (p=0.0007) la actividad de las células NK, superando los niveles observados en la respuesta frente a K562 CD48^{-} (Figura 30 C y 30 D). Estos resultados sugieren que CD48 pueda ser determinante en la modulación de la susceptibilidad de las células leucémicas a la lisis mediada por células NK. Este enfoque inicial condujo a la exploración de nuevas estrategias para modificar la expresión de los receptores SLAM en la superficie de las células leucémicas.

Modificar el conjunto de receptores SLAM en la superficie de las células leucémicas es suficiente para inducir la degranulación de las células NK

La activación de los receptores SLAM, junto con otros receptores activadores, es fundamental para influir en las respuestas inmunológicas de diferentes células del sistema inmunitario. Asimismo, la expresión artificial de la superficie de las células tumorales con SLAM ha demostrado ser efectiva en la estimulación de la fagocitosis mediada por macrófagos. Por lo tanto, se formuló la hipótesis de que al modificar el conjunto de SLAM en la superficie de las células leucémicas, se puede aumentar la susceptibilidad a la lisis mediada por células NK.

Con este propósito, se generaron conjugados biespecíficos basados en SLAM dirigidos a CD19. La razón por la cual se eligió esta molécula fue debido a que se expresa en la superficie de las líneas leucémicas empleadas en este estudio (Figura 31). Para activar los receptores SLAM en la superficie de las células NK, se empleó una proteína recombinante quimérica para SLAMF7, CD48 o NTBA, mientras que un anticuerpo monoclonal anti-CD19 se empleó para dirigir CD19 en las líneas celulares leucémicas. Posteriormente, se emplearon los conjugados biespecíficos para evaluar si el rearreglo artificial del conjunto de receptores SLAM en la superficie de las células leucémicas incrementa su susceptibilidad ante la citotoxicidad mediada por las células NK tanto de pacientes con LLA como de controles sanos.

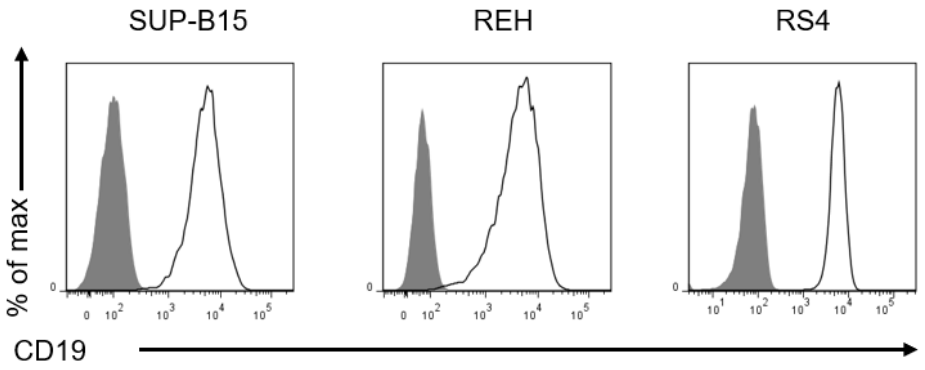


Figura 31. Análisis de la expresión de CD19 en líneas celulares de leucemia. Análisis de citometría de la expresión de CD19 en las diferentes líneas de leucemia linfoblástica aguda de tipo B. Los histogramas de color gris representan el control de autoflorescencia de cada una de las líneas celulares, los histogramas abiertos muestran la expresión de CD19 en cada una de las líneas celulares evaluadas.

Posteriormente, se emplearon PBMC´s como fuente de células NK, cuando estas células primarias se retaron con líneas celulares de leucemia aguda, no se observó un aumento las frecuencias de células NK CD107a^{+} en comparación con las células que no fueron expuestas al reto de las células blanco (solo células efectoras). Esta observación se mantuvo incluso en presencia de los conjugados biespecíficos CD19-SLAM (Figura 32).

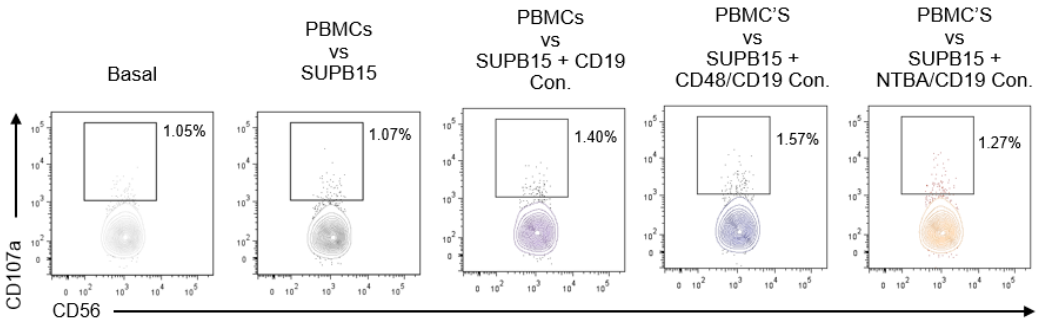


Figura 32. Las células NK sin estimulo tienen una pobre respuesta ante células leucémicas. Degranulación de células NK de controles sanos en respuesta a la línea celular leucémica SUP-B15 en presencia o ausencia de los conjugados biespecíficos CD19-SLAM. Los datos se presentan como porcentajes de CD107a que expresan las células NK. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos realizados de manera independiente.

Por lo tanto, se evaluó el efecto de incubar las células NK con las citocinas como IL-2, IL-12, IL-15 o interferon beta (IFN$^{\beta}$) que se conocen por mejorar la activación de las células NK. Tras

el tratamiento con citocinas durante 48 horas, se llevaron a cabo los ensayos de degranulación como resultado se obtuvo que la expresión de CD107a en la superficie de las células NK activadas se incrementó por encima de los niveles basales cuando fueron incubadas con las células blanco SUP-B15 (Figura 33).

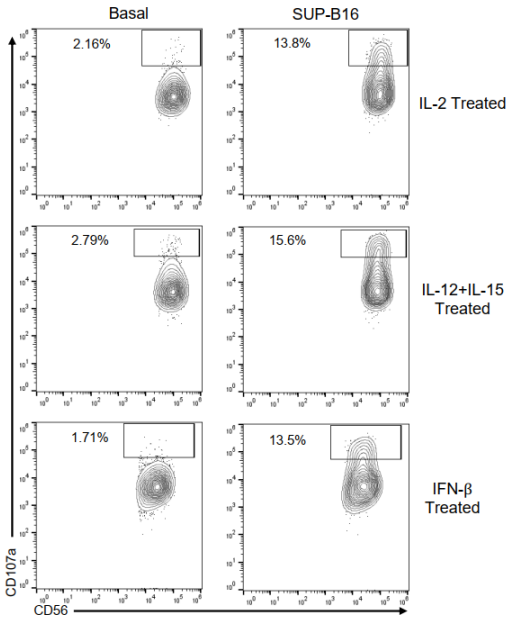


Figura 33. Las células NK activadas por citocinas responden ante el reto de células leucémicas. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC´s) de controles fueron estimuladas con diferentes citocinas (IL-2, IL-2+IL-15) o interferón (IFN-$_{\beta}$) durante 48 horas antes de los ensayos de degranulación. Estas células fueron incubadas con las células SUP-B15 por 4 horas a 37°C manteniendo una proporción de 1:1. Los datos se representan como porcentaje de CD107a que expresan las células NK. Se muestra un experimento representativo de tres ensayos independientes.

Con base en los resultados obtenidos anteriormente, se empleó el uso de la citocina IL-2 para activar a las células NK en los ensayos posteriores. Este hallazgo también se observó en las células NK activadas con IL-2 incubadas en presencia de células diana y conjugados que carecían de SLAM (CD19/ Empty Conjugates) (Figura 34 A).

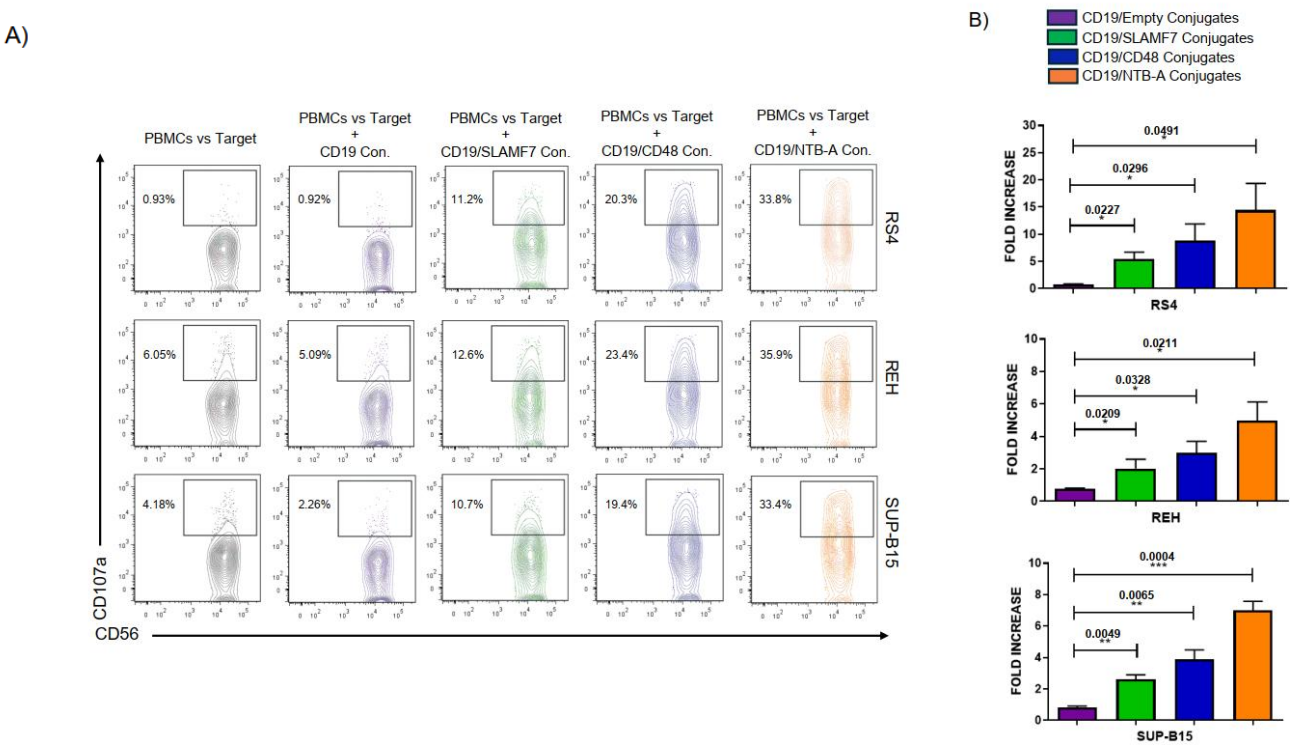


Figura 34. El acoplamiento de células leucémicas con conjugados biespecíficos con receptors SLAM es suficiente para que las células NK desencadenen una respuesta de degranulación. (A) Ensayos de degranulación con células NK de controles sanos en respuesta a diferentes líneas celulares de leucemia en presencia o ausencia de conjugados biespecíficos CD19-SLAM. Como control, se utilizaron los conjugados en ausencia del receptor SLAM (Empty/CD19 conjugates). Las células NK utilizadas se trataron con IL-2 por 48 horas antes del ensayo de degranulación. Los datos se representan con porcentajes de CD107a que expresan las células NK. Se muestra un experimento representativo. (B) Se muestra el análisis estadístico de tres experimentos independientes. Se muestra la desviación estándar y la media.

En contraste, la presencia de conjugados biespecíficos CD19-SLAM promovió un aumento significativo en la citotoxicidad de las células NK ante las diferentes líneas de leucemia empleadas en estos ensayos (RS4: SLAMF7 *p*=0.0227, CD48 p=0.0296, NTBA p=0.0491; REH: SLAMF7 p=0.0209, CD48 p=0.0328; SUPB-15: SLAMF7 p=0.0049, CD48 p=0.0065, NTB-A=0.004).

Curiosamente, entre los tres SLAM evaluados, NTB-A demostró ser más eficiente que CD48 o SLAMF7, este resultado se ve evidenciado cuando se utiliza como blanco a la línea celular SUP-B15. Además, se obtuvieron resultados consistentes al utilizar células NK purificadas y estimuladas (IL-2) como células efectoras (CD19/SLAMF7 p=0.0450; CD19/CD48 p=0.017) (Figura 35). En su conjunto, estos resultados indican que un rearreglo artificial de la expresión de los receptores SLAM en las células diana leucémicas es suficiente para promover una respuesta inmunológica.

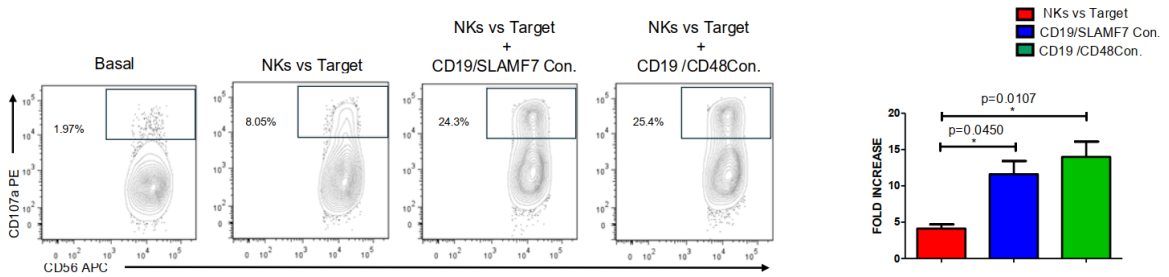


Figura 35. Las células NK purificadas son sensibles a los conjugados biespecíficos CD19-SLAM. Células NK purificadas y estimuladas con IL-2 por 48 horas de controles sanos se emplearon como células efectoras en los ensayos de degranulación contra la línea celular SUP-B15. Las células NK se mezclaron con las células blanco manteniendo una proporción 1:1 y fueron incubadas por 4 horas a 37°C en presencia o ausencia de los conjugados biespecíficos CD19/SLAM. Los datos se representan como porcentaje de CD107a que expresan las células NK. Se muestra un experimento representativo de tres ensayos independientes.

Los conjugados biespecíficos SLAM desencadenan la capacidad citotóxica de las células NK de pacientes con LLA

Una vez que constatamos que los conjugados biespecíficos de SLAM eran capaces de potenciar la respuesta citotóxica de las células NK primarias (IL-2), se procedió a evaluar si este efecto se presentaba también en células NK primarias (IL-2) de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. Como se mencionó anteriormente, las células PBMC´s fueron tratadas con IL-2 durante 48 horas antes de utilizarse en los ensayos de citotoxicidad, para los cuales únicamente se empleó como blanco la línea células SUP-B15 debido a que dicha línea celular nos permitió notar mayores diferencias entre los receptores SLAM y por la limitada cantidad de células disponibles para realizar los ensayos. Se evaluó únicamente la contribución de los receptores CD48 y NTB-A debido a que estos receptores mostraron mayor influencia en la capacidad citotóxica de las células NK al utilizar los conjugados biespecíficos.

Los resultados obtenidos nos mostraron que, en condiciones las frecuencias de células NK $CD107a^+$ se presentaron menores al 5% (Figura 36 A). Los porcentajes obtenido al retar las células NK primarias (tratadas con IL-2) con la línea celular SUP-B15 se mantuvieron sin variación. Por el contrario, la adición de los conjugados biespecíficos que contenían CD48 o NTB-A, resultó en un aumento de las frecuencias de células NK $CD107a^+$ por encima del 50% (Figura 36 A).

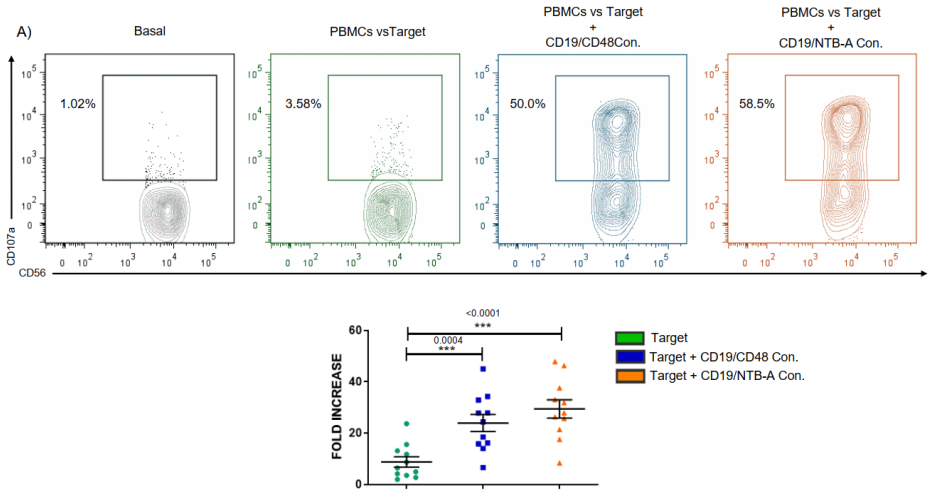


Figura 36. Conjugados biespecificos CD19-SLAM incrementan la respuesta citotóxica de las células NK primarias de pacientes con LLA. (A) Ensayos de degranulación de células NK primarias de pacientes con LLA en respuesta a la línea celular leucémica SUP-B15, en presencia o ausencia de los conjugados biespecíficos CD19-SLAMFR. Las células NK utilizadas en estos ensayos fueron tratadas con IL-2 por 48 horas antes de los ensayos de degranulación. Los datos se representan con porcentajes de CD107a que expresan las células NK. Se muestra un experimento representativo. (B) Se muestra el análisis estadístico de diez pacientes con LLA.

El análisis estadístico evidenció que la proporción de células NK que mostraban CD107a en su superficie celular se incrementó de manera significativa mediante los conjugados biespecíficos-SLAM (CD48 p=0.0004, NTB-A p<0.0001) (Figura 36 B). Estos hallazgos sugieren que la interacción de los SLAM en la superficie de las células NK, mediada por los conjugados biespecificos, es suficiente para redirigir una respuesta citotóxica robusta hacia las células leucémicas.

Los receptores SLAM no promueven la adhesión de células NK.

Se conoce que el evento de adhesión de las células NK a las células blanco desencadena una serie de elementos y señales que se requieren para la liberación de gránulos citotóxicos (d). Uno de los receptores de la familia SLAM que se ha visto involucrado con este evento es 2B4, que ha demostrado que además de proporcionar señales tempranas para la interacción de las células NK con las células diana, poseen la capacidad de inducir la señalización de LFA-1 y como consecuencia promover la adhesión de las células NK. Lo anterior nos sugiere que los conjugados biespecíficos-SLAMFR pueden ser capaces de promover la adhesión de las células NK a las células blanco.

Para evaluar esta posibilidad, realizamos ensayos de formación de conjugados de células NK con la línea celular SUP-B15. Las células NK y la línea blanco fueron marcadas con sondas fluorescentes específicas y se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo en presencia o ausencia de diferentes conjugados biespecíficos. Como se observa en la Figura 38 (columna izquierda), las frecuencias de conjugados entre células NK y células SUP-B15 en el tiempo 0 estaban por debajo del 1%, mientras que, a los 10 minutos, las frecuencias alcanzaron aproximadamente el 16%. Cuando este ensayo se realizó en presencia de los conjugados biespecíficos-SLAM, no se observó una diferencia significativa en las frecuencias de los conjugados efector-diana en ningún momento evaluado (Figura 37, columnas del medio y derecha). Este resultado fue consistente tanto para los conjugados biespecíficos de CD48 como para NTB-A. Estos datos sugieren que el mecanismo de acción de los conjugados biespecificos-SLAM no depende de la promoción de la adhesión de las células NK.

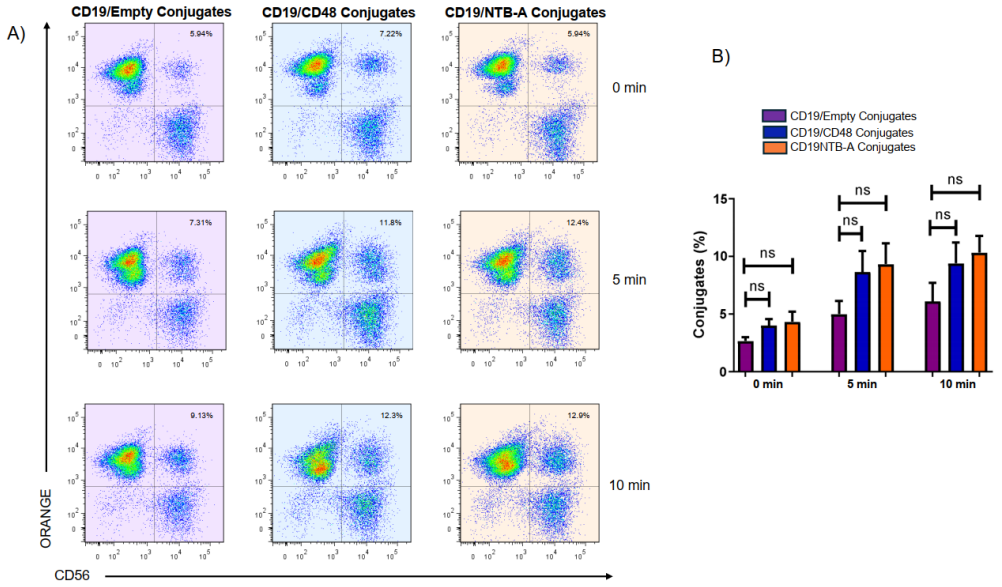


Figura 37. El efecto de los conjugados biespecificos basados en los receptores SLAM no promueve la adhesión de células NK. (A) Los ensayos fueron realizados con células NK purificadas, marcadas previamente con anti-CD56-APC incubadas en contacto con células SUP-B15 marcadas previamente con una sonda fluorescente a un radio de 1:4. Se llevó a cabo la incubación de la mezcla de estas células en diferentes condiciones de tiempo (0 minutos, 5 minutos y 10 min) a 37 °C. Los porcentajes de la formación de conjugados se encuentran en la parte superior derecha de cada dot plot. La formación de conjugados fue analizada por citometría de flujo. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (B) Se muestra la estadística de los tres

experimentos independientes de formación de conjugados realizados. La estadística fue calculada usando una prueba t de Student de dos colas.

La señalización de PLC-γ se requiere para promover la eliminación de las células leucémicas dependiente de los receptores de la familia SLAM.

En la búsqueda de determinar si las vías de señalización están implicadas en la degranulación de las células NK en respuesta a los conjugados biespecíficos-SLAM. PLC-γ2 y PI3K son dos proteínas clave en la señalización, necesarias para mantener las funciones efectoras de las células NK. Para determinar el papel de estas dos moléculas de señalización, se emplearon los inhibidores U73122 y LY294002 para bloquear las actividades de PLC-γ y PI3K, respectivamente. A continuación, evaluamos la capacidad de degranulación de las células NK (CD19/Empty, CD19/SLAMF7, CD19/CD48 o CD19/NTB-A) en presencia de un inhibidor de PLC-γ o PI3K (Figura 38).

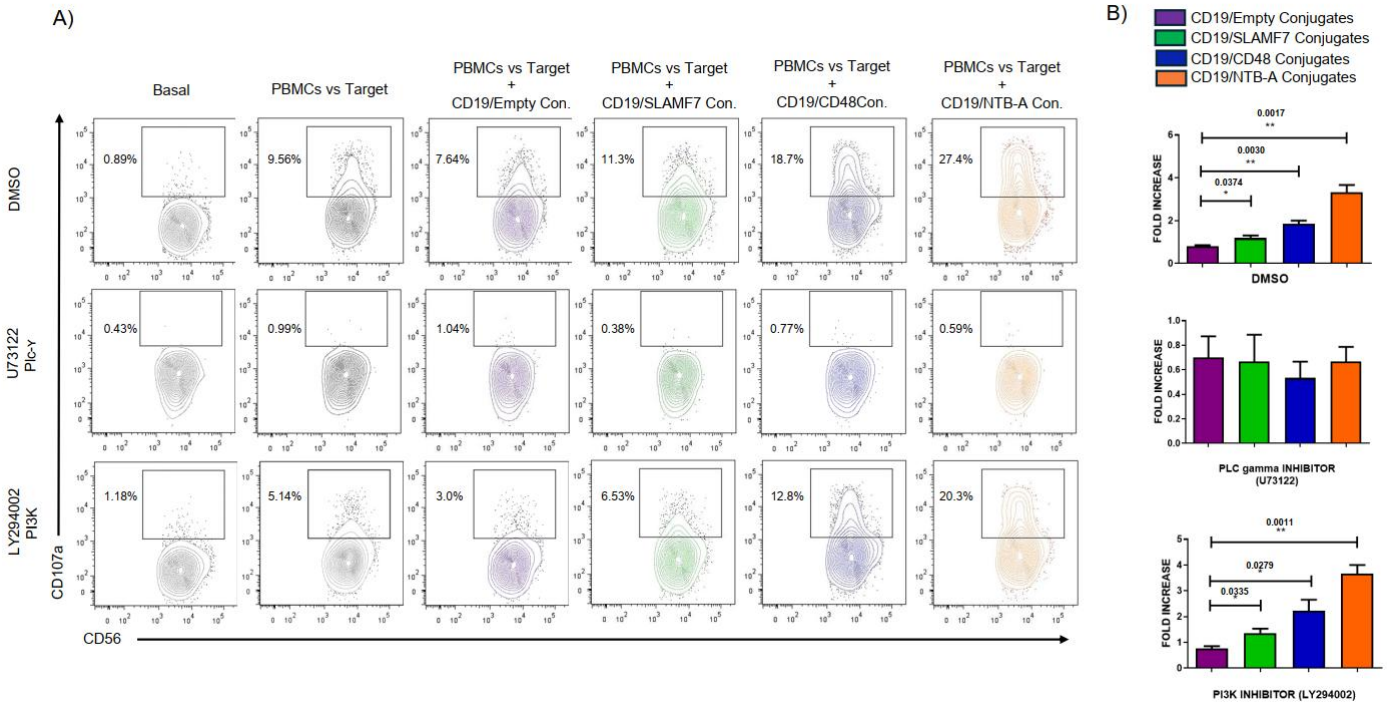


Figura 38. La señalización de PLC-γ se requiere para promover la eliminación de las células leucémicas dependiente de los receptores de la familia SLAM. (A) Células NK purificadas fueron pretratadas durante 30 min con DMSO (vehículo), el inhibidor de PLC-γ (U73122) o el inhibidor de PI3K (LY294002). Posteriormente se incubaron con las células blanco durante 4 horas para llevar a cabo un ensayo de degranulación. Los datos muestran las frecuencias de la expresión de CD107a en las células NK. Se muestra una imagen representativa de un experimento de tres experimentos

llevados a cabo de manera independiente. (B) Análisis estadístico de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el aumento relativo de células NK que expresan CD107a en la superficie celular. Se muestran las barras de desviación estándar y media.

Al incubar las células efectoras con células SUP-B15 en presencia del vehículo DMSO, los porcentajes de células NK CD107a^{+} aumentaron por encima de los niveles basales (SLAMF7 p=0.0374, CD48 p=0.0030, NTB-A p=0.0017) (Figura 38). Como se mostró previamente, la presencia de conjugados biespecíficos CD19-SLAM resultó en un aumento significativo en los porcentajes de células NK que expresan CD107a^{+}, en comparación con las células efectoras estimuladas con células blanco y conjugados sin SLAM.

Cuando estas condiciones se replicaron en presencia de un inhibidor específico de PLC-γ, las frecuencias de células NK CD107a^{+} disminuyeron significativamente por debajo del 5%, independientemente de la condición evaluada (Figura 38 A). En contraste, la adición de un inhibidor de PI3K causó una reducción parcial en dichas frecuencias; sin embargo, las diferencias en los porcentajes de células NK CD107a^{+} promovidas por los conjugados biespecíficos que contienen SLAM mostraron diferencias significativas (SLAMF7 p=0.0335, CD48 p=0.0279, NTB-A p=0.0011) (Figura 38). Estos resultados nos dejan ver que la activación de PLC-γ, pero no de PI3K, es necesaria para potenciar la citotoxicidad de las células NK en respuesta a los conjugados biespecíficos basados en SLAM.

DISCUSIÓN

Los receptores SLAM constituyen un grupo de proteínas de superficie celular que se expresan en células hematopoyéticas y, a través de interacciones homotípicas (con la excepción de 2B4, que reconoce CD48), influyen en respuestas efectoras críticas de las células inmunitarias, tales como la fagocitosis, citotoxicidad, secreción de anticuerpos, adhesión celular, activación de linfocitos y desarrollo celular[97]. Por lo tanto, es posible que una variación en la expresión y/o función de estos receptores favorezca la aparición de diversos escenarios patológicos, incluido el cáncer, estudios previos han documentado el papel de los receptores SLAM en la inmunidad tumoral.

Las células NK desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune debido a que representan la primera línea de defensa contra infecciones virales y células transformadas, por lo que resultan ser un elemento de gran importancia en la inmunovigilancia contra el cáncer, por su capacidad de diferenciar las células sanas de las células cancerígenas, a través del reconocimiento de alteraciones físicas o químicas conservadas que acompañan el proceso de transformación a células malignas, esencialmente este fenómeno desencadena la respuesta citotóxica hacia las células cancerígenas de diferentes tejidos, incluidas las células neoplásicas de origen hematopoyético. Los receptores de la familia SLAM, incluidos 2B4, NTB-A y SLAMF7, han sido identificados recientemente como importantes reguladores de la función de las células NK, siendo elementos de suma importancia en la inmunovigilancia contra el cáncer. Como consecuencia, se considera que las células NK son elementos clave en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluida la leucemia.

Se han llevado a cabo investigaciones que demuestran que los receptores de la familia SLAM son cruciales para mediar la eliminación de células hematopoyéticas transformadas. No obstante, existen estudios en donde se evidencia que la expresión anormal o señalización defectuosa de estos receptores se traduce en una deficiencia de la capacidad citotóxica de las células NK, tal es el caso del mieloma múltiple en donde en un estudio elaborado por Wang Z. y colaboradores se evidenció que las células NK de estos pacientes poseen una expresión disminuida para el receptor 2B4 lo cual se vio asociado con el escape de las células tumorales ante el sistema inmune. De manera similar en este estudio encontramos que las células de los pacientes pediátricos con LLA de linaje Pre-B al momento del diagnóstico poseen una disminución significativa en frecuencias y expresión relativa respecto al grupo control. Lo anterior resulta de suma importancia debido a que 2B4 es un receptor que participa en la activación y polarización de la maquinaria citolítica de las células NK y se ha demostrado que posee un potente efecto coestimulador en las células NK, ya que al potenciar sus

señales se logró redirigir la función citolítica de las células NK humanas ante células leucémicas y de tumores autólogos resistentes a las células NK [98].

Se conoce que NTB-A funge principalmente como un regulador positivo en la función de las células NK, estimulando su capacidad citotóxica a través de interacciones hemofílicas, dicho receptor posee además la capacidad de coestimular efectivamente otras señales activadoras promoviendo así las funciones efectoras de las células NK. Se ha demostrado que la función del receptor NTB-A en pacientes con XLP y como resultado las células NK deficientes de SAP muestran una fuerte inhibición de la función efectora de las células NK [99100]. Si bien esta enfermedad no es de carácter neoplásico, este estudio hace evidente la importancia de dicho receptor en la función efectora de las células NK y resalta la importancia del resultado obtenido en este estudio, en el que se obtuvo una disminución significativa en la expresión global del receptor NTB-A. Este resultado es consistente con lo que se ha demostrado en el estudio realizado por Korver y colaboradores en el que se analizó la expresión de NTB-A en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC), la cual demostró una disminuida[101].

SLAMF7 es uno de los receptores menos explorado en células humanas. Este receptor también parece estar favoreciendo la capacidad citotóxica de las células NK, se sabe por parte de un estudio llevado a cabo en células NK de pacientes con células de linfoma, que un fenotipo de subexpresión de este receptor conlleva a una capacidad citotóxica disminuida, haciéndolas incapaces de poder erradicar a dichas células malignas[10279]. De la misma manera en pacientes con LLA logramos evidenciar el fenotipo de expresión disminuida para este receptor.

Aunque el análisis individual de la expresión de los receptores de la familia SLAM, es útil para caracterizar el fenotipo de las células NK en el ambiente leucémico, es importante recordar que su actividad citotóxica está regulada por un delicado equilibrio entre las señales emitidas en conjunto. Por ello fue fundamental realizar un análisis de coexpresión de los receptores aquí estudiados, los resultados obtenidos develaron que las células NK de pacientes pediátricos con LLA poseen un fenotipo de disminución concomitante de los receptores 2B4, NTB-A y SLAMF7. Actualmente no existen reportes de la expresión concomitante de estos receptores en neoplasias hematológicas, sin embargo, conociendo el papel que desempeñan los miembros de esta familia en las células NK podemos pensar que aquellos pacientes en los cuales se expresa un fenotipo alterado concomitante de estos receptores posiblemente presenten una capacidad efectora deficiente y por ende un impacto significativo en las funciones de inmunovigilancia por parte de sus células NK.

Por otro lado, también se evaluó la población de células NK en estos pacientes y se buscó compararlo con los controles, con la finalidad de comprobar si el establecimiento de esta neoplasia posee un impacto en el pool de dichas células. Nuestros resultados mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células NK con respecto a los controles, lo cual concuerda con lo reportado por Rayne H. y colaboradores quienes reportan que pacientes pediátricos con LLA presentan una disminución en la proporción y cuentas absolutas de células NK [103]. Esta alteración se ha evidenciado además en otras neoplasias como la leucemia mieloide aguda (LMA)[104] y la leucemia mieloide crónica (LMC)[105].

Por otro lado, es bien sabido que las células NK se caracterizan por conformarse por dos subconjuntos mayoritarios determinados por la expresión de CD56 y CD16, estas subpoblaciones se ven diferenciadas por su grado de madurez y sus diferentes capacidades efectoras[106]. Por un lado, las células $CD56^{dim}$ corresponden a la población madura de este tipo celular por lo que poseen mayor capacidad citotóxica y una capacidad de secretar una gran cantidad de citocinas cuando reciben señales de activación por parte de los receptores activadores que poseen en su superficie. Por otro lado, la población de NK $CD56^{bright}$ define a las NK inmaduras con capacidad proliferativa y producción IFN-γ en respuesta a IL-12[107]. Dado a lo anteriormente expuesto, se llevó a cabo la evaluación de subpoblaciones de células NK, el resultado fue que ambos subconjuntos de células NK ($CD56^{dim}$ y $CD56^{bright}$) presentan una disminución significativa en pacientes con LLA al momento del diagnóstico con respecto a los controles sanos, lo que sugiere que debido a esta disminución en la población de células NK los pacientes con LLA presenten una deficiencia en la capacidad de eliminar a las células leucémicas.

Como se mencionó anteriormente el desarrollo de las células NK se puede identificar en las poblaciones antes expuestas, sin embargo a medida que estas células maduran van perdiendo la expresión de algunos receptores, como es el caso de NK p30, NK p46, NK G2D, y NKG2A, mientras que van adquiriendo la expresión de CD16 y otros receptores encargados de regular sus funciones efectoras como KIR, 2B4 y LIR-1[108]. Por otro lado, la expresión de CD57 también identifica un subgrupo de células NK maduras ($CD56^{dim}$ $CD57^{+}$), este subgrupo posee una capacidad proliferativa reducida pero no exhausta o senescente como es el caso de las células T que expresan el marcador antes mencionado[109]. Finalmente se conoce que dentro del subconjunto de células $CD56^{dim}$ existen poblaciones en diferentes etapas de maduración, estas etapas pueden identificarse con la pérdida del receptor de inhibición NKG2A junto con el aumento en la expresión de CD57[110].

Es bien sabido que un ambiente tumoral y leucémico ocasiona cambios en el desarrollo habitual de las células que conforman al sistema inmune, comprometiendo así su correcto

funcionamiento y evadiendo la respuesta inmune[1]. Debido a esto, se realizaron análisis en la población de células NK tanto de pacientes como de controles en función de la expresión de NKG2A y CD57, se evaluaron cuatro subpoblaciones distintas ($NKG2A^{-}CD57^{-}$, $NKG2A^{+}CD57^{-}$, $NKG2A^{-}CD57^{+}$, $NKG2A^{+}CD57^{+}$). A partir de este análisis se obtuvo que los pacientes con LLA muestran una disminución significativa en el porcentaje de una subpoblación madura de células NK ($NKG2A^{-}CD57^{+}$) y a su vez, un aumento en una subpoblación inmadura ($NKG2A^{-}CD57^{+}$) con respecto a los controles. Lo anterior, sugiere que el ambiente leucémico, podría tener un impacto en los eventos de maduración de las células NK lo que conllevaría a un impacto en sus capacidades efectoras. De manera adicional se evaluó la expresión relativa de los receptores de la familia SLAM, los resultados evidenciaron que la expresión de los receptores 2B4, NTB-A y SLAMF7 se encuentra significativamente disminuida en las cuatro subpoblaciones aquí analizadas, lo que nos lleva a entender que el ambiente generado en la LLA podría estar afectando tanto la maduración de este tipo celular como la expresión de los receptores involucrados en desencadenar respuestas efectoras en contra de las células leucémicas.

Este hallazgo, sumado a la reducción significativa en la proporción de células NK circulantes en sangre periférica en pacientes con LLA, plantea la necesidad de cuestionar el impacto que pueden tener estas alteraciones en la expresión de los receptores SLAM, la hipótesis planteada a partir de este conocimiento es que la alteración en la cantidad de células NK, en su maduración y en la expresión de receptores de importancia como lo son los receptores aquí evaluados dificultan la capacidad de inmunovigilancia mediada por células NK mediante la alteración de su potencial citotóxico. En busca de poder comprobar la hipótesis antes planteada se llevó a cabo la evaluación de dos tipos de citotoxicidad independientes: la citotoxicidad natural y la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), la cual se efectúa exclusivamente mediante el entrecruzamiento de CD16. Los resultados obtenidos en estos análisis revelaron que los pacientes con LLA poseen una disminución en la citotoxicidad natural (evaluada por el reto contra K562), se mostró una tendencia hacia una citotoxicidad disminuida, resultado congruente con lo reportado con anterioridad en un estudio realizado en pacientes pediátricos con LLA [103111], aunque el resultado obtenido en nuestra cohorte no alcanzaron la significancia estadística, se observó una tendencia hacia la reducción de la citotoxicidad.

Adicionalmente, nuestra cohorte mostró que las células NK de los pacientes con LLA exhiben una respuesta significativamente disminuida ante el reto con la línea celular P815 (previamente acoplada con CD16), ensayo realizado para la evaluación de la citotoxicidad ADCC, lo que sugiere que las células NK de los pacientes podrían presentar alteraciones en más de una vía de activación

involucrada en su función citotóxica. Adicionalmente se evaluó el fenotipo de expresión de los receptores SLAM en el grupo de pacientes que mostraron una disminución significativa en este fenómeno citotóxico mediante análisis booleanos, estos análisis nos permitieron ver que existe un fenotipo alterado, al encontrar que el 59% de los pacientes con ADCC disminuida presentan una disminución en la expresión concomitante de los receptores 2B4, NTB-A y SLAMF7. En conjunto estos resultados sugieren que, la contribución de estos receptores resulta importante en los eventos citotóxicos de las células NK de pacientes con LLA y que posiblemente otros factores intrínsecos a la maquinaria citolítica también podrían estar comprometidos en estos pacientes.

Finalmente, para esta cohorte de pacientes se llevó a cabo un análisis de regresión logística para identificar asociaciones entre el fenotipo alterado de los receptores SLAM en las células NK y la probabilidad de desarrollar LLA durante la infancia. Este análisis demostró que existe una asociación significativa entre la reducción, tanto de porcentaje como densidad de expresión de estos receptores y la LLA infantil al momento del diagnóstico. Los resultados antes obtenidos confirman que la disminución en la expresión de 2B4, NTB-A y SLAMF7, se traducen en una deficiente capacidad de eliminación de las células leucémicas, fenómeno que ha sido observado en otras neoplasias hematológicas como la LMA, donde se ha sugerido que la disminución de 2B4 junto con otros receptores como DNAM, NKG2D y NCRs podría explicar la resistencia de las células leucémicas mieloides a la lisis mediada por las células NK de estos pacientes[112].

Debido a que la función de los receptores SLAM en las células NK depende de la señalización desencadenada por el reconocimiento de estos receptores con sus ligandos en la célula blanco, se llevó a cabo el análisis de las frecuencias y densidades de expresión de los receptores CD48, NTB-A y SLAMF7 en células leucémicas de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA. A partir de este análisis, obtuvimos como resultado que, en comparación con las células sanas de cordón umbilical, las células leucémicas de pacientes pediátricos con LLA presentan una expresión global significativamente disminuida tanto para CD48 como para NTB-A, mientras que para SLAMF7 fue apenas detectable tanto en células B normales como malignas. Es importante señalar que a partir de la expresión de CD48 se detectaron dos grupos de pacientes, debido a que el 50% mostraron una expresión comparable a la de los controles, mientras que, la otra mitad de pacientes, se evidenció una disminución significativa en la expresión de la expresión de CD48.

Este comportamiento puede ser explicado mediante el entendimiento de que, las células leucémicas poseen la capacidad de editar la expresión de sus receptores en la superficie, otorgándoles así la capacidad de escapar ante la detección y por ende la eliminación mediada por células NK. Se tienen antecedentes que evidencian que la disminución en la expresión del receptor CD48 en células

leucémicas de LMA está asociado con una reducción en la capacidad efectora de las células NK de estos pacientes y debido a esto al escape de las células neoplásicas ante la inmunovigilancia contra el cáncer[76113]. Por lo tanto, este fenómeno podría dotar de una ventaja selectiva a las células leucémicas y, por ende, lograr la evasión del reconocimiento y su eliminación por parte de las células NK [114]. En la LMA, los pacientes con alta expresión de CD48 presentan tasas de supervivencia más elevadas que aquellos con baja expresión de CD48. En nuestra cohorte de pacientes, no se encontraron asociaciones entre la baja o ausente expresión tanto de CD48 como de NTB-A y alguna variable clínica al momento del diagnóstico, sin embargo, es importante señalar que debe hacerse el seguimiento correspondiente de estos pacientes en miras de poder evaluar la asociación de estos resultados con la tasa de supervivencia.

Dado que los receptores SLAM están involucrados en la regulación del reconocimiento de la célula NK a la célula blanco, los resultados anteriores nos llevaron a suponer que los receptores SLAM podrían promover el control inmunológico dirigido contra la LLA. Para probar esta hipótesis, se generó una variante de células K562 que expresan CD48, la cual se utilizó como célula blanco para llevar a cabo ensayos de citotoxicidad empleando células NK de sangre periférica, tanto de pacientes como de controles sanos. A partir de esos ensayos, se obtuvo como resultado que las células NK de pacientes con LLA fueron capaces de responder a la activación de CD48, aumentado su capacidad citotóxica. Este hallazgo es consistente con lo reportado en estudios realizados en líneas celulares de células NK humanas, en donde se demuestra que la activación de 2B4 favorece la citotoxicidad mediada por células NK de células blanco que expresan CD48[53115]. Estos resultados demuestran que las células NK de pacientes pediátricos con LLA conservan su potencial para exhibir funciones efectoras citotóxicas, siempre y cuando reciban un estímulo adecuado. Además, estos datos sugieren que la sola expresión de CD48 en la superficie de las células leucémicas es suficiente para revertir la deficiente capacidad de respuesta de las células NK primarias de pacientes con LLA. En conjunto, estos hallazgos pueden ser alentadores si se considera el diseño de inmunoterapias basadas en los receptores SLAM. De hecho, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas basadas en la capacidad de los receptores SLAM para promover la señalización celular en las células inmunitarias efectoras[116117].

Las funciones efectoras de las células NK se han aprovechado en las últimas décadas en la inmunoterapia contra el cáncer, particularmente en el tratamiento de malignidades hematológicas. Recientemente se ha abordado un enfoque prometedor, debido a su seguridad y efectividad para el tratamiento del cáncer, una inmunoterapia que se basa en redirigir específicamente la capacidad de las células NK para eliminar células malignas, esto ha sido posible mediante el diseño de moléculas

que son conjugados basados en anticuerpos, denominadas medidores (del inglés engagers) de células NK, los cuales pueden ser de naturaleza biespecífica o triespecífica (BiKE y TriKE, respectivamente). La función de estas moléculas consiste en promover la sinapsis inmunológica entre la célula NK y la célula blanco, permitiendo así la eliminación de las células transformadas mediada por las células NK [118119]. En este trabajo, se llevó a cabo el desarrollo de conjugados biespecíficos que contienen los receptores aquí evaluados y el antígeno CD19, molécula que se expresa en la superficie de las células leucémicas de LLA, estos conjugados fueron diseñados para establecer la sinapsis inmunológica de las células NK y las células leucémicas mediada por los receptores CD48, NTB-A y SLAMF7. Cuando estos conjugados se emplearon para redirigir el mecanismo citotóxico de células NK en reposo hacia varias líneas celulares de LLA, no observamos un aumento significativo en la degranulación de las células NK, a menos que las células NK hubieran sido activadas previamente, mediante la adición de citocinas al cultivo. Cabe destacar que las células NK humanas en reposo pueden ser intrínsecamente menos eficientes que las células NK activadas por citocinas, o que se necesitan señales mucho más fuertes para inducir la lisis mediada por las células NK en reposo[120]. En consonancia con esta observación, se han probado varios protocolos de activación para mejorar la citotoxicidad mediada por células NK [121].

Se ha demostrado que las funciones antitumorales de las células NK pueden ser moduladas no solo por la interacción receptor-ligando, sino también por varias citocinas, incluidas IL-2, IL-15, IL-18 o IL-12[122]. Aunado a lo anterior, se sabe que los blastos leucémicos primarios solo pueden ser eliminados por células NK activadas por citocinas [123124]. Tomando en cuenta lo anterior, tras el tratamiento con citocinas (IL-2, IL-12 e IL-15), observamos una influencia significativa de los conjugados biespecíficos basados en receptores SLAM en el aumento de la degranulación de las células NK. Además, este efecto fue reproducible ante el reto con diferentes líneas celulares de leucemia aguda (REH, RS4 y SUP-B15). Es importante destacar que no se observaron diferencias en la capacidad citotóxica de las células NK, independientemente de si estas células estaban purificadas o no, lo que sugiere que la modificación de la capacidad citotóxica de las células NK no fue influenciada por efectos mediados por otras células inmunitarias. Es importante señalar que la presencia de células blanco de LLA fue necesaria para observar el efecto de la activación de los receptores SLAM en la superficie de las células NK, lo que indica que la contribución de los receptores SLAM por sí solos no fue suficiente para promover la degranulación de las células NK. Este resultado respalda la idea de que la señal de un receptor activador por sí sola, no es capaz de promover la liberación de gránulos citotóxicos, con la excepción de CD16[43]. Por lo tanto, es posible que se necesite un patrón específico de señalización entre los receptores SLAM y otro receptor activador para lograr una activación eficiente de las células NK.

De manera interesante, de los tres receptores SLAM probados, NTB-A mostró mayor eficacia para inducir la degranulación de las células NK. La influencia de NTB-A en las funciones efectoras de las células NK no ha sido completamente abordada en comparación con 2B4 o SLAMF7. Por lo tanto, se necesitan más estudios sobre el papel de este receptor en la activación de las células NK para reforzar estos hallazgos.

Varios estudios indican que las células NK de pacientes con leucemia aguda son menos abundantes y presentan defectos en su desarrollo y funcionalidad. Por lo tanto, resultó importante evaluar si las células NK de pacientes pediátricos eran capaces de responder a los conjugados biespecíficos basados en receptores SLAM. Nuestros estudios mostraron claramente que las células NK primarias de pacientes pediátricos con LLA respondieron significativamente a los conjugados basados en receptores SLAM, aumentando la degranulación de las células NK en comparación con aquellas incubadas solo con células blanco. El hecho de que se promoviera al menos un aumento de diez veces o más en la degranulación de las células NK en respuesta a los conjugados biespecíficos CD19-SLAM sugiere que cualquier posible defecto en la funcionalidad observado en las células NK de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda puede revertirse parcialmente mediante la activación de receptores SLAM junto con otros receptores activadores de células NK.

Para elucidar los modos de acción de estos conjugados biespecíficos CD19-SLAM en la activación de células NK, evaluamos el impacto de la activación de los receptores SLAM en eventos celulares que forman parte de la inmunovigilancia mediada por células NK, previamente descritos[125]. Nuestro primer enfoque fue evaluar el impacto en la adhesión de las células NK frente a la célula blanco. Los resultados obtenidos de ensayos basados en la formación de conjugados demostraron que los conjugados biespecíficos CD19-SLAM no tuvieron un impacto significativo en la capacidad de las células NK para adherirse a las células blanco. Posteriormente, investigamos el papel de las moléculas de señalización celular en el mantenimiento de la degranulación de las células NK promovida por los conjugados biespecíficos basados en los receptores SLAM. Tanto PLC-γ y PI3K son proteínas de señalización necesarias para mantener la capacidad citotóxica de las células NK [114]. Nuestros resultados mostraron que, en comparación con PI3K, PLC-γ desempeñó un papel importante en mantener la degranulación de las células NK en respuesta a nuestros conjugados biespecíficos basados en receptores SLAM. En conjunto, estos datos coinciden con lo que se ha demostrado previamente para SLAMF7[126].

Finalmente, demostramos que redirigir las señales de las células NK mediante la activación de receptores SLAM fue suficiente para promover la respuesta citotóxica mediada por células NK hacia células leucémicas. Esto se logró mediante el acoplamiento de conjugados biespecíficos basados en receptores SLAM en las células leucémicas y en células NK primarias de donantes sanos o de pacientes pediátricos con LLA. Por lo tanto, los receptores SLAM podrían proporcionar un recurso importante para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica, debido a la importancia que han demostrado poseer en la función citotóxica de las células ante las células leucémicas de LLA y posiblemente de otras malignidades hematológicas.

CONCLUSIÓN

Los hallazgos de este proyecto evidencian el papel crítico de la familia de receptores SLAM en la modulación de la actividad citotóxica de las células NK en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Se identificó una disminución significativa en las frecuencias y niveles de expresión de 2B4, NTB-A y SLAMF7 en células NK de pacientes al momento del diagnóstico, en comparación con controles sanos, lo que sugiere una disfunción inmunitaria inherente. Este patrón concurrente de disminución se presenta en pacientes que exhiben una capacidad citotóxica dependiente de anticuerpo reducida, lo que posiblemente pudiera contribuir a la evasión inmunitaria de las células leucémicas.

Por otro lado, las células leucémicas también presentan niveles disminuidos de los receptores CD48, NTB-A y SLAMF7, reforzando el impacto de estas alteraciones en las interacciones receptor-ligando en el contexto de la inmunoevasión. Sin embargo, se demostró que la expresión ectópica de CD48 en células leucémicas y el rearreglo artificial de los receptores SLAM son estrategias efectivas para restaurar y potenciar la actividad citotóxica de las células NK tanto en pacientes como en controles sanos. Además, se confirmó que la señalización mediada por PLC-gamma es esencial para la eliminación de células leucémicas dependiente de los receptores SLAM, estableciendo a esta vía como un mecanismo clave en la respuesta antitumoral. Estos resultados no solo aportan conocimiento fundamental sobre los mecanismos de inmunoevasión en la LLA pediátrica, sino que también identifican a los receptores SLAM y sus vías de señalización como prometedoras dianas terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cruz-Muñoz ME, Valenzuela-Vázquez L, Sánchez-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;(January):1-17. doi:10.1002/JLB.MR0618-224RR

2. Konjević GM, Vuletić AM, Mirjačić Martinović KM, Larsen AK, Jurišić VB. The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine*. 2019;117:30-40. doi:https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.02.001

3. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (80-)*. 2011;331(6013):44-49. doi:10.1126/science.1198687

4. Poznanski SM, Ashkar AA. What Defines NK Cell Functional Fate: Phenotype or Metabolism? *Front Immunol*. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01414

5. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity*. 2012;36(1):55-67. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.016

6. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013;34(12):573-582. doi:10.1016/j.it.2013.07.005

7. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-640. doi:10.1016/s1471-4906(01)02060-9

8. Abdel-Latif M YR. Clinical Oncology. *World J Clin Oncol*. 2020;4333(7):464-477.

9. Chan A, Hong D-L, Atzberger A, et al. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*. 2007;179(1):89-94. doi:10.4049/jimmunol.179.1.89

10. Duault C, Kumar A, Taghi Khani A, et al. Activated natural killer cells predict poor clinical prognosis in high-risk B- and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2021;138(16):1465-1480. doi:10.1182/blood.2020009871

11. Long EO, Sik Kim H, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):227-258. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075005

12. Seren Bernardone I. Role of NK cells and adaptive immunity in "immunoediting": Recent developments. *Inmunología*. 2008;27(3):141-146. doi:10.1016/S0213-9626(08)70062-3

13. Uzhachenko R V., Shanker A. CD8+ T lymphocyte and NK cell network: Circuitry in the cytotoxic domain of immunity. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1-7. doi:10.3389/fimmu.2019.01906

14. Quatrini L, Della Chiesa M, Sivori S, Mingari MC, Pende D, Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur J Immunol*. 2021;51(7):1566-1579. doi:https://doi.org/10.1002/eji.202049028

15. Amand M, Iserentant G, Poli A, et al. Human CD56(dim)CD16(dim) Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset. *Front Immunol*. 2017;8:699. doi:10.3389/fimmu.2017.00699

16. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev*

Immunol. 2008;8(9):713-725. doi:10.1038/nri2381

17. Friedman D, Simmonds P, Hale A, et al. Natural killer cell immune synapse formation and cytotoxicity are controlled by tension of the target interface. *J Cell Sci*. 2021;134(7). doi:10.1242/jcs.258570

18. Meza Guzman LG, Keating N, Nicholson SE. Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4). doi:10.3390/cancers12040952

19. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. 2019;105(6):1319-1329. doi:10.1002/JLB.MR0718-269R

20. Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:82-89. doi:10.1016/j.coi.2016.01.007

21. He Y, Tian Z. NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(4):321-330. doi:10.1038/cmi.2016.26

22. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436(7051):709-713. doi:10.1038/nature03847

23. Höglund P, Brodin P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(10):724-734. doi:10.1038/nri2835

24. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol*. 2018;39(3):222-239. doi:10.1016/j.it.2017.12.001

25. Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol*. 2009;30(4):143-149. doi:10.1016/j.it.2009.01.006

26. Horowitz A, Djaoud Z, Nemat-Gorgani N, et al. Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Sci Immunol*. 2016;1(3):eaag1672-eaag1672. doi:10.1126/sciimmunol.aag1672

27. Wickström SL, Öberg L, Kärre K, Johansson MH. A Genetic Defect in Mice That Impairs Missing Self Recognition Despite Evidence for Normal Maturation and MHC Class I–Dependent Education of NK Cells. *J Immunol*. 2014;192(4):1577-1586. doi:10.4049/jimmunol.1300960

28. 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):973-980. doi:10.1038/ni.1763

29. Guia S, Jaeger BN, Piatek S, et al. Confinement of Activating Receptors at the Plasma Membrane Controls Natural Killer Cell Tolerance. *Sci Signal*. 2011;4(167):ra21-ra21. doi:10.1126/scisignal.2001608

30. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675-678. doi:10.1038/319675a0

31. Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(2):85-100. doi:10.1038/s41571-020-0426-7

32. R&D SYSTEMS. Natural Killer Cell Receptors: Human Target Cell – NK Cell Ligand-

Receptor Interactions. https://www.rndsystems.com/pathways/natural-killer-cell-receptors-human-target-cell-nk-cell-ligand-receptor-interactions-pathway#nectin.

33. Bryceson YT, Chiang SCC, Darmanin S, et al. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun*. 2011;3(3):216-226. doi:10.1159/000325265

34. Björkström NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 2010;116(19):3853-3864. doi:10.1182/blood-2010-04-281675

35. Ziegler AE, Fittje P, Müller LM, et al. The co-inhibitory receptor TIGIT regulates NK cell function and is upregulated in human intrahepatic CD56(bright) NK cells. *Front Immunol*. 2023;14:1117320. doi:10.3389/fimmu.2023.1117320

36. Bernhardt G. TACTILE becomes tangible: CD96 discloses its inhibitory peculiarities. *Nat Immunol*. 2014;15(5):406-408. doi:10.1038/ni.2855

37. Zhang J, Mai S, Chen H-M, et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptors in human diseases: an overview of their distribution, function, and potential application for immunotherapies. *J Leukoc Biol*. 2017;102(2):351-360. doi:https://doi.org/10.1189/jlb.5MR1216-534R

38. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2006;203(2):289-295. doi:10.1084/jem.20051986

39. Sivori S, Della Chiesa M, Carlomagno S, et al. Inhibitory Receptors and Checkpoints in Human NK Cells, Implications for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.02156

40. Gray-Owen SD, Blumberg RS. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(6):433-446. doi:10.1038/nri1864

41. Kurioka A, Cosgrove C, Simoni Y, et al. CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 2018;9:486. doi:10.3389/fimmu.2018.00486

42. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren H-G, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med*. 2005;202(7):1001-1012. doi:10.1084/jem.20051143

43. Bryceson YT, Ljunggren H-G, Long EO. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood*. 2009;114(13):2657-2666. doi:10.1182/blood-2009-01-201632

44. Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(Volume 29, 2011):665-705. doi:https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101302

45. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42(4 SPEC. ISS.):501-510. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034

46. Liu S, Galat V, Galat4 Y, Lee YKA, Wainwright D, Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):7. doi:10.1186/s13045-020-01014-w

47. Claus M, Urlaub D, Fasbender F, Watzl C. SLAM family receptors in natural killer cells – Mediators of adhesion, activation and inhibition via cis and trans interactions. *Clin Immunol*. 2019;204:37-42. doi:https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.10.011

48. Chen S, Yang M, Du J, et al. The Self-Specific Activation Receptor SLAM Family Is Critical for NK Cell Education. *Immunity*. 2016;45(2):292-304. doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.013

49. Calpe S, Wang N, Romero X, et al. The SLAM and SAP Gene Families Control Innate and Adaptive Immune Responses. *Adv Immunol*. 2008;97(08):177-250. doi:10.1016/S0065-2776(08)00004-7

50. Farhangnia P, Ghomi SM, Mollazadehghomi S, Nickho H, Akbarpour M, Delbandi A-A. SLAM-family receptors come of age as a potential molecular target in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1174138

51. Veillette A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol Rev*. 2006;214(1):22-34. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00453.x

52. Dragovich MA, Mor A. The SLAM family receptors: Potential therapeutic targets for inflammatory and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2018;17(7):674-682. doi:10.1016/j.autrev.2018.01.018

53. Pérez-Quintero L-A, Roncagalli R, Guo H, Latour S, Davidson D, Veillette A. EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase Cγ, Ca++, and Erk, leading to granule polarization. *J Exp Med*. 2014;211(4):727-742. doi:10.1084/jem.20132038

54. Watzl C, Long EO. Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Curr Protoc Immunol*. 2010;(SUPPL. 90):1-17. doi:10.1002/0471142735.im1109bs35

55. Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol*. 2016;38:45-51. doi:https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.003

56. Chen S, Dong Z. NK cell recognition of hematopoietic cells by SLAM-SAP families. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(5):452-459. doi:10.1038/s41423-019-0222-4

57. Dong Z, Davidson D, Pérez-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(6):974-985. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.023

58. Veillette A. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. doi:10.1101/cshperspect.a002469

59. Morra M, Howie D, Grande MS, et al. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:657-682. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.657

60. Watzl C, Long EO. Natural killer cell inhibitory receptors block actin cytoskeleton-dependent recruitment of 2B4 (CD244) to lipid rafts. *J Exp Med*. 2003;197(1):77-85. doi:10.1084/jem.20020427

61. Stark S, Watzl C. 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol*. 2006;18(2):241-247. doi:10.1093/intimm/dxh358

62. Assarsson E, Kambayashi T, Persson CM, Chambers BJ, Ljunggren H-G. 2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function. *J Immunol*. 2005;175(4):2045-2049. doi:10.4049/jimmunol.175.4.2045

63. Sivori S, Parolini S, Falco M, et al. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol*. 2000;30(3):787-793. doi:10.1002/1521-4141(200003)30:3<787::AID-IMMU787>3.0.CO;2-I

64. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 2006;107(1):159-166. doi:10.1182/blood-2005-04-1351

65. Watzl C, Stebbins CC, Long EO. NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J Immunol*. 2000;165(7):3545-3548. doi:10.4049/jimmunol.165.7.3545

66. McNerney ME, Lee K-M, Kumar V. 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells. *Mol Immunol*. 2005;42(4):489-494. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.032

67. Parolini S, Bottino C, Falco M, et al. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med*. 2000;192(3):337-346. doi:10.1084/jem.192.3.337

68. Sandusky MM, Messmer B, Watzl C. Regulation of 2B4 (CD244)-mediated NK cell activation by ligand-induced receptor modulation. *Eur J Immunol*. 2006;36(12):3268-3276. doi:10.1002/eji.200636146

69. Endt J, Eissmann P, Hoffmann SC, Meinke S, Giese T, Watzl C. Modulation of 2B4 (CD244) activity and regulated SAP expression in human NK cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):193-198. doi:10.1002/eji.200636341

70. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8:1124. doi:10.3389/fimmu.2017.01124

71. Meza Guzman LG, Keating N, Nicholson SE. Natural killer cells: Tumor surveillance and signaling. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):1-33. doi:10.3390/cancers12040952

72. Cruz-Muñoz ME, Valenzuela-Vázquez L, Sánchez-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). doi:10.1002/JLB.MR0618-224RR

73. Kabanova A, Zurli V, Baldari CT. Signals Controlling Lytic Granule Polarization at the Cytotoxic Immune Synapse. *Front Immunol*. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00307

74. Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(3):200-218. doi:10.1038/s41573-019-0052-1

75. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the way to become a natural killer cell. *Front Immunol*. 2019;10(August):1-15. doi:10.3389/fimmu.2019.01812

76. Wang Z, Xiao Y, Guan W, et al. Acute myeloid leukemia immune escape by epigenetic CD48 silencing. *Clin Sci*. 2020;134(2):261-271. doi:10.1042/CS20191170

77. von Wenserski L, Schultheiß C, Bolz S, et al. SLAMF receptors negatively regulate B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia via recruitment of prohibitin-2. *Leukemia*. 2021;35(4):1073-1086. doi:10.1038/s41375-020-01025-z

78. Mou J, Xie L, Xu Y, et al. 2B4 inhibits the apoptosis of natural killer cells through phosphorylated extracellular signal-related kinase/B-cell lymphoma 2 signal pathway. *Cytotherapy*. 2023;25(10):1080-1090. doi:10.1016/j.jcyt.2023.07.002

79. Malaer JD, Marrufo AM, Mathew PA. 2B4 (CD244, SLAMF4) and CS1 (CD319, SLAMF7) in systemic lupus erythematosus and cancer. *Clin Immunol*. 2019;204:50-56. doi:10.1016/j.clim.2018.10.009

80. Hurtado Monroy, R., B. Solano Estrada and PJR d. l. F d. MVV. Leucemia para el médico general. 2012;55(2):11-25.

81. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229-263. doi:10.3322/caac.21834

82. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: Descriptive epidemiology. *BMC Cancer*. 2011;11. doi:10.1186/1471-2407-11-335

83. Social IM del S. *Diagnóstico y Tratamiento Leucemia Linfoblástica Aguda. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica*.; 2018.

84. Pui CH, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(3):185-196.

85. Weiner, M. A., Yamashiro, D. J., Satwani, P., Bhatia, M. & N. *Pediatric Hematology & Oncology Secret*. Second edi. (M., & Neunert C, ed.).; 2024.

86. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2012;2012(1):389-396. doi:10.1182/asheducation.V2012.1.389.3798360

87. C. Layton-Tovar. Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Med e Investig*. 2012;3(1):85-91.

88. González-Casagua MS, Bermeo-Calderón JD, Laverde-Gaona LA, Tafurt-Cardona Y. Carcinógenos ambientales asociados a cáncer infantil. *Univ y Salud*. 2019;21(3):270–276. doi:10.22267/rus.192103.164

89. Sergio Domínguez-Arrevillaga, Jesús Sepúlveda-Delgado, Roberto A. Sánchez-González, Fabiola Y. Zamudio-Castellanos, Flor E. Dávalos-Hernández, Mónica A. Malavar-Guadarrama MGT-V. Prevalencia del virus de Epstein-Barr en niños con leucemia del estado de Chiapas, México. *Hosp Med Clin Manag*. 2020;13:149-153.

90. Popular S. Protocolo de la atención para leucemia linfoblástica. Guía clinica y esquema de tratamiento. *Igarss 2014*. 2014;(1):1-5. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2

91. Pbx A-. Biología molecular y leucemia: E2A-PBX1 y recaída al sistema nervioso central. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53(3):S236-S239.

92. Lassaletta Atienza Á. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integr*. 2008;12(6):551-558.

93. Ramos-Peñafiel CO, Martínez-Tovar A, Olarte-Carrillo I, et al. Experiencia del tratamiento

de la leucemia linfoide aguda en recaída en el Hospital General de México. *Rev Médica del Hosp Gen México*. 2010;73(04):263-267. http://zl.elsevier.es/es/revista/revista-medica-hospital-general-mexico-325/experiencia-tratamiento-leucemia-linfoide-aguda-recaida-hospital-13190309-comunicaciones-breves-2010.

94. Lucero I, Vázquez V, Ernesto M, Muñoz C. Universidad Autónoma del Estado de Morelos Facultad de Medicina 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 : Director de te. 2018.

95. Frohn C, Brand JM, Luhm J, et al. NK cells: A lesson from mismatched hematopoietic transplantation [2] (multiple letters). *Trends Immunol*. 2003;24(1):8-9. doi:10.1016/S1471-4906(02)00002-9

96. Pende D, Marcenaro S, Falco M, 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):3119-3129. doi:10.1182/blood-2008-06-164103

97. Wilson TJ, Garner LI, Metcalfe C, King E, Margraf S, Brown MH. Fine Specificity and Molecular Competition in SLAM Family Receptor Signalling. *PLoS One*. 2014;9(3):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0092184

98. Meinke S, Böhm C, Durlanik S, Watzl C. The activating receptors 2B4 and NTB-A, but not CRACC are subject to ligand-induced down-regulation on human natural killer cells. *Nat Preced*. 2010. doi:10.1038/npre.2010.4917.1

99. Yigit B, Wang N, Hacken E ten, et al. SLAMF6 as a regulator of exhausted CD8+ T cells in cancer. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(9):1485-1496. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0664

100. Ishibashi M, Morita R, Tamura H. Immune Functions of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Molecules in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2). doi:10.3390/cancers13020279

101. Zhao X, Korver W, Prescott N, Abo A, Hsi E. Expression of NTB-A in Normal Tissue, Non-Hodgkin Lymphomas and Investigation of Its Potential Therapeutic Impact for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2006;108(11):4741. doi:10.1182/blood.V108.11.4741.4741

102. 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(3):297-305. doi:10.1038/ni.1693

103. Rouce RH, Shaim H, Sekine T, et al. The TGF-β/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2016;30(4):800-811. doi:10.1038/leu.2015.327

104. Aggarwal N, Swerdlow SH, TenEyck SP, Boyiadzis M, Felgar RE. Natural killer cell (NK) subsets and NK-like T-cell populations in acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(4):349-357. doi:10.1002/cyto.b.21349

105. Pierson BA, Miller JS. 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. *Blood*. 1996;88(6):2279-2287.

106. Romagnani C, Juelke K, Falco M, et al. CD56brightCD16- Killer Ig-Like Receptor- NK

Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation. *J Immunol*. 2007;178:4947-4955. doi:10.4049/jimmunol.178.8.4947

107. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-3151. doi:10.1182/blood.V97.10.3146

108. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010;116(19):3865-3874. doi:10.1182/blood-2010-04-282301

109. Kern F, Ode-Hakim S, Vogt K, Hoflich C, Reinke P, Volk HD. The enigma of CD57+CD28- T cell expansion--anergy or activation? *Clin Exp Immunol*. 1996;104(1):180-184. doi:10.1046/j.1365-2249.1996.d01-635.x

110. Ulvmoen A, Greiff V, Bechensteen AG, Inngjerdingen M. NKG2A discriminates natural killer cells with a suppressed phenotype in pediatric acute leukemia. *J Leukoc Biol*. 2024;115(2):334-343. doi:10.1093/jleuko/qiad112

111. Valenzuela-Vazquez L, Núñez-Enríquez JC, Sánchez-Herrera J, 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):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0227314

112. 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

113. Wang Z, Guan W, Wang M, et al. AML1-ETO inhibits acute myeloid leukemia immune escape by CD48. *Leuk Lymphoma*. 2021;62(4):937-943. doi:10.1080/10428194.2020.1849680

114. Bryceson YT, Long EO. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):344-352. doi:10.1016/j.coi.2008.03.005

115. Elias S, Yamin R, Golomb L, et al. Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014;123(10):1535-1543. doi:10.1182/blood-2013-09-526590

116. Huntington ND, Cursons J, Rautela J. The cancer-natural killer cell immunity cycle. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(8):437-454. doi:10.1038/s41568-020-0272-z

117. Pazina T, James AM, Colby KB, et al. Enhanced SLAMF7 Homotypic Interactions by Elotuzumab Improves NK Cell Killing of Multiple Myeloma. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(10):1633-1646. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0579

118. Colomar-Carando N, Gauthier L, Merli P, et al. Exploiting Natural Killer Cell Engagers to Control Pediatric B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Immunol Res*. 2022;10(3):291-302. doi:10.1158/2326-6066.CIR-21-0843

119. Fenis A, Demaria O, Gauthier L, Vivier E, Narni-Mancinelli E. New immune cell engagers for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2024;24(7):471-486. doi:10.1038/s41577-023-00982-7

120. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*.

2006;107(1):159-166. doi:10.1182/blood-2005-04-1351

121. Page A, Chuvin N, Valladeau-Guilemond J, Depil S. Development of NK cell-based cancer immunotherapies through receptor engineering. *Cell Mol Immunol*. 2024;21(4):315-331. doi:10.1038/s41423-024-01145-x

122. Floros T, Tarhini AA. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon-α2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin Oncol*. 2015;42(4):539-548. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.05.015

123. Pende D, Marcenaro S, Falco M, 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):3119-3129. doi:10.1182/blood-2008-06-164103

124. Meazza R, Falco M, Loiacono F, et al. Phenotypic and Functional Characterization of NK Cells in αβT-Cell and B-Cell Depleted Haplo-HSCT to Cure Pediatric Patients with Acute Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8). doi:10.3390/cancers12082187

125. de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(8):568-579. doi:10.1038/nri2803

126. Gutierrez-Guerrero A, Mancilla-Herrera I, Maravillas-Montero JL, Martinez-Duncker I, Veillette A, Cruz-Munoz ME. SLAMF7 selectively favors degranulation to promote cytotoxicity in human NK cells. *Eur J Immunol*. 2022;52(1):62-74. doi:10.1002/eji.202149406

Cuernavaca, Mor., a 29 de noviembre de 2024

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS

P R E S E N T E

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: **FUNCIÓN Y MODOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES SLAM EN LA CITOTOXICIDAD DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA MEDIADA POR CÉLULAS NK,** que presenta la M.M.M Jacqueline Sánchez Herrera (10024360) para obtener el título de Doctor en Ciencias.

Director de tesis: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
Codirector de tesis: Dr. Juan Carlos Núñez Enríquez
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 Facultad de Medicina-UAEM	APROBADO	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Delia Vanessa López Guerrero Facultad de Nutrición-UAEM	APROBADO	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. José Luis Montiel Hernández FM-UAEM	APROBADO	
Dr. Juan Carlos Núñez Enríquez IMSS	APROBADO	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM	APROBADO	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

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

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2024-11-29 20:00:46 | FIRMANTE

Np5qgZ1peOJA6W7y69c8tZ9panm5WnIq8+pPFHU+P0gihwrx4qyjJAFRzfhYROXcL12cACXNZN41DpT/AVBr75s0viCb3mLfddAwMnPkqsKpYp/e+IU87b94hAPYmE6KC64KcIseqDnPHG2OL3tzavY2zzv8ViVjnjEYIxEVdwq3B5zqOdgEhiZo34a9vgqhwEObqpnFU9zPwfnxevtCKnbNoP0cg3W8niDBSNoIoYSF6hO50Dn4Lx5yWFYlESTqrul1ODZ7EeWtzlNk5+QP0c1P0py0JsoKjdnGInp6d06EymkPvD7Y0fUZddg5nYgyn0faz2HEt1x+utECr0WIFg==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2024-11-29 21:33:18 | FIRMANTE

dlViMneEoHDGQ1JJbXxotFwnLM6sCX+ULZH0djCSpsc9mSXhWF2yDhmvUCZpSEFk4DRPqCNXmjve7FH8khENaYK1D+tvvEMZoCjIfKjsajyFSAX8nzkdi21iGXGgNFBWCJ5MXZV1i8dOctJr+mZa7rO43A6LElJCvDB6aLydfivXStMRGbbtxzMizq4wUm3PLrtcNMrrMgjboGK9YAA0Wcd0+YkX7q8LZ+Guyx53/GA9DH8V6ykdrLHv7kmU9aZwATEJbuy2pqe/m33Sl7FgZeD4O7vqmrcoNAMi5ivH6jCQbYMfnarXejmXLfIQhJFTvUxeXU/hr4L7jzd0W50Tjw==

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2024-11-30 10:34:10 | FIRMANTE

YTW61cmH2mTd9IR5Zzbu+jFQUKd9dWUWyt0NCa1aFXyAkHCsjqDcNlGLclRK6wN72kj8MMdM46NjVWcnkL37OBDC9m/yOObHYrHnvlAsZUHnqQW3QFtSA5TLK+Ywdw2x4IYZZ4f41lPcTOqpB6ggK03VDphyE/Fc3xspK3LveKddUrdAv/2vhnqt897BH4QqRgFZxmiA+ZPna2nnrTs/LQf9MeBz6ho2qDm8bsp7FgCAo1mk9PyuDYbOG3xvJClOcwxOKbKXnCOZZhEh+YczimMKpWFP2aeHUNnkMmC7oZyjcbMKYQyzm1+xg3evSZiZ3/cxWA17Vky/RjA+y7YeLQ==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2024-12-01 22:10:51 | FIRMANTE

fV4CCrTbcgj4LFVoWZ2szieR12cHApuHA+n59ty107iqWlcPQQ6wGITW5Pw8xgVqjfJYaf3h1uZOf0XM050IciNo47zqWqsl+S2mscYPcWJ9prfbT3tCz+06brnpczKLw5e5Bn6LVT4Ro9FRdSYpRGXi7AF1cHle7XTz5gykc2eYct0CDSAMJgc69Q1WKnq29woBJBbcf781nXqklLoEDzlDkkEgizgLjkgq0qdEnPqT7OPhGG7aWvEQ/b841keXlLwDmQ+NP8iq6fLjLqApIsKFNFsrZYfHU/v1Ia9tEE69bGL1alJEmaMlWF8VMov4VA8ecoSqaf6lK2uWkDfcHg==

JUAN CARLOS NUÑEZ ENRÍQUEZ | Fecha:2024-12-02 09:30:56 | FIRMANTE

A8LxQNHP09uklAM8wWMI4QRgWOHtF9a9CNtqgxjPu6bD+7tP575ifMSZb2i+D00r//FhO0WQb1JwrJTjT+8W1tbSURDOHGi1tvc1921Qa4GeRizT3hs+8+XPmVy7dVYy5ZNgLkAL7Wf/Cs2maRHlzX/t4Q8dbWf5EJUrwyHsjs9MpXw9nFHfEGKQuipUGnGfBuC+6jtnXmG+gf/3U0/vwF04t5RzuGbKsVlQtK4Zb+tIYZllWqkz1XWU3oPbrtV/YlVcu0sku1H/MsMMPOOKusHVvhAogkjBSBQ6+30H9h5rvP7lagECcE56SsXa2MGrY3JlQ1vBBWtJZnRk/wSy7A==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2024-12-03 10:00:05 | FIRMANTE

KzfAWKU+jfKQdENi1arbyRp9zs7IuNaHzxMp6M9BPbUJk+S4Y0VclYdugt8phH9RUwC4YlJFpTX6JJKEvyKhk6PMcwIlTGCQZ7dRvOD6oi7Y+jpNNGVWTsN88Dc8UmPe4RvxmxhXcHMDEx7ZHrPJpLMmPaiItpDDvyEXJ+o/pVrS88HIpwqjozswBiDX22Uadj6tbzOyBkGpp/OHDSt+w9x4hQQdcBeqLe4MFQ+jS4LIkyUDqRPRk+V7HOu8YGpBveJtwarAKpOvE4SRuKADOd52cRupsj6JdX7NHBlznCz9Fy98k1ZGW5XSvv0UXk6KqnMTd4nEt0a2nqElMADCsw==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2024-12-03 12:03:50 | FIRMANTE

dNANwhd518GXc9Ia78rV8CLHAUbHl0LnFy2RDdX+TzWIAh1B2LEVtOF/RrulpDsuETkCM9wvJFwcFHUJYofwCCAKgo76KggE8lqgzFZUM8Q+4qHy+LezE2j7q52AKGKgfm7cu2Kl9uDUPQQpyRvB//7wiKePL5cw2TBbwLGFLD3YIbVqlesYMY3ZMHiQmz91/keOAZoM7lXqYSUImBttge5KDEohePwawZv/m8vfjqughrXHD3R3VBHncEudxHTNivNzzLwMWVIeoioH5O7unXqWKs4Yp8rGAGl2ctkkumWbcw4pJPLN8XfMItCWEvZQk1K21jz4B2Mrc5g2FjP90A==

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

kBrUqAXi8

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ShP9KNeajRqhaaDD7VBLbNbWAngOzTPz