

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLÉCULAR

**Papel de las células NK CRTAM⁺ de la médula ósea en la
leucemia linfoblástica aguda (LLA)**

T E S I S

Que presenta

SANDRA PADILLA CASTAÑEDA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de Tesis:

DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO. UIMEO CMN SIGLO XXI

DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE. CINVESTAV

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS y en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rosana Pelayo, IMSS y del Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Cinvestav.

El autor de este trabajo está adscrito al Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y fue apoyado con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante la realización del mismo, con número de CVU 707981 y con número de becario 589969, fue parte del programa de investigación en salud del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de matrícula 99097176.

Agradecimientos

A mi familia, padres y hermanos, por todo el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida, por los consejos, regaños y motivaciones. A Samuel por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por los consejos académicos y personales, por amenizar y disfrutar juntos tantos momentos en el laboratorio. Especialmente a Dalia por las largas horas de arduo trabajo y asesoramiento.

A mis amigos en general por ser parte importante de mi vida y poder contar con ellos a pesar del tiempo y distancia.

A mis tutores, Dra. Rosana Pelayo y Dr. Vianney Ortiz, por el asesoramiento académico y la motivación.

Al apoyo económico recibido por parte de CONACYT, con número de becario 589969 y al programa de investigación en salud del IMSS con número de matrícula 99097176.

Índice general

Índice general	3
Índice de imágenes y figuras	5
Abreviaturas	6
Resumen	8
Abstract	9
1 Introducción	10
1.1 Respuesta antitumoral	11
1.2 Células NK	12
2 Antecedentes	15
2.1 Inmunovigilancia antitumoral por células NK.....	15
2.2 Desarrollo de células NK.....	16
2.3 Poblaciones NK emergentes como resultado de la señalización por ligandos de TLR	17
2.3.1 IKDC	17
2.3.2 NK reguladoras	17
2.3.3 Células NK CD11c+	18
2.4 CRTAM y activación linfocitaria.....	19
2.5 CRTAM y cáncer	21
3 Justificación	22
4 Hipótesis	23
5 Objetivos	24
5.1 General	24
5.2 Particulares	24

6 Material y Métodos	25
6.1 Recolección de muestras y obtención de células mononucleares.	25
6.2 Citometría de flujo.	25
6.3 Detección de CRTAM en células NK.....	25
6.4 Aislamiento de células NK.....	26
6.5 Ensayo de citotoxicidad.....	26
6.6 Detección intracelular de IFNg.	27
6.7 Co-cultivos con células estromales.	27
6.8 Detección de Necl-2 por PCR.	28
6.9 Detección intracelular de IL10.....	28
7 Resultados	29
7.1 Caracterización funcional de células NK CRTAM+ de sangre periférica... 29	
7.2 CRTAM y el desarrollo hematopoyético temprano de células NK..... 30	
7.3 Compromiso funcional de células NK y expresión de CRTAM..... 33	
7.4 CRTAM en células NK y NKT de pacientes leucémicos. 35	
7.5 Novedosa subpoblación de células NK supresoras en la médula ósea leucémica	36
7.6 El microambiente tumoral y la activación de linaje NK..... 37	
8 Discusión de resultados	41
9 Conclusiones	45
10 Perspectivas	46
11 Modelo propuesto	47
12 Referencias	48

Índice de imágenes y figuras

Figura 1. Comparación de las tasas de incidencia por edad de leucemia infantil en la Ciudad de México (2006-2007).....	10
Figura 2. Subtipos de células NK.	12
Figura 3. Papel de células NK en la inmunovigilancia anti tumoral.	15
Figura 4. Desarrollo de células NK humanas.	16
Figura 5. Las células NK CRTAM+ de sangre periférica producen interferón y poseen capacidad citotóxica.	29
Figura 6. La molécula de activación CRTAM se expresa abundantemente en precursores hematopoyéticos comprometidos a linaje.	31
Figura 7. CRTAM se expresa en precursores comprometidos a linaje linfóide pero no en células terminalmente diferenciadas.	33
Figura 8. La expresión de CRTAM aparentemente es mayor en células NK que expresan abundantemente CD56.....	34
Figura 9. Las células NK y NKT de la médula ósea en Leucemia Linfoblástica Aguda están aparentemente preactivadas y muestran una expresión relativamente alta de CRTAM.	36
Figura 10. Sistemas de co-cultivo de células estromales mesenquimales y células mononucleares.....	37
Figura 11. La expresión de CRTAM en las células NK y NKT en LLA es favorecida por el estroma proveniente de médula ósea leucémica	38
Figura 12. Los nichos estromales potenciales para la diferenciación del linaje NK expresan Necl-2	39
Figura 13. Las células NK CRTAM+ de médula ósea leucémica producen IL-10	40

Abreviaturas

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
APC	Aloficocianina
BFA	Brefeldina A
CMP	Progenitor Mieloide Común
CO₂	Dióxido de Carbono
CRTAM	Molécula asociada a células T restringidas a MHC de clase I
CTL	Linfocito T Citotóxico
CTV	Colorante Violeta Para Monitoreo Celular
DC	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DS	Desviación Estándar
ELP	Progenitor Linfoide Temprano
FITC	Isotiocianato De Fluoresceína
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HSPC	Células Troncales Y Progenitoras Hematopoyéticas
IFN-γ	Interferón Gamma
IKDC	Células Dendríticas Asesinas Productoras De Interferón Gamma
IL	Interleucina
ILC	Células Linfoides Innatas
kDa	Kilodalton
Lin-	Linaje Negativo
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MDP	Progenitor De Monocitos Y Células Dendríticas

MHC I	Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I
MHC II	Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II
MLP	Progenitor Linfoide Multipotente
MNC	Células Mononucleares
MO	Médula Ósea
MPP	Progenitor Multipotente
NK	Células Asesinas Naturales
NKG2D	Receptor Activador De Células NK
NKT	Células Asesinas Naturales Tímicas
pDC	Células Dendríticas Plasmocitoides
PE	Ficoeritrina
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medio
SCU	Sangre De Cordón Umbilical
SFB	Suero Fetal Bovino
SP	Sangre Periférica
SPM	Sangre Periférica Movilizada
TIL	Linfocitos Infiltrantes de tumor
TLR	Receptor Tipo Toll
TNF-α	Factor De Necrosis Tumoral
Treg	Células T Reguladoras
α-MEM	Medio Mínimo Esencial Alfa

Resumen

La creciente evidencia de heterogeneidad clínica, biológica y molecular ha modificado la perspectiva reduccionista de la patobiología del cáncer, hacia la de un sistema complejo, dinámico e interactivo entre la genética tumoral y su entorno microambiental, macroambiental e inmunológico. Debido a sus crecientes tasas de morbi-mortalidad, las neoplasias infantiles han sido definidas como una prioridad biomédica global. Notablemente, las leucemias linfoblásticas agudas constituyen el grupo de mayor incidencia en México y el mundo, en donde la mayor frecuencia de evolución desfavorable es documentada en población hispana. Tanto el control de la emergencia de clonas malignas, como la subsecuente competencia poblacional normal-leucémica y el restablecimiento de la hematopoyesis normal, requieren de mecanismos de vigilancia anti-tumoral. La investigación de células innatas con actividad antitumoral puede ser fundamental para comprender los mecanismos biológicos que contribuyen a la regulación de la progresión o recaída de la enfermedad, e idealmente, contribuir al desplazamiento de la hematopoyesis leucémica por normal. En este trabajo fue investigada la expresión de CRTAM a lo largo de la vía de diferenciación temprana linfoide, identificando una población precursora que co-expresa CD34, CD56 y CRTAM y que posiblemente resida en nichos especializados que expresan Necl-2. Por otro lado, la médula ósea de pacientes con leucemia linfoblástica aguda reveló un alto contenido de células NK pre-activadas CD56^{high} que expresan CRTAM y tienen la capacidad funcional de producir IL-10 *in vitro*, sugiriendo un posible papel regulador de la respuesta anti-tumoral que favorece la progresión tumoral. La identidad fenotípica y funcional de esta población NK presumiblemente supresora en la médula ósea leucémica sería de especial interés para el entendimiento de la patobiología de la LLA.

Abstract

Increasing evidence of clinical, biological and molecular heterogeneity has modified the reductionist perspective of cancer pathobiology, towards a complex, dynamic and interactive system between tumor genetics and its micro, macro and immunological environment. Due to their increasing rates of morbidity and mortality, childhood neoplasms have been defined as a global biomedical priority. Notably, acute lymphoblastic leukemias constitute the group with the highest incidence in Mexico and worldwide, where the highest frequency of unfavorable evolution is documented in the Hispanic population. Both, the control of the malignant clones emergence, as well as the subsequent normal-leukemic population competition and the reestablishment of normal hematopoiesis, require antitumor monitoring mechanisms. Investigation of innate cells with antitumor activity may be critical to understand the biological mechanisms that contribute to the regulation of disease progression or relapse, and ideally, the contribution to displacement of leukemic hematopoiesis by the normal hematopoiesis.

In this research work, the expression of CRTAM along the lymphoid early differentiation pathway was investigated, identifying a precursor population that co-expresses CD34, CD56 and CRTAM and possibly resides in specialized niches that express Necl-2 ligand. On the other hand, bone marrow from patients with acute lymphoblastic leukemia revealed a high content of CD56^{high} pre-activated NK cells expressing CRTAM endowed with the functional capability of producing IL-10 *in vitro*, suggesting a regulating role which favors tumor progression at expense of anti-tumor responses. The phenotypic and functional identity of this unique NK population, presumably suppressor, in the leukemic bone marrow would be of special interest for the understanding of the pathobiology of ALL.

1 Introducción

El cáncer constituye una de las principales causas de mortalidad infantil a nivel mundial, siendo las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) las neoplasias de mayor frecuencia, con cerca del 85% de los casos. En México esta patología representa la segunda causa de muerte en el grupo de 5 a 14 años, cuya mayor tasa de incidencia anual la presenta el grupo de 1 a 4 años y los principales picos de la enfermedad son entre 2-6 años y 8-10 años (Figura 1). Notablemente, en los Estados Unidos, su alta incidencia en población pediátrica Hispana alcanza cerca de 40 casos por millón. [1, 2]

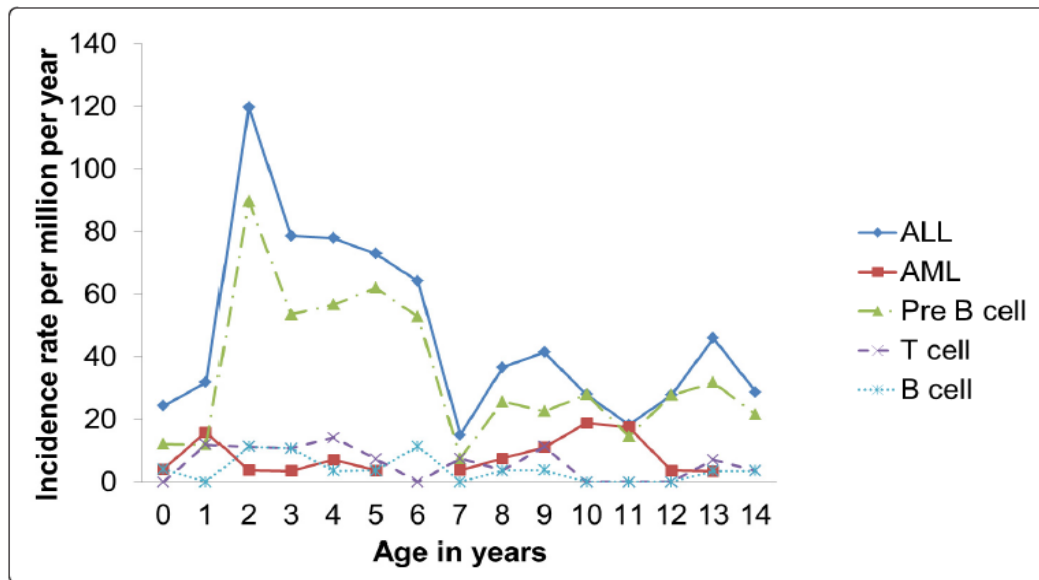


Figura 1. Comparación de las tasas de incidencia por edad de leucemia infantil en la Ciudad de México (2006-2007). Tomado de Pérez-Saldívar et al. 2011.

Este padecimiento es caracterizado por la proliferación oligoclonal descontrolada de precursores linfoides, mayoritariamente de estirpe B, en la medula ósea (MO).[3] Sus manifestaciones clínicas incluyen astenia, adinamia, fiebre, síndrome anémico, sangrado, dolor óseo, hepato y esplenomegalia, en tanto el diagnóstico integral se basa en datos clínicos, pruebas de laboratorio,

aspirado de medula ósea, inmunofenotipo y cariotipo. El tratamiento general consiste de tres fases, una de remisión o inducción, otra de intensificación o consolidación y una tercera de mantenimiento donde se continua tratamiento para eliminar enfermedad mínima residual.[4] Tanto el origen, como la progresión de este padecimiento resultan de la aparente cooperación de factores múltiples que actúan en red, incluyendo los factores genéticos, microambientales, macroambientales e inmunológicos. Se estima que, a pesar de las alternativas terapéuticas de alta eficiencia, las recaídas ocurren en aproximadamente en el 20 a 30% de los casos debido a Enfermedad Mínima Residual y a una falla en los mecanismos de vigilancia anti-tumoral mediada por células de la respuesta inmune.[5]

1.1 Respuesta antitumoral

Entre otras funciones cruciales, el sistema inmune previene la emergencia tumoral vía la identificación y eliminación constante de crecimientos incipientes. Aunque los mecanismos están en creciente investigación, de forma general su participación es a tres niveles: primero, en la protección al hospedero de infecciones virales que pueden inducir tumores, como es el caso del Virus del Papiloma Humano; segundo, al resolver procesos inflamatorios rápida y oportunamente, previniendo que se establezca un microambiente inflamatorio que promueva la tumorigénesis; y tercero, en la eliminación directa de células tumorales por células del sistema inmune que las reconocen en base a la expresión de antígenos tumorales específicos o a moléculas inducidas por estrés celular.[6]

Las células del sistema inmune tanto innato como adaptativo pueden prevenir el desarrollo de neoplasias en un proceso denominado inmunovigilancia. Dentro de las células innatas están los monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC, dendritic cells) y las células asesinas naturales (NK, natural killer), estas células se encargan de la respuesta temprana mediada por la liberación de citocinas que lisan células tumorales o capturando restos de células

tumorales. Las células adaptativas incluyen a los Linfocitos T y B, los cuales median la respuesta a largo plazo, dicha respuesta es antígeno específica y de memoria.[7]

1.2 Células NK

Las células NK son linfocitos innatos que juegan un importante papel en la vigilancia antitumoral. En humanos, las células NK se definen como una población de linfocitos $CD3^+CD56^+$ que comprende entre 5 y 20% de linfocitos en sangre periférica. El compartimiento NK puede dividirse en dos sub-poblaciones principales de acuerdo con la expresión de CD56 y CD16: la sub-población $CD56^{dim}CD16^+$ o citotóxica, que predomina en sangre (95% de NK) y sitios de inflamación, posee un alto potencial citotóxico y generalmente expresa receptores inhibitorios. En contraste, la sub-población $CD56^{bright}CD16^-$ o reguladora predomina en ganglios linfoides, produce citocinas tras la activación y muestra menor capacidad citotóxica.[8-10]

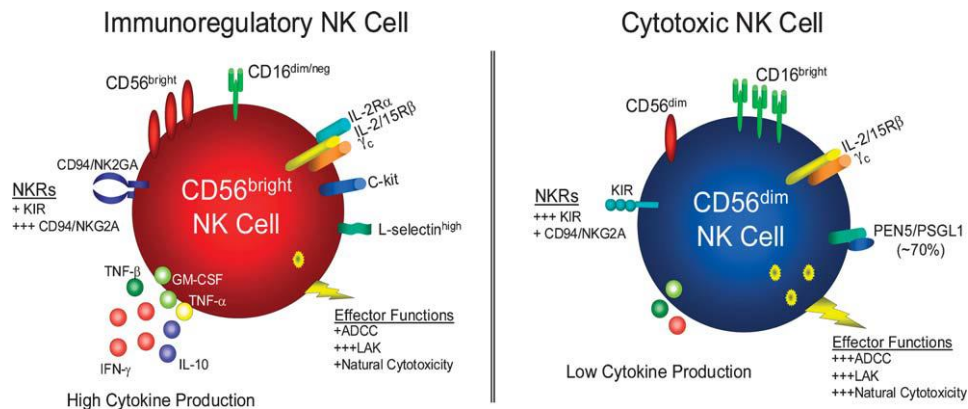


Figura 2. Subtipos de células NK. Las células NK $CD56^{bright}$ son predominantemente inmunoreguladoras, producen altos niveles de citocinas tras ser estimuladas con citocinas de monocitos, tienen baja expresión de CD16 y disminuida actividad citotóxica. Las células $CD56^{dim}$ son esencialmente citotóxicas, producen bajos niveles de citocinas tras ser estimuladas. Tomado de Cooper MA et al. 2001.

Las células NK adquieren actividad citotóxica después de su activación, y ésta se debe a la exocitosis de gránulos que contienen perforinas y granzimas

que perforan y propician la apoptosis de las células, además tiene la capacidad de secretar varias citocinas y quimiocinas como el $IFN\gamma$ (interferón gamma), $TNF\alpha$ (factor de necrosis tumoral), GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagos), MIP-1a (proteína inflamatoria de macrófagos 1a) y RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted). Las células NK son consideradas la principal fuente de $IFN\gamma$ *in vivo*. [11]

Gran parte del conocimiento acerca de la biología de las células NK proviene del ratón, especie en la que este linaje no expresa CD56, pero expresa NK1.1 o DX.-5 y es subclasificado en tres grupos acorde a la expresión de CD27 y CD11b: las $CD11b^{dull}CD27^+$, que predominan en médula ósea y ganglios linfáticos, las $CD11b^+CD27^{dull}$, abundantes en sangre, bazo, pulmón y riñón, y las $CD11b^+CD27^+$, distribuidas homogéneamente. Tanto las NK humanas como las murinas comparten el receptor NKp46 y sus funciones son equiparables. [9, 11]

Las células NK están dotadas en su superficie de dos tipos funcionalmente diferentes de receptores, activadores e inhibidores, que les permiten distinguir células sanas de su contraparte maligna. El primero de estos tipos reconoce moléculas altamente expresadas en células tumorales o infectadas por virus y transmite señales de activación que estimulan la citotoxicidad de la NK. El otro tipo reconoce moléculas expresadas en células normales y transmite señales inhibitorias para proteger a las células normales del ataque de células NK. Existen receptores inhibitorios específicos para moléculas MHC-I clásicas o no clásicas que se encuentran expresados en células normales. La lisis tumoral mediada por células NK puede estar marcada por la baja expresión de MHC-I en células malignas, lo cual aparentemente las protege del reconocimiento por parte de los linfocitos T, pero las hace susceptibles al ataque de las células NK. La interacción entre los receptores de activación de NK y sus ligandos es crucial. [12]

Adicionalmente, las células NK expresan moléculas de adhesión que facilitan la interacción entre las células NK y su célula blanco, contribuyendo a la lisis tumoral. Diversos receptores de NK que regulan la adhesión y activación celular a través de la interacción con ligandos de nectina o tipo nectina (Nect) han

sido recientemente reportados. Algunos de ellos son CD226, CD96 y CRTAM (class-I restricted T cell-associated molecule).[13] CD226 inicialmente descrito como un antígeno de activación específico de linaje T involucrado en la diferenciación de linfocitos citotóxicos, del cual posteriormente se descubrió el papel en la adhesión de plaquetas al endotelio y fue denominado DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1). Esta molécula de adhesión y receptor blanco de linfocitos T citotóxicos y células NK es un potente inductor de citotoxicidad. Dos miembros de la familia Nectin/Necl, Necl-5 y nectin-2, se han descrito como sus ligandos. CD226 tiene un papel en la migración transendotelial, facilitando la adhesión al endotelio y la migración a través de las uniones celulares. CD96 (también conocido como Tactile: T cell activation, increased late expression) fue identificado como un receptor específico de células T que es expresado después de la activación, es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) con tres dominios tipo Ig, expresado en linfocitos T y células NK activadas. Se ha identificado a Necl-5 como su ligando. CD96 juega un papel importante en la adhesión célula-célula que promueve la citotoxicidad de las NK.[13], mientras que CRTAM, cuyo ligando es Necl-2, es un receptor de la superfamilia de las Ig que contiene dos dominios Ig en su porción extracelular y presenta baja homología a CD226, CD96 y miembros de la familia Necl/nectin.

2 Antecedentes

2.1 Inmunovigilancia antitumoral por células NK

Las células NK tienen funciones particulares en la eliminación de tumores, inicialmente reconocen a las células malignas a través de señales de estrés o peligro, generalmente las células tumorales disminuyen la expresión de MHC I, que afecta el reconocimiento de lo propio por parte de las células NK. La célula NK activada puede eliminar a células tumorales a través de cuatro mecanismos:

- Citotoxicidad por liberación de gránulos citoplasmáticos que contienen perforinas y granzimas.
- Apoptosis inducida por receptores de muerte como FasL, TRAIL, TNF α .
- Producción de moléculas efectoras como NO e IFN γ .
- ADCC, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.

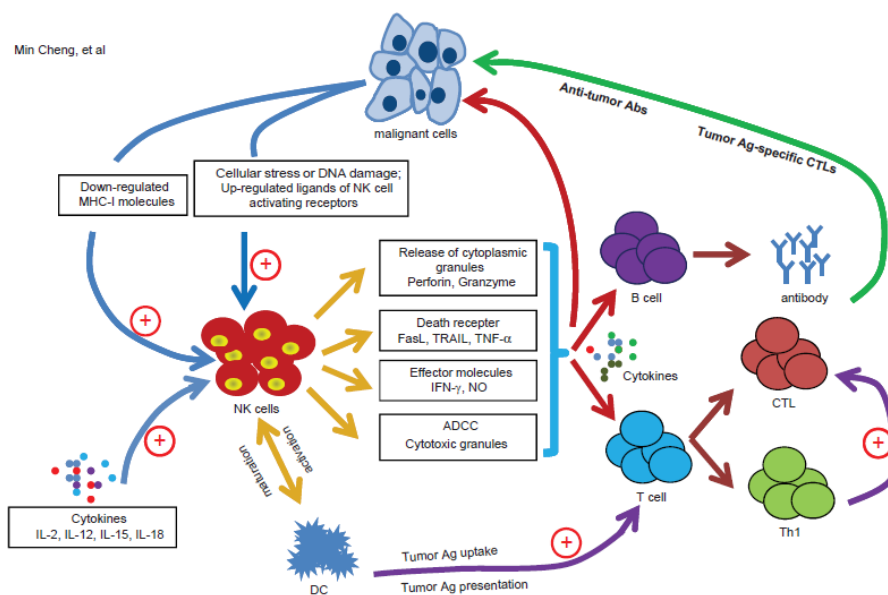


Figura 3. Papel de células NK en la inmunovigilancia anti tumoral. Eliminación de células tumorales de manera directa o indirecta por células NK. Tomado de Cheng, M., et al 2013.

La interacción recíproca entre células NK y células dendríticas mejora la captación y presentación de antígeno de éstas últimas, que facilita la generación

de linfocitos T citotóxicos, misma que es facilitada por el $IFN\gamma$ producido por las células NK. También promueven la diferenciación de Linfocitos T CD4 hacia un perfil Th1.[7]

2.2 Desarrollo de células NK

El desarrollo de células NK ocurre principalmente en el microambiente de la médula ósea. Las células progenitoras hematopoyéticas se convierten en células progenitoras multipotentes (MPP), un progenitor linfoide común emerge de estas células, que se desarrolla en primer lugar en una célula NK precursora, luego a una NK inmadura y finalmente a una NK madura. Las células NK precursoras son incapaces de diferenciarse en células T, B, mieloides o eritroides, sin embargo, los timocitos CD4-CD8 de fase temprana pueden diferenciarse en células NK. En seres humanos, hay varias etapas para desarrollo de NK en médula ósea, que se basan en los niveles de expresión de CD34, CD117, CD56 y CD94. Estos fenotipos están restringidos a la médula ósea y no se encuentran en los ganglios linfáticos, bazo o sangre periférica. La maduración de NK comienza con la expresión de CD56 seguido por la expresión simultánea de CD94/NKG2A, la maduración final en médula ósea se correlaciona con una disminución de CD94/NKG2A y CD56^{low}. [14, 15]

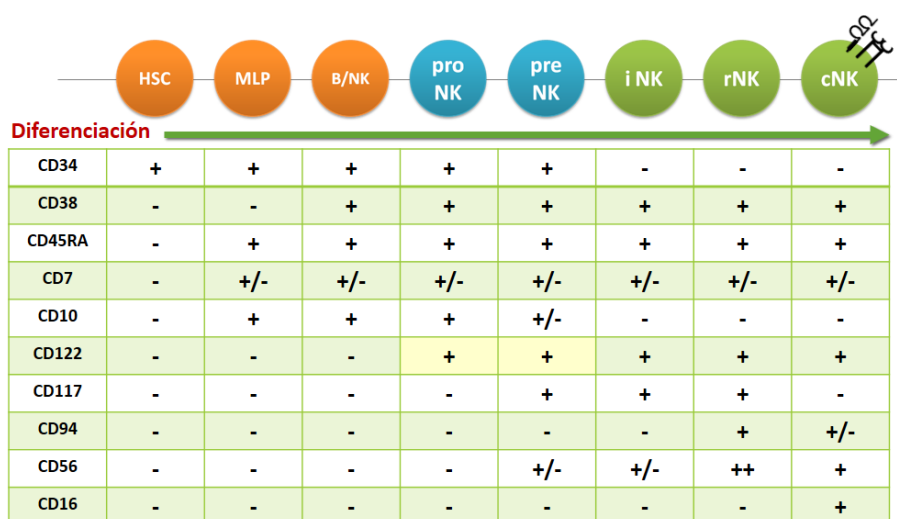


Figura 4. Desarrollo de células NK humanas. Compartido por Vadillo E.

Para el desarrollo de células NK a partir de precursores comunes es importante la expresión del receptor beta de IL-2/15 (CD122). Las células NK precursoras se caracterizan en humanos como CD34+ CD122+ CD56- que responden a IL-15 y participan en la iniciación del proceso de maduración final. La interacción con células estromales también es necesaria para el desarrollo normal de NK, sobre todo determinadas citocinas (IL-7, IL-15) y factores de crecimiento producidos por ellas, como el ligando c-kit y el ligando flt-3.[16]

2.3 Poblaciones NK emergentes como resultado de la señalización por ligandos de TLR

La hematopoyesis emergente se define como la producción de células hematopoyéticas funcionales en condiciones no homeostáticas, tales como condiciones pro-inflamatorias o de estrés biológico. Dicha hematopoyesis emergente está regulada a nivel de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC). Actualmente sabemos que la diferenciación temprana de las HSC puede estar influenciada por microorganismos y/o sus productos.[17, 18]

En ratones, el reconocimiento de patógenos a través de los TLRs y la resultante liberación de citocinas inducen la expansión de HSC e instruye a un compromiso de diferenciación para el desarrollo inmediato de células innatas.[17] El estímulo de las células HSPC a través de TLR2 y TLR4 promueve el compromiso hematopoyético hacia la producción de células mieloides, mientras que la estimulación del TLR9 en progenitores linfoides comunes (CLP) induce un bloqueo en la diferenciación de células B, al tiempo que promueve el desarrollo de las células dendríticas convencionales (cDC), células dendríticas plasmocitoides (pDC) y células dendríticas asesinas productoras de IFN γ (IKDC).[19, 20] En humanos, los hallazgos se relacionan con el fortalecimiento de la producción de las células de linaje mieloides bajo escenarios emergentes. La ligación del TLR9 en células progenitoras adultas de la médula ósea induce el

rápido desarrollo de las células NK mediante el uso de mecanismos que involucran la regulación del receptor IL-15R.[21]

2.3.1 IKDC: Las células dendríticas asesinas y productoras de interferón (del inglés interferon killer dendritic cells) son una población descrita en ratón, con características biológicas compartidas entre células NK y células dendríticas (DC), con una extraordinaria capacidad de producir IFN γ , interferones tipo 1 e IL-2, dependiendo del estímulo de activación. Cuando éstas son estimuladas con ligandos de TLR-9, las IKDC eliminan a sus blancos tumorales usando receptores de activación similares a los de células NK convencionales, pero cuando disminuye la capacidad citolítica de estas células adquieren discreta capacidad presentadora de antígenos de manera similar a las DC, en asociación con un aumento de la expresión de moléculas del MHC II en superficie. Notablemente, exhiben un elevado potencial migratorio.[22, 23] , lo que en adición a sus otras propiedades, les ha identificado como sensores y efectores esenciales de la respuesta inmune antitumoral[24, 25], aunque su existencia e identidad en el humano no ha sido reportada.

2.3.2 NK reguladoras: Al estudiar el potencial regulador de las células linfoides innatas (ILC), Crome S.Q. y colaboradores identificaron una población de ILC con fenotipo CD56+CD3-, que posee baja capacidad citotóxica, es productora de IL-22 y aunque exhibe un perfil de expresión similar a NK, esta población inhibe a los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), debido a que suprime su expansión a la vez que altera la producción de citocinas.[26]

Por otro lado, una interesante población de células NK con propiedades supresoras, caracterizada por producir IL-10 y TGF β ha sido también recientemente descrita, aunque su identidad y participación en procesos normales o patológicos han sido poco estudiados.[27] La abundancia de un tipo celular NK semejante, con fenotipo HLA-G+ IL-10+ TGF β + en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama ha sido notable, y por tanto el interés en su posible papel perjudicial en la inmunidad antitumoral.[28]

2.3.3 Células NK CD11c+: Hallazgos del laboratorio sugieren que en respuesta al Extracto de Dializable de Leucocitos Humanos (DLE), las células troncales y progenitoras humanas contribuyen a la producción emergente de un subgrupo especial de células NK CD11c+ que poseen propiedades como producción de IFN γ , citotoxicidad de células tumorales y capacidad de inducción de la proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$. [29]

2.4 CRTAM y activación linfocitaria

CRTAM (Class I Restricted T Cell Associated Molecule) es una proteína transmembranal tipo inmunoglobulina descrita originalmente en células NK, NKT y CD8 activadas, de ahí el nombre de molécula restringida a células MHC clase I [13, 30] Ésta también se ha reportado en un subgrupo de linfocitos CD4+ activados, en el que contribuye a la producción de IFN γ , IL-17 e IL-22 [31]; además de conferirles un perfil citotóxico observado como una mayor expresión del factor de transcripción Eomes y mayor producción de granzima B comparado con los linfocitos CD4 que no expresan CRTAM [32].

La expresión de CRTAM es transitoria y la elevación de su transcrito da inicio aproximadamente 4h después de la activación, con un pico máximo de expresión en membrana entre 12 y 24h, y su declive a las 48h. [30, 33] Su transcrito también se ha detectado en tejidos que no forman parte del sistema inmunológico, particularmente en cerebelo, especialmente en neuronas de Purkinje, en cuyo caso el papel biológico continúa en investigación. [34]

Como ligando de CRTAM se ha identificado a Necl-2. [33, 35] Tanto receptor como ligando son ampliamente conservados entre humano y ratón. Se han descrito dos fenómenos importantes regulados por la interacción entre CRTAM y Necl2: la regulación de la producción de citocinas en linfocitos T CD4 y la retención de linfocitos T CD8 en nódulos linfáticos para una eficiente proliferación y respuesta ante patógenos. [31, 36]

Se conoce que CRTAM se expresa en células epiteliales a lo largo de la membrana lateral y es de relativa importancia para las interacciones célula-célula o célula-sustrato. También se expresa durante la ontogenia de los linfocitos T, cuya expresión es constitutiva en timocitos maduros y variable en diferentes estadios de desarrollo, restringiéndose a CD8+ y células doble negativas CD4-CD8-.[37, 38] Por otro lado, en la ontogenia del Linfocito B, aparentemente solo está presente en las etapas maduras y no durante el desarrollo [39]. También se expresa en neutrófilos y eosinófilos de pacientes con asma, al contrario que los controles sanos.[40]

Su expresión y actividad biológica en la vía de diferenciación de las células innatas de origen linfoide, como las NK, no ha sido analizado. Estudios realizados por Arase y colaboradores determinaron que, en condiciones basales, las células NK no expresan CRTAM pero que es inducido tras un estímulo con anti-NKR-P1C. La cinética de expresión de CRTAM en NK establece un punto máximo de expresión entre 6-12 horas tras la activación, seguido a las 24 horas de un declive y a las 48 horas de su desaparición. La cinética de la proteína y el transcrito es paralela, indicando que la regulación de su expresión es a nivel transcripcional. El factor de transcripción AP-1 es el responsable de la transcripción de CRTAM ante la estimulación de las células del sistema inmune[41]. Además, se ha identificado a Zeb1 como un represor transcripcional de esta molécula en los linfocitos T [42].

Los eventos de señalización que ocurren río abajo de CRTAM aún no están esclarecidos. Se conoce que CRTAM contiene un motivo de unión a PDZ que posiblemente interactúa con proteínas que contengan dicho motivo, a través de las cuales CRTAM pudiera conectarse con el citoesqueleto de actina. Además, se ha sugerido que CRTAM coordina un complejo de señalización en un subgrupo de linfocitos T CD4+ vía la proteína de polarización Scrib.[31, 41].

2.5 CRTAM y cáncer

La interacción CRTAM-Necl-2 se ha demostrado en ensayos de unión y adhesión en linfocitos T CD8+ y células NK. La interacción de CRTAM expresada en NK, con su ligando Necl-2 expresado en células tumorales, promueve la citotoxicidad mediada por las células NK. En CD8+ la interacción de CRTAM-Necl-2 favorece la secreción de IFN γ durante la estimulación de las células T con un antígeno específico.[30, 43]

La interacción heterotípica CRTAM-Necl-2 es más frecuente que la interacción homotípica.[35] Necl-2 es codificada por el gen TSLC1 (tumor suppressor in lung cancer-1) y media las uniones celulares homotípicas o heterotípicas con otras nectinas o Necl. Si este gen es silenciado puede favorecerse el desarrollo tumoral, lo que ha sido demostrado ocurre en carcinoma de pulmón. Boles K. y colaboradores observaron tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* que las células malignas que expresan Necl-2 son preferentemente eliminadas por células NK CRTAM+.[43]

La existencia de una subpoblación de células de linaje NK cuya expresión de CRTAM marque su capacidad efectora anti-leucémica, es incierta. Su investigación podría dar luz a los mecanismos de vigilancia inmunológica durante la competencia normal-leucémica, o en un escenario opuesto, a conocer la identidad de subtipos linfoides NK que promuevan la progresión tumoral a través de la regulación de células efectoras del sistema inmune, y contribuir a predecir estados que comprometan la reconstitución hematopoyética normal y permitan la evolución maligna.

3 Justificación

Las células NK son linfocitos innatos crucialmente implicados en la defensa inmunológica contra tumores.

CRTAM es una molécula expresada por células NK activadas que presumiblemente contribuye a su actividad citotóxica en condiciones no patológicas.

La dinámica de expresión de CRTAM durante la diferenciación linfoide en la médula ósea puede ser determinante para la respuesta temprana contra tumores de origen hematopoyético, como la leucemia linfoblástica aguda, cuya progresión sería inversamente proporcional a una actividad NK citotóxica.

4 Hipótesis

En la diferenciación de las células NK en medula ósea se observa la población NK CRTAM+ con actividad anti-tumoral pero en la leucemia linfoblástica aguda esta población se encuentra disminuida en número y función.

5 Objetivos

5.1 General

Investigar la contribución de las células NK CRTAM+ de médula ósea en las respuestas tempranas anti- o pro-tumoral en la leucemia linfoblástica aguda.

5.2 Particulares

- a. Investigar la dinámica de expresión de CRTAM a lo largo de la diferenciación de células NK en la normalidad.
- b. Evaluar las propiedades funcionales de las células NK CRTAM+ provenientes de médula ósea y de sangre periférica en la LLA, con especial énfasis en su capacidad anti-tumoral *in vitro* (citotóxica y reguladora).
- c. Determinar la abundancia de células NK CRTAM+ así como su actividad en médula ósea de pacientes leucémicos.

6 Materiales y Métodos

6.1 Recolección de muestras y obtención de células mononucleares.

Las muestras de sangre del cordón umbilical (SCU) se obtuvieron de recién nacidos normales a término con el consentimiento informado por escrito de las madres, mientras que los aspirados de médula ósea normal (MO) se recolectaron de donantes pediátricos sanos que entraron en cirugía ortopédica y de acuerdo con las directrices institucionales. Los aspirados de médula ósea patológicos (MO LLA) se obtuvieron de pacientes pediátricos con sospecha o recién diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda. Las muestras de sangre periférica (SP) se tomaron de individuos adultos clínicamente sanos.

Las células mononucleares (MNC) se obtuvieron por un gradiente de centrifugación con Ficoll-Paque Plus y se utilizaron inmediatamente o se conservaron a -80 °C en una solución crio preservante (90% SFB + 10% DMSO) hasta su uso.

6.2 Citometría de flujo.

Las CMN fueron incubadas con anticuerpos anti-linaje conjugados con PE (CD3, CD8, CD56, CD14, CD20, CD19, CD235a), anti-CD34-PB, anti-CD38-FITC, anti-CD45RA-PE-Cy5, anti CRTAM-APC, anti-CD16-FITC, anti-CD56-PE y anti-CD122-FITC. La estrategia de análisis fue: para HSC Lin-CD34+CD38-CD45RA-, mientras que los MPP se clasificaron como Lin-CD34+CD38+CD45RA-, los ELP como Lin-CD34+CD38+CD45RA+, las células NK como CD56+CD3-CD16+/- y las células NKT como CD56+CD3+. En cada compartimento se evaluó la expresión de CRTAM en condiciones basales. La adquisición se realizó en un citómetro FACS Canto II. El análisis de los datos de citometría de flujo se llevó a cabo con el software FlowJo 10 (TreeStar Inc).

6.3 Detección de CRTAM en células NK.

Las MNC de sangre periférica fueron incubadas en presencia de PMA (2ng/ml) / Ionomicina (200ng/ml) durante 18hrs en RPMI suplementado con 10% SFB (Gibco) y posteriormente cosechadas y analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de CRTAM en células NK, utilizando los anticuerpos CD56 PE, CD16 FITC y CRTAM APC (Biolegend y R&D systems).

Las muestras de Medula Ósea de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda sin ningún tratamiento o estímulo previo fueron incubadas con los anticuerpos CD56 PE, CD16 FITC y CRTAM APC y los eritrocitos lisados con un buffer de lisis (BD Pharm Lyse). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Canto II y los datos analizados con el software FlowJo 10 (TreeStar Inc).

6.4 Aislamiento de células NK.

Las células NK (CD56+ CD3-) fueron purificadas por citometría de flujo multiparamétrica utilizando un citómetro sorter FACSAria. Tras ello, la población de células NK fue activada con un estímulo de PMA (2ng/ml) e Ionomicina (200ng/ml) durante 18 horas, después de lo cual se purificaron nuevamente por sort para obtener a la población NK CRTAM+ que fue utilizada en subsecuentes experimentos. Los anticuerpos utilizados fueron CD16 FITC, CD56 PE (Biolegend) y CRTAM APC (R&D systems). El análisis de los datos de citometría de flujo se llevó a cabo con el software FlowJo 10 (TreeStar Inc).

6.5 Ensayo de citotoxicidad.

La actividad citolítica de las células NK se evaluó usando un ensayo basado en fluorescencia. Dicho ensayo usa el colorante CTV (cell trace violet) para distinguir el blanco celular de las células efectoras, y el colorante de intercalación de DNA 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para la identificación de las células muertas y vivas. Brevemente, la línea celular K562 de leucemia mieloide

crónica (ATCC) se mantuvo en fase logarítmica de crecimiento en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células K562 fueron teñidas con dilución 1:10,000 de CTV. Las células NK CRTAM+ purificadas se co-cultivaron con células K562 marcadas con CTV, utilizando una relación de 10 células efectoras por cada célula blanco. Se añadió IL-2 (40 ng/ml) para inducir la activación de células NK, seguido de 4 horas de incubación a 37 °C. Las células se lavaron y se adicionaron 5µL de 7-AAD en la suspensión celular. Se utilizó citometría de flujo multiparamétrica para determinar la funcionalidad de las células NK. Este mismo ensayo se realizó utilizando células leucémicas primarias o de otras líneas celulares como blanco.

6.6 Detección intracelular de IFN γ .

Para investigar la capacidad de producción de IFN γ tras la estimulación, se realizó un ensayo de detección intracelular de IFN γ . Después de ser purificadas las células NK CRTAM+ o las células de interés, éstas fueron estimuladas con IL-12 (50 ng/ml) e IL-18 (50 ng/ml) durante 20 horas, habiendo añadido cuatro horas antes brefeldina A (BFA, 10 mg/ml) para inhibir el transporte intracelular de proteínas. Posterior a las 20 horas las células se cosecharon y lavaron cuidadosamente, para continuar la incubación con anticuerpos conjugados anti-CD56-PE, anti-CD16-FITC y anti-IFN γ -APC-Cy7 para realizar tinciones extra e intracelulares, respectivamente. La adquisición y el análisis se hicieron por citometría de flujo multiparamétrica, utilizando FlowJo 10 como el software de elección (TreeStar Inc).

6.7 Co-cultivos con células estromales.

Se utilizaron células estromales (MSC) primarias y de líneas celulares. Las células primarias se obtuvieron de células mononucleares de MO normal o MO de LLA, colocadas en placas de cultivo con DMEM bajo en glucosa (Dulbecco's modified Eagle's medium) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Las MSC fueron aisladas por su capacidad de adherencia al plástico, de acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Después de obtener una monocapa confluyente, las células fueron tripsinizadas y resembradas para su expansión y caracterización. Los experimentos se llevaron a cabo con células en su tercer o cuarto pase.

6.8 Detección de Necl-2 por PCR.

La extracción de ARN total de células estromales de pacientes y controles fue realizada con Trizol y siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizó la transcripción reversa del ARN utilizando random primers y la transcriptasa SuperScript II. La PCR utilizó polimerasa Taq, haciendo uso de los siguientes primers para amplificar Necl-2: 5'-GAAGGACAGCAGGTTTCAG-3' y 5'-CATCAGATTACGTGGTGGGA-3' para obtener un producto de 169pb. La línea celular Hek293 se utilizó como control positivo.

6.9 Detección intracelular de IL10

Para el análisis de IL-10, las MNC de pacientes con LLA o controles no hematológicos fueron teñidas con anticuerpos conjugados CD56 PE, CRTAM APC y CD3 PerCP por 20 min. Después de lavar, las células fueron fijadas y permeabilizadas con el kit Cytotfix/Cytoperm de BD, después de lo cual se realizó la tinción intracelular para IL-10 FITC. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Canto II y los datos analizados en el software FlowJo 10 (TreeStar Inc).

7 Resultados

7.1 Caracterización funcional de células NK CRTAM+ de sangre periférica

Las células NK CRTAM+ se aislaron de muestras de sangre periférica de adulto joven y por citometría de flujo fue purificada la población CD56+ CD3-, previo a recibir un estímulo con PMA/Ionomicina por 18h y a una segunda purificación por citometría de flujo para obtener a la población CD56+ CD3- CRTAM+, utilizada posteriormente para ensayos de citotoxicidad y producción de IFN γ .

La comparación de las células NK CRTAM+ y NK CRTAM- mostró muy similar capacidad citotóxica, pero un mayor porcentaje de las células NK CRTAM+ producen IFN γ . (Figura 5).

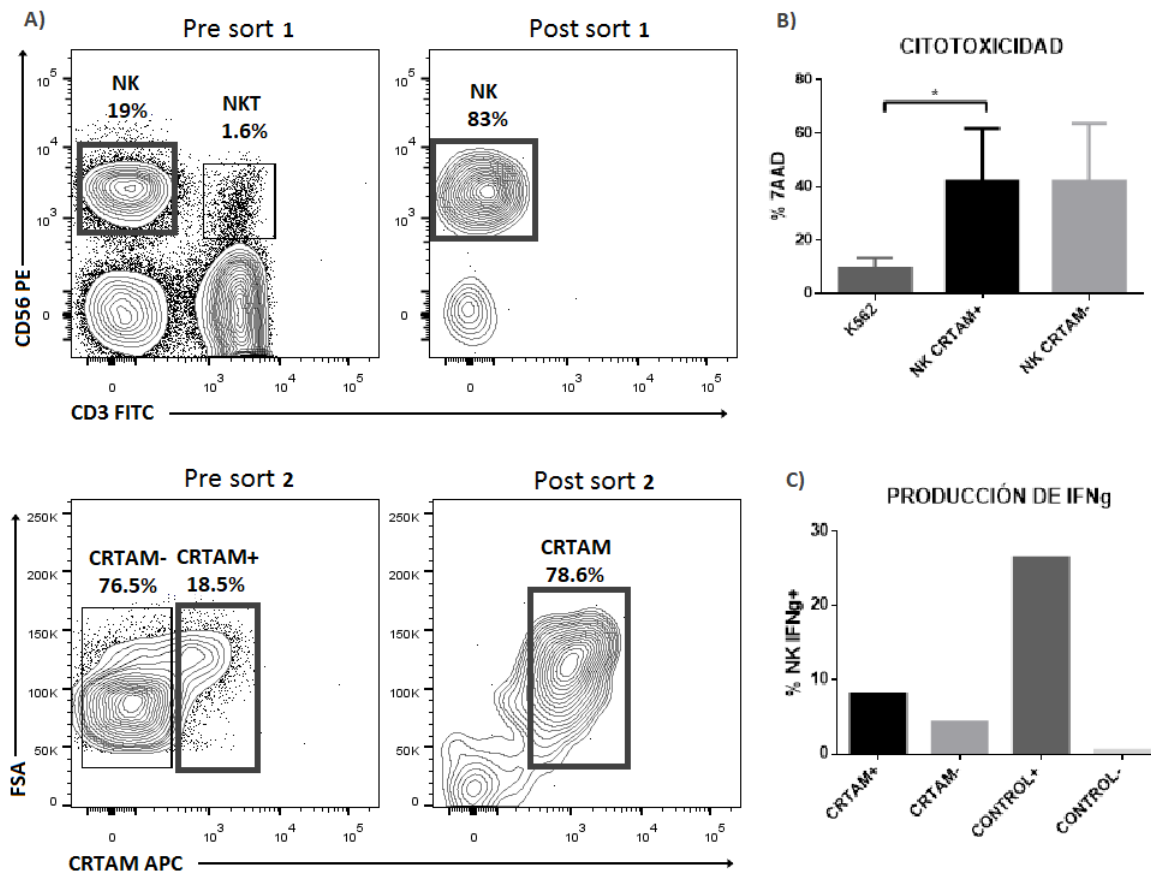


Figura 5. Las células NK CRTAM+ de sangre periférica producen interferón y poseen capacidad citotóxica. A) Enriquecimiento por citometría de flujo de células CD56+ CD3- CRTAM+ tras la estimulación con ionomicina/PMA por 18h de células CD56+ CD3- previamente enriquecidas. B) Actividad citotóxica de células NK sobre células blanco K562, evaluada por la incorporación del colorante de viabilidad 7AAD. C) Ensayo de producción de interferón gamma por células NK tras la estimulación con las citocinas IL-12 e IL-18.

7.2 CRTAM y el desarrollo hematopoyético temprano de células NK.

Después de comprobar que las células NK de periferia expresan CRTAM como resultado de su activación, esta molécula fue evaluada durante el desarrollo hematopoyético, para lo cual las células progenitoras CD34+ fueron enriquecidas por columna a partir de muestras de Sangre de Cordón Umbilical (SCU) y Sangre Periférica Movilizada (SPM). Haciendo uso de citometría de flujo multiparamétrica, se analizó la expresión de CD34, así como de los marcadores de linaje CD3, CD8, CD56, CD14, CD20, CD19 y CD235a y se identificaron tres poblaciones celulares en base a los fenotipos de células progenitoras CD34+ Linaje-, de células precursoras CD34+ Linaje+ y de células maduras CD34- Linaje+. La expresión de CRTAM en cada una de ellas fue evaluada sin estímulo previo. (Figura 6) Adicionalmente, los primeros estadios de desarrollo hematopoyético, esto es, las células troncales hematopoyéticas (HSC) Lin-CD34+CD38-CD45RA-, los progenitores multipotentes (MPP) Lin-CD34+CD38+CD45RA- y los progenitores linfoides tempranos (ELP) Lin-CD34+CD38+CD45RA+, fueron blanco de la evaluación de CRTAM, aunque en ninguno de ellos fue observada una expresión detectable, sugiriendo que el programa de diferenciación hacia estirpes hematopoyéticas comprometidas (aquéllos que expresan simultáneamente CD34 y marcadores de linaje) se ve acompañado de la expresión de moléculas de activación como CRTAM, y

descartando su participación sustancial en las etapas seminales del desarrollo de los sistemas hematopoyético e inmunológico.

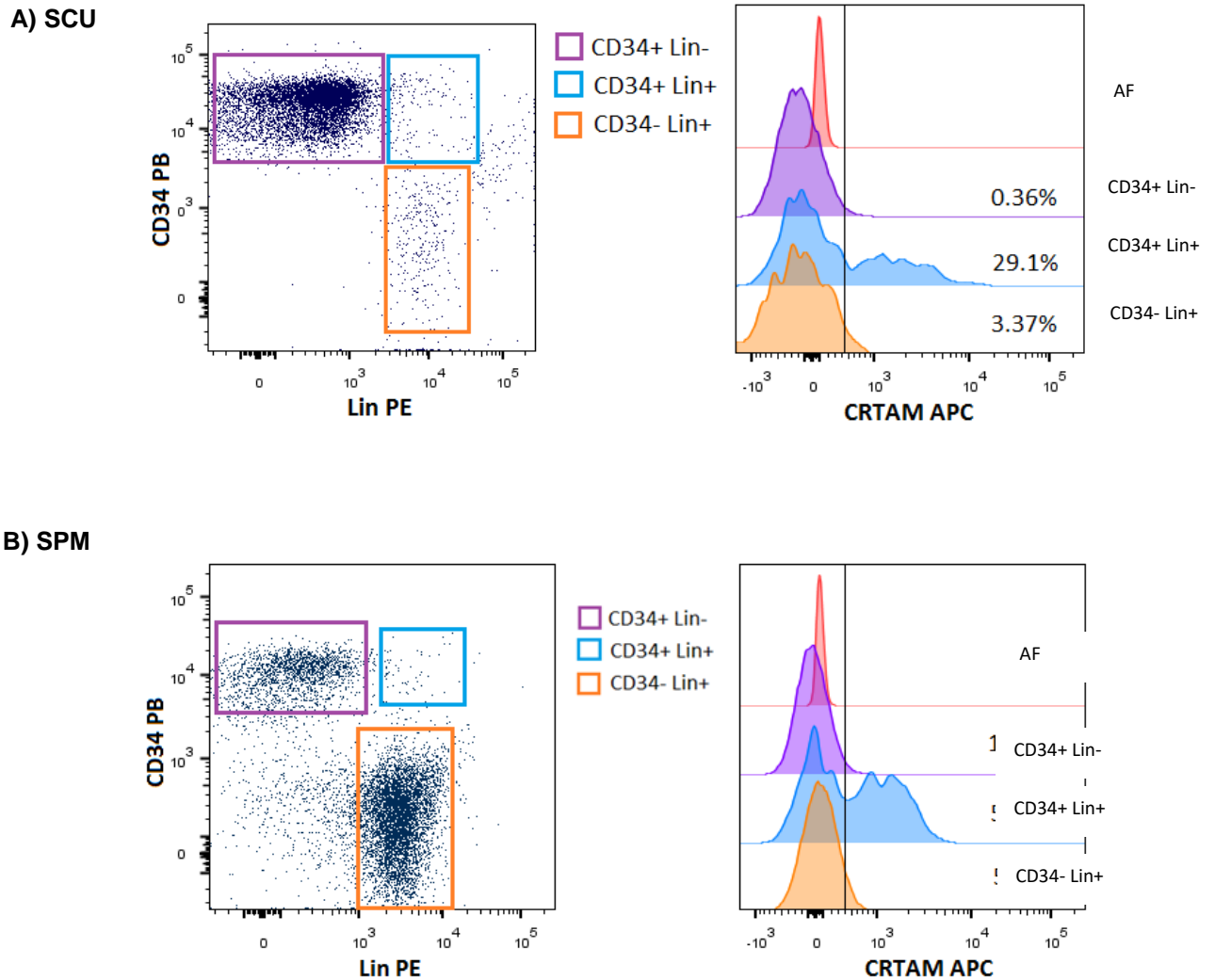
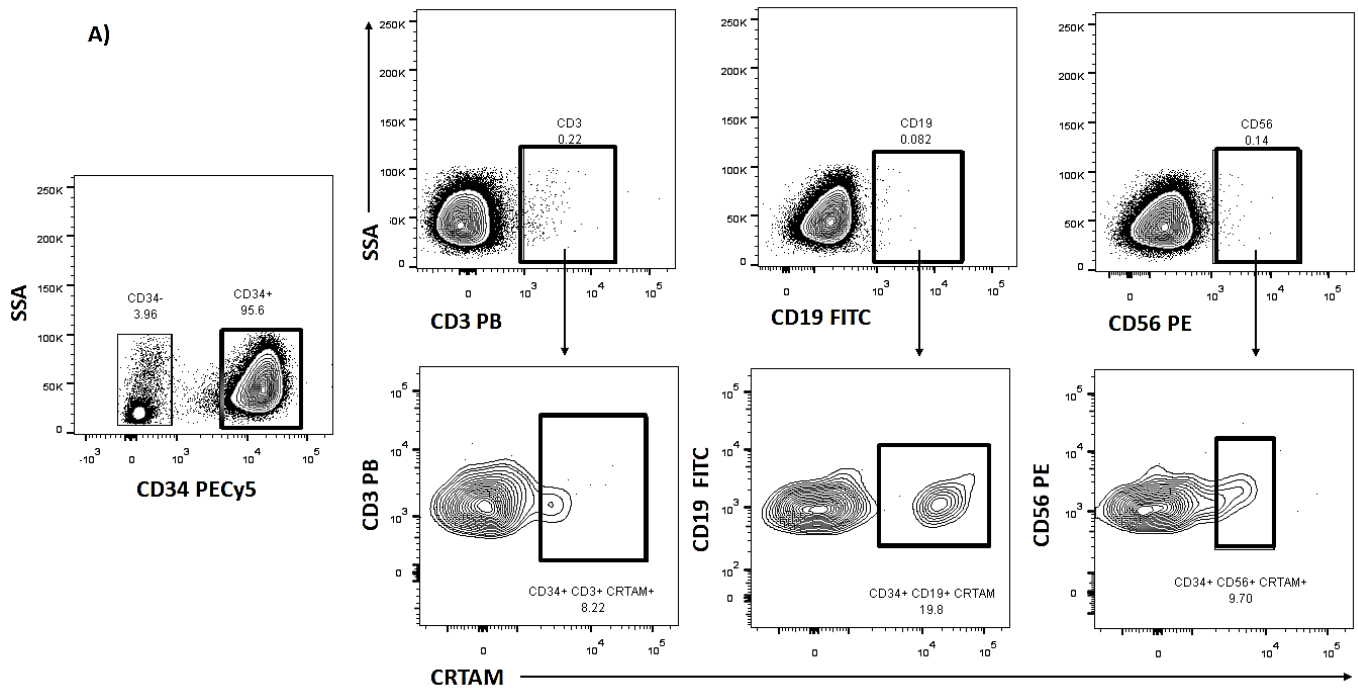


Figura 6. La molécula de activación CRTAM se expresa abundantemente en precursores hematopoyéticos comprometidos a linaje. Las células CD34+ provenientes de muestras de cordón umbilical (A) o de sangre periférica movilizada (B), fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de CRTAM en los compartimentos hematopoyéticos de progenitores (CD34+Lin-), precursores (CD34+Lin+) y células maduras (CD34-Lin+).

Dada la posible actividad funcional de CRTAM en los precursores CD34+ Lin+, su expresión se investigó individualmente en células precursoras para

linfocitos T (CD34+CD3+), linfocitos B (CD34+CD19+) y linaje NK (CD34+CD56+), y en comparación se analizaron sus contrapartes maduras contenidas en el compartimiento CD34 negativo.

Una población linfoide minoritaria pero conspicua en cada una de las fracciones CD34+ mostró ser positiva a la expresión de CRTAM, en tanto las subpoblaciones CD34-, aunque muy abundantes, carecen aparentemente de la molécula (Figura 7). Los hallazgos sugieren que mientras en los estadios terminalmente diferenciados del linaje linfoide, la expresión de CRTAM resulta de su activación policlonal y/o específica monoclonal, en las etapas comprometidas del programa de diferenciación linfoide, los precursores exhiben una interesante expresión. Entretanto, en el acervo de las células seminales del mapa hematopoyético no hay rastros aparentes. Es incierto si en todos los grupos celulares positivos, la función de CRTAM -efectora- es similar o si en las células primitivas de médula ósea, les provee de una vía de intercomunicación con su nicho hematopoyético.



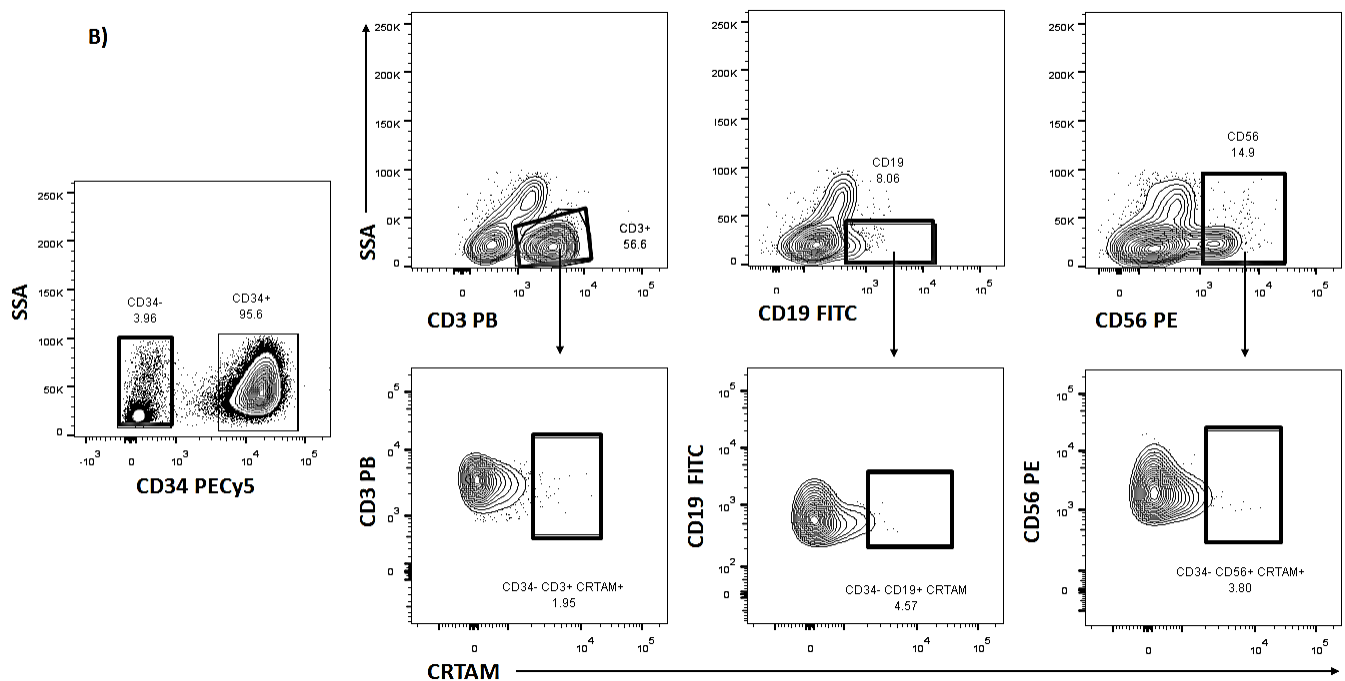


Figura 7. CRTAM se expresa en precursores comprometidos a linaje linfoide pero no en células terminalmente diferenciadas. Células CD34+ fueron enriquecidas de muestras de SPM y teñidas con marcadores de linaje linfoide, la expresión de CRTAM se evaluó en las subpoblaciones CD34+ (A) y CD34- (B).

7.3 Compromiso funcional de células NK y expresión de CRTAM.

Para evaluar la expresión de CRTAM en células NK maduras se utilizaron muestras de SCU, cuyas células mononucleares son obtenidas por un gradiente de centrifugación con Ficoll-Paque, seguido del enriquecimiento de la población CD56+ CD3- por citometría de flujo y su ulterior estimulación con Ionomicina/PMA durante 18h. Finalmente, la población CD56+ CD3- CRTAM+ es enriquecida nuevamente por citometría de flujo para su investigación.

El fraccionamiento de las poblaciones celulares de acuerdo con el nivel de expresión de CD56 en bajo/intermedio (CD56dim) y alto (CD56high) y su análisis en torno a la expresión de CRTAM resultó en una clara tendencia a la correlación positiva: a mayor expresión de CD56 en la superficie, mayor intensidad de

CRTAM (Figura 8). Ha sido ampliamente reportada la identidad de la población CD56^{high} CD16⁻ como células NK reguladoras con capacidad preferente de producir citocinas y disminuida capacidad citotóxica.

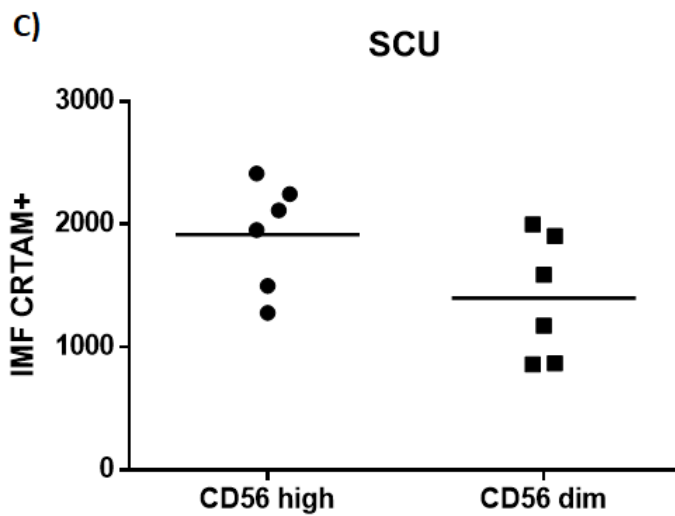
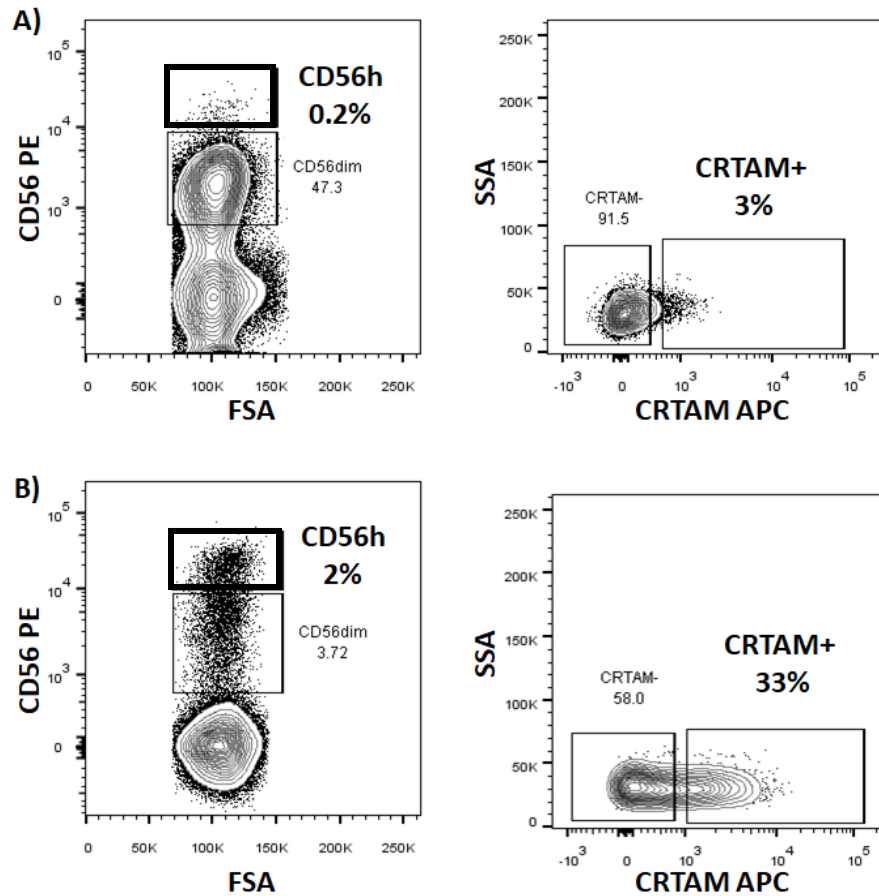
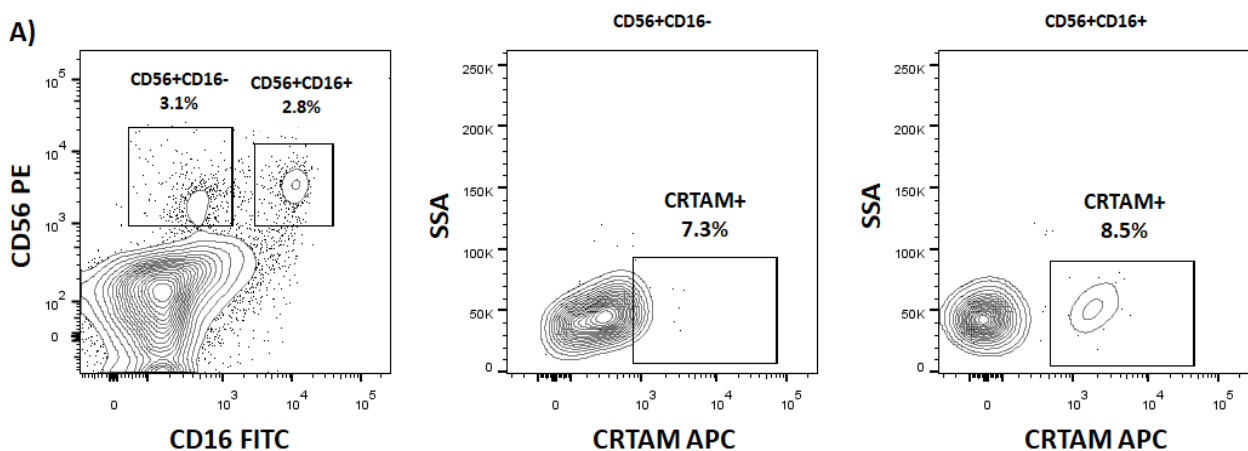


Figura 8. La expresión de CRTAM aparentemente es mayor en células NK que expresan abundantemente CD56. A) SCU con bajo porcentaje de expresión de CD56high y CRTAM+ tras la activación. B) SCU con mayor porcentaje de expresión de CD56high y alto porcentaje de CRTAM+. C) Datos de seis experimentos independientes donde se analiza la expresión de CRTAM en los compartimentos CD56 high o CD56 dim.

7.4 CRTAM en células NK y NKT de pacientes leucémicos.

Dada la posibilidad de expresión de CRTAM en células precursoras, analizamos su abundancia en aspirados de médula ósea provenientes de pacientes con reciente diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda. Los leucocitos totales fueron incubados con anticuerpos CD56, CD3, CD16 y CRTAM, incorporando casos de LMA y no hematológicos como grupos de comparación.

De manera contraria a lo esperado, las células NK de pacientes con LLA expresan, en condiciones basales y sin ningún estímulo, cantidades considerables de la molécula de activación CRTAM. Sorprendentemente, casi la totalidad de las células NKT de MO expresaron esta molécula con alta intensidad, sin ningún estímulo exógeno (Figura 9). Se analizó la activación temprana de las células a través de la expresión de CD69 por parte de las células NK, se observó una expresión elevada de dicha molécula.



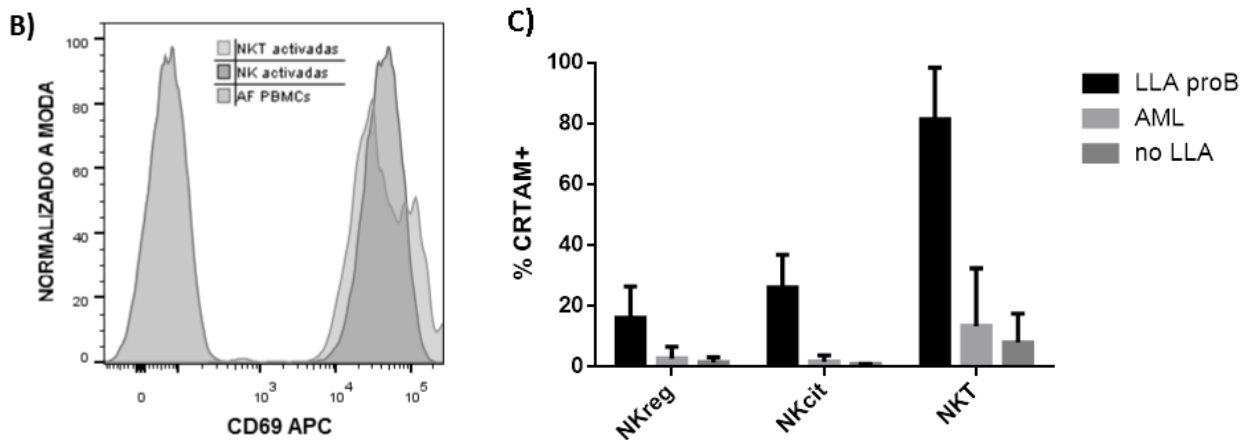


Figura 9. Las células NK y NKT de la médula ósea en Leucemia Linfoblástica Aguda están aparentemente preactivadas y muestran una expresión relativamente alta de CRTAM. A) Estrategia de análisis de CRTAM en base a la expresión de CD56 y CD16. B) Expresión de CD69 como control de activación. C) Comparación de pacientes y controles respecto a la expresión de CRTAM. Fenotipo NKreg: CD56+CD16-; NKcit: CD56+ CD16+; NKT: CD56+CD3+; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; AML: Leucemia Mieloide Aguda; LLA ProB n=3, AML n=2, no LLA n=3.

7.5 Novedosa subpoblación de células NK supresoras en la médula ósea leucémica

La médula ósea de los individuos que padecen leucemia linfoblástica aguda está ocupada mayoritariamente de precursores malignos, que coexisten con células linfoides y mieloides normales, dentro de las que se incluyen las NK. Dado que la noción de la inmunovigilancia anti-tumoral se fundamenta fuertemente en los mecanismos efectores de las células NK, estamos interesados en explorar su posible papel en LLA, a través del análisis funcional como reguladores de la respuesta inmune. Nuestro ensayo preliminar utilizando células de MO de LLA reveló la singular expresión de IL-10 en la población NK CD56+ CRTAM+ (Figura 13).

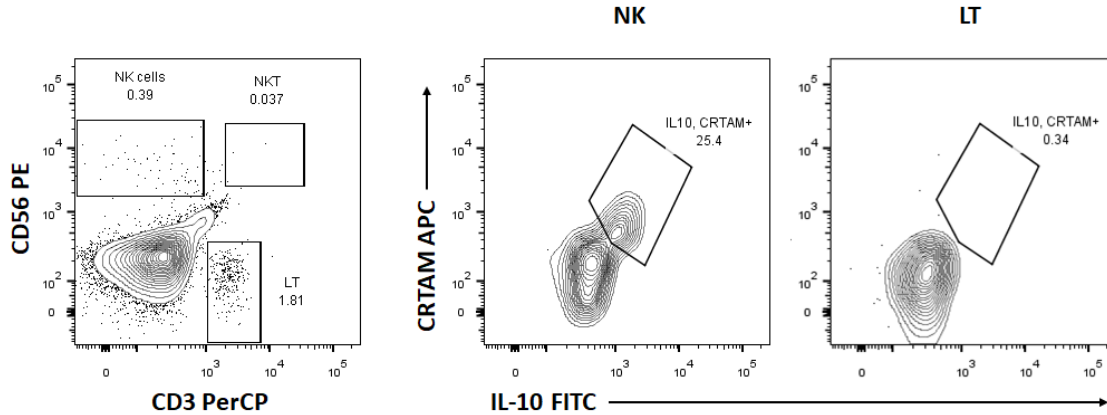


Figura 13. Las células NK CRTAM+ de médula ósea leucémica producen IL-10. Células mononucleares de aspirados de MO de pacientes con LLA fueron analizadas respecto a la expresión de IL-10. Las muestras investigadas no recibieron estímulo de activación, ni fue utilizado algún inhibidor de tráfico vesicular.

7.6 El microambiente tumoral y la activación de linaje NK.

Resultados previamente reportados en nuestro laboratorio sugieren un ambiente pro-inflamatorio en médula ósea de pacientes leucémicos, dicho ambiente es facilitado tanto por células hematopoyéticas como por células estromales.

Para evaluar si el nicho estromal leucémico tiene participación sobre la expresión de CRTAM observada en las células NK de pacientes leucémicos, se implementaron cuatro sistemas de co-cultivo de células mononucleares hematopoyéticas y células estromales.

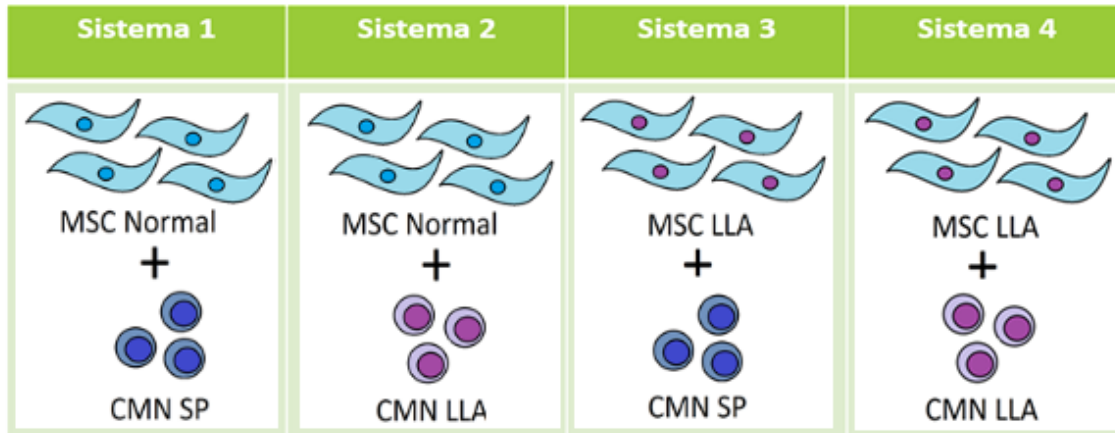


Figura 10. Sistemas de co-cultivo de células estromales mesenquimales y células mononucleares. MSC: Células estromales mesenquimales, CMN: Células mononucleares, SP: Sangre periférica, LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

Las células estromales se obtuvieron de células mononucleares de aspirado de medula ósea por su capacidad de adherencia al plástico, se expandieron y se utilizaron en fase 3 o 4 para los experimentos, las células mononucleares (CMN) se obtuvieron de muestras de sangre periférica (SP) de individuos sanos o de aspirados de medula ósea (MO) de pacientes con LLA.

Los co-cultivos fueron analizados en un lapso de 0 a 24 h para permitir la expresión de novo de CRTAM en células NK y NKT. Las células estromales se colocaron 24h antes del co-cultivo para permitir la formación de una monocapa sobre la cual se colocarían las células mononucleares. Las células de cada condición fue teñida con el panel de anticuerpos, CD16 FITC, CD56 PE, CRTAM APC, CD3 PerCP.

En los sistemas de co-cultivo se observó que el estroma tanto normal como leucémico induce la expresión de CRTAM en células normales y leucémicas, pero en diferente proporción dependiendo del sistema (Figura 11). Aunque un solo componente leucémico en el co-cultivo facilita aparentemente la expresión de CRTAM, aquéllos sistemas con mayor expresión son los que contienen células mononucleares de LLA, que tras ponerse en contacto con el estroma inducen la expresión de CRTAM, observándose el punto máximo a las 12h. Aunque las

células mononucleares periféricas expresan CRTAM tras el contacto con células estromales, su nivel es muy bajo en comparación con la contraparte leucémica. Interesantemente, la mayor expresión de CRTAM es observada en células NKT, seguida por la población NKreg (Figura 11A). Si la interacción con nichos hematopoyéticos especializados promueve su expresión y/o activación funcional es una pregunta de potencial interés en la patobiología de la leucemia.

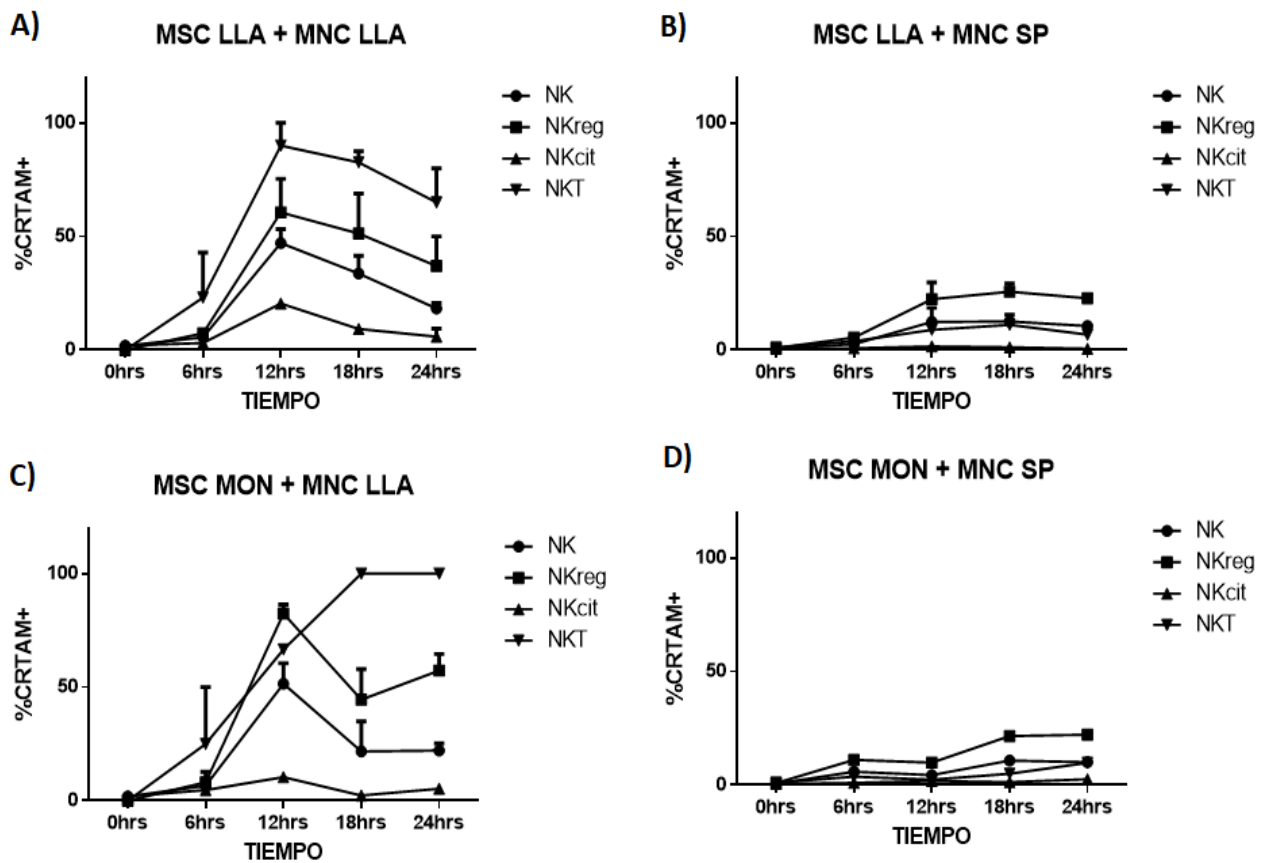


Figura 11. La expresión de CRTAM en las células NK y NKT en LLA es favorecida por el estroma proveniente de medula ósea leucémica. Sistema de co-cultivo leucémico-leucémico (A), leucémico-normal (B, C) y normal-normal (D). Fenotipo: NK, CD56+CD3-; NKreg, CD56+CD16-; NKcit, CD56+CD16+; NKT, CD56+CD3+.

CRTAM tiene interacciones homotípicas y heterotípicas, su único ligando conocido es Necl-2 (Nectin-like 2), una molécula de adhesión expresada

principalmente en pulmón, cerebro y testículos, entre otros tejidos. La transcripción del gen que lo codifica fue investigada por RT-PCR en células estromales de medula ósea normal y leucémica, sugiriendo la posible interacción CRTAM - Necl-2 entre células NK o NKT y estromales (Figura 12). La búsqueda de su expresión específicamente en células estromales mesenquimales altamente productoras de CXCL12, las cuales constituyen los nichos linfoides de B y NK en la médula ósea, sería de alta relevancia.

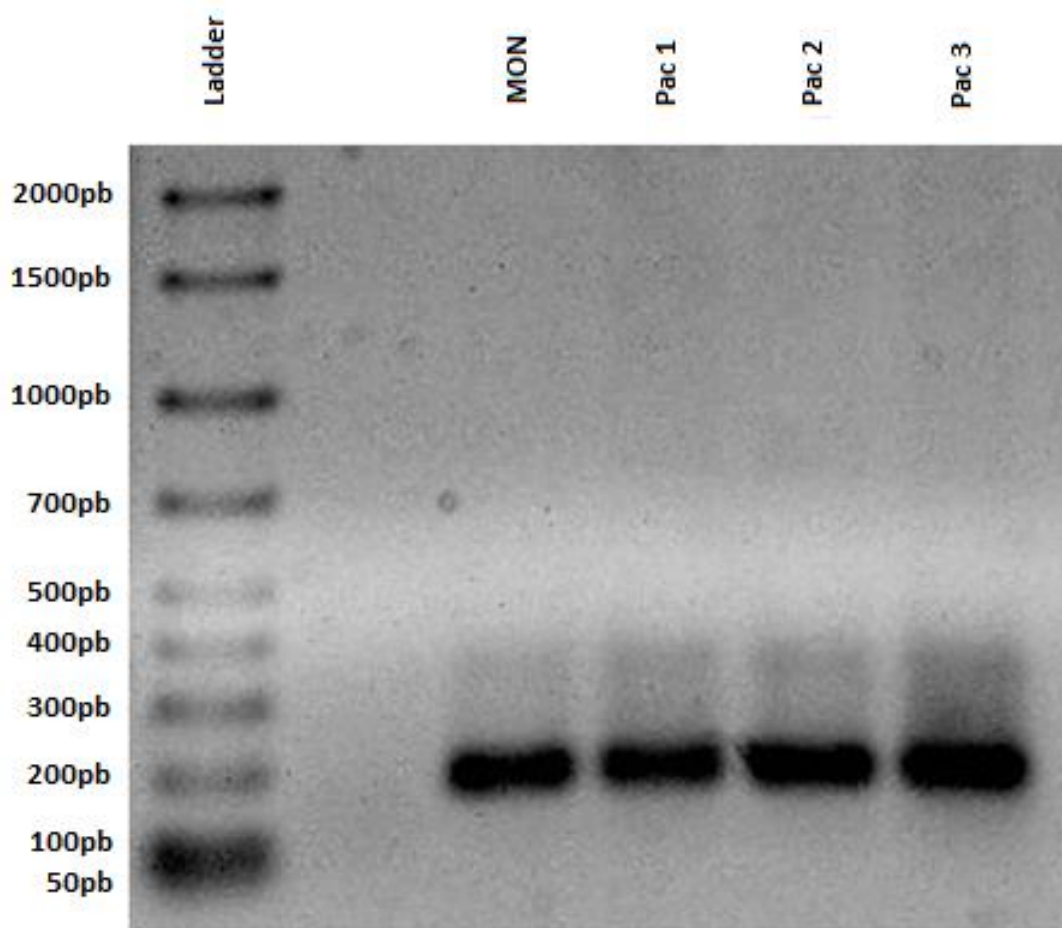


Figura 12. Los nichos estromales potenciales para la diferenciación del linaje NK expresan Necl-2. Análisis por RT-PCR de Necl-2 en células estromales de 3 pacientes de LLA y una MO normal. MON: Medula ósea normal, Pac1: Paciente 1, Pac2: Paciente 2, Pac3: Paciente 3.

8 Discusión de resultados

En virtud de su auto-renovación y las propiedades de diferenciación multi-linaje estrictamente reguladas, las células troncales hematopoyéticas generan todo el sistema sanguíneo e inmunológico a lo largo de la vida postnatal. Durante trastornos hematológicos malignos, incluyendo las leucemias agudas, una serie de señales intrínsecas y extrínsecas influyen en la vía de diferenciación hematopoyética y cooperan para tomar decisiones anormales en el destino y función celulares.[44]

Un gran número de células y moléculas hematopoyéticas del sistema inmune innato o adaptativo funcionan como componentes clave de la defensa contra el cáncer, en el cual su capacidad para identificar inequívocamente y destruir las células tumorales contribuye a un proceso dinámico denominado inmunovigilancia antitumoral,[45] que destaca la relevancia de un control homeostático continuo de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas con el fin de producir elementos de supresión tumoral.

Algunas investigaciones recientes han sugerido que además del papel de protección eficaz contra la tumorigénesis, el sistema inmune puede participar en la promoción del crecimiento de células malignas mediante la edición de inmunogenicidad tumoral. Dicho proceso de inmunoedición de cáncer incluye tres fases distintas: eliminación, equilibrio y escape.[45] Durante la fase de eliminación, las células hematopoyéticas normales y las moléculas terminan las células cancerosas potenciales. Entrar en la fase de equilibrio debido a la latencia tumoral es una situación insegura porque algunos componentes del sistema inmunológico están expuestos a la pérdida de sus funciones y, en última instancia, permiten la adaptación de las células transformadas (fase de escape).[46] Los mecanismos de inmunoedición del cáncer que pueden operar una vez que las células leucémicas transformadas se están diferenciando aún no son claros.

La vigilancia antitumoral mediada por células innatas, incluyendo las NK, puede ser crucial en el control maligno, y presumiblemente un daño en el reabastecimiento y/o capacidad funcional de dichas células favorecería la transición a las etapas de equilibrio y edición,[47] con lo que la ocupación tumoral a expensas de la diferenciación de la contraparte normal sería básicamente irreversible.

Este trabajo ha resultado en hallazgos que potencialmente contribuirán a comprender el desbalance de la hematopoyesis normal que favorece la progresión maligna en el contexto de un microambiente promotor de poblaciones innatas con capacidad represora en la médula ósea leucémica. Al desentrañar el papel de dichas células en la edición tumoral, podremos aprender acerca de los mecanismos para la etiología y el mantenimiento dependiente de un sistema inmune permisivo en esta condición patológica.

Las células NK derivan de precursores hematopoyéticos CD34+, se desarrollan en médula ósea en nichos especializados productores de CXCL12[48] y no requieren de procesamiento tímico. Su desarrollo en el humano tiene varias etapas en médula ósea, basadas en la expresión de CD34, CD117, CD56 y CD94, así como en la crítica expresión del receptor beta de IL2/15 (CD122), que le permite la respuesta a IL-15. Por otro lado, la interacción de los precursores con células estromales es necesaria, así como ciertas citocinas (IL-7, IL-15) y factores (ligando de ckit y flt-3).[49]

Dentro del grupo de progenitores linfoides, incluyendo los de NK, no se detectó la molécula de interés, CRTAM. Sin embargo, su expresión fue evidente en una fracción de precursores CD34+CD56+, cuya función específica es aún desconocida, pero abre la posibilidad de un papel de adhesión que favorezca la interacción con un nicho específico de NK o NKT que expresa Necl-2.

En los últimos estadios de maduración, las células NK salen a periferia, donde el 90% cumple con su función citotóxica, de gran importancia en la respuesta inmune adaptativa como primera línea de defensa contra infecciones virales y en la eliminación de células tumorales.[50]

La expresión de CRTAM en células del sistema inmune se ha relacionado con su activación. En general, en linfocitos T se asocia con la producción de IFN γ y en células NK con la citotoxicidad.[35] En concordancia, nuestros ensayos *in vitro* de células NK CRTAM+, maduras y normales, revelaron su capacidad citotóxica y de producción de IFN γ , aunque es incierto si en sistemas *in vivo* no experimentales, ellas cumplan con sus funciones de manera más específica que una NK convencional. Notablemente, la mayor expresión fue observada en células NK CD56^{high}, y dicha población esta reportada con una capacidad preferente por producción de citocinas y con baja capacidad citotóxica.[10]

Uno de los potenciales problemas de inmunovigilancia en la Leucemia Linfoblástica Aguda es la disminución del contenido de células NK y su abatida capacidad citotóxica, al menos en sangre periférica.[51] Al analizar la expresión de CRTAM en este grupo de pacientes, notamos que sus células NK expresan CRTAM sin ser estimuladas *ex vivo*, es decir, un factor propio de la patología favorece su activación, aunque, por reportes anteriores, no serían células completamente funcionales. Los pacientes con LLA generalmente poseen en medula ósea un microambiente pro inflamatorio que es dado tanto por células hematopoyéticas como por células estromales, abriendo la posibilidad de que estas células CRTAM+ sean emergentes, resultado de la modificación microambiental.[52, 53]

Diversas evidencias sugieren la existencia de una población de células NK reguladoras, con capacidad supresora sobre células del sistema inmune, quizás similar a los Linfocitos T reguladores. Crome y colaboradores describen una población con capacidad de supresión de linfocitos T asociados a tumor y

producción de IL-22.[26] También se ha descrito una población con propiedades supresoras que expresa IL-10 y TGFb.[28, 54] Estas poblaciones se han descrito en torno a modelos de cáncer sólido, es de suma relevancia analizar las propiedades específicas de la población NK CRTAM+ presente en pacientes con LLA, probablemente es una subpoblación de NK con capacidad reguladora que module la respuesta del sistema inmune de manera favorable para el tumor.

El hallazgo preliminar de producción de IL-10 sugeriría que las células NK CRTAM+ en LLA no favorecen la eliminación del tumor, y, por el contrario, favorecen su establecimiento al suprimir la respuesta del sistema inmune. Es indispensable determinar el efecto que tiene las células NK CRTAM+ sobre células efectoras específicas.

9 Conclusiones preliminares

La médula ósea leucémica tiene un alto contenido de células NK activadas CD56^{high} que expresan CRTAM y presumiblemente provienen de precursores linfoides B/NK residentes en nichos especializados positivos para el ligando Necl-2.

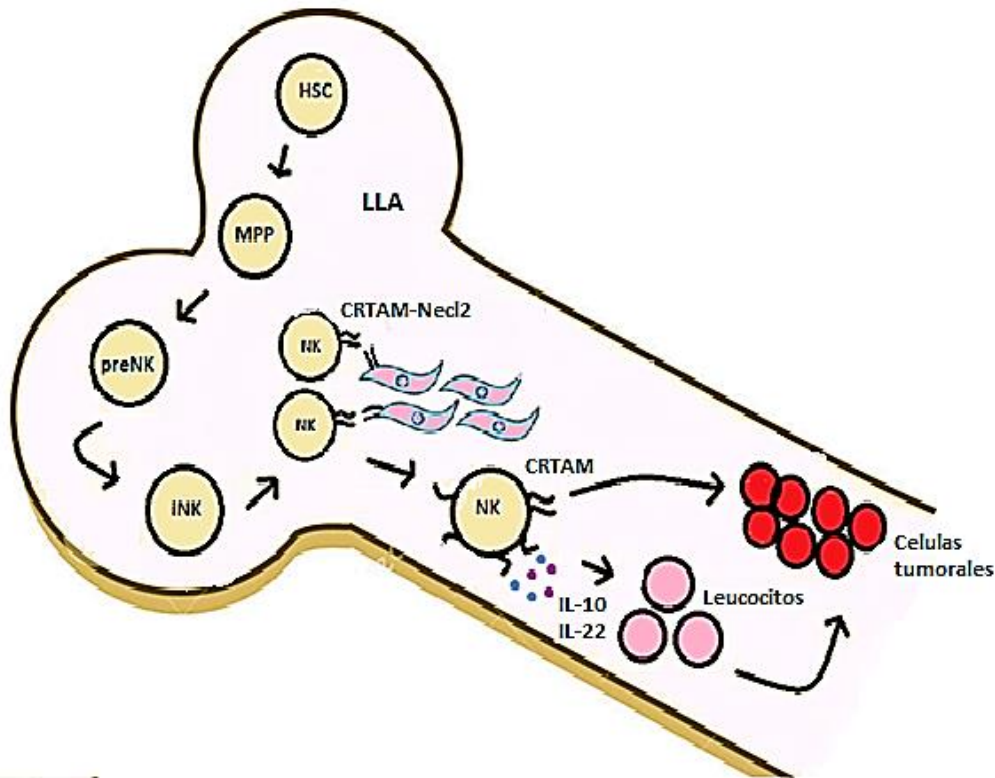
Por su fenotipo y capacidad funcional productora de IL-10 *in vitro*, las células NK CD56+CD16- CRTAM+ de la médula ósea de individuos con LLA, podrían jugar un papel regulador de la respuesta anti-tumoral, favoreciendo la progresión tumoral.

La identidad de esta población NK presumiblemente supresora en la médula ósea leucémica sería de especial interés para el entendimiento de la patobiología de la LLA.

10 Perspectivas

- Analizar si las células NK CRTAM+ expresan IL-22 y TGFb.
- Evaluar la capacidad de células NK CRTAM+ para inducir células Treg.
- Utilizar el microambiente leucémico para inducir a las células NKreg

11 Modelo propuesto



En estadios intermedios del desarrollo de células NK se observa una expresión discreta de la molécula CRTAM, aunque se desconoce su función en estadios inmaduros podríamos especular que favorece la interacción de la célula NK con un nicho específico que expresa Necl-2 y tiene las condiciones microambientales idóneas para su desarrollo, en estadios más avanzados de maduración se pierde la expresión de CRTAM permitiendo el desplazamiento de estas células hacia otros nichos, donde podrían llevar a cabo su función efectora.[8, 12]

En la normalidad las células NK maduras solo expresan CRTAM tras su activación, pero en la Leucemia Linfoblástica Aguda las células tienen un estímulo microambiental que las pre activa y favorece la expresión de CRTAM, estas células parecen tener un fenotipo regulador con una expresión alta de CD56 y producción de citocinas como IL-10 y probablemente IL-22, las cuales pueden tener un efecto directo o indirecto sobre células tumorales.[26, 28, 54]

12 Referencias

1. Wilkinson, J.D., et al., *Cancer incidence among Hispanic children in the United States*. Rev Panam Salud Publica, 2005. **18**(1): p. 5-13.
2. Perez-Saldivar, M.L., et al., *Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 355.
3. Purizaca, J., et al., *Lymphoid progenitor cells from childhood acute lymphoblastic leukemia are functionally deficient and express high levels of the transcriptional repressor Gfi-1*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 349067.
4. Pui, C.-H., L.L. Robison, and A.T. Look, *Acute lymphoblastic leukaemia*. The Lancet. **371**(9617): p. 1030-1043.
5. Diamanti, P., et al., *Parthenolide eliminates leukemia-initiating cell populations and improves survival in xenografts of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2013. **121**(8): p. 1384-93.
6. Swann, J.B. and M.J. Smyth, *Immune surveillance of tumors*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(5): p. 1137-1146.
7. Cheng, M., et al., *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(3): p. 230-52.
8. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood Rev, 2006. **20**(3): p. 123-37.
9. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
10. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
11. Waldhauer, I. and A. Steinle, *NK cells and cancer immunosurveillance*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5932-43.
12. Montaldo, E., et al., *Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function*. Cytometry A, 2013. **83**(8): p. 702-13.
13. Fuchs, A. and M. Colonna, *The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(5): p. 359-66.
14. Di Santo, J.P., *Natural killer cell developmental pathways: a question of balance*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 257-86.
15. Miller, J.S., K.A. Alley, and P. McGlave, *Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2594-601.
16. Cooper, M.A., et al., *In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3633-8.
17. Nagai, Y., et al., *Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 801-12.
18. Yanez, A., et al., *TLRs control hematopoiesis during infection*. Eur J Immunol, 2013. **43**(10): p. 2526-33.

19. Welner, R.S., et al., *Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection*. *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3753-61.
20. Welner, R.S., R. Pelayo, and P.W. Kincade, *Evolving views on the genealogy of B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(2): p. 95-106.
21. Vadillo, E., et al., *Adult, but not neonatal, human lymphoid progenitors respond to TLR9 ligation by producing functional NK-like cells*. *Exp Hematol*, 2014. **42**(7): p. 562-73.e3.
22. Chan, C.W., et al., *Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity*. *Nat Med*, 2006. **12**(2): p. 207-13.
23. Welner, R.S., et al., *Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit^{Hi}CD62L⁺ lymphoid progenitors*. *Blood*, 2007. **109**(11): p. 4825-931.
24. Taieb, J., et al., *A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance*. *Nat Med*, 2006. **12**(2): p. 214-9.
25. Guimont-Desrochers, F. and S. Lesage, *Revisiting the Prominent Anti-Tumoral Potential of Pre-mNK Cells*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 446.
26. Crome, S.Q., et al., *A distinct innate lymphoid cell population regulates tumor-associated T cells*. *Nat Med*, 2017. **23**(3): p. 368-375.
27. Deniz, G., et al., *Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses*. *J Immunol*, 2008. **180**(2): p. 850-7.
28. Ostapchuk, Y.O., et al., *Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF-beta in healthy donors and breast cancer patients*. *Cell Immunol*, 2015. **298**(1-2): p. 37-46.
29. Ramirez-Ramirez, D., et al., *Early Differentiation of Human CD11c⁺NK Cells with gamma delta T Cell Activation Properties Is Promoted by Dialyzable Leukocyte Extracts*. *J Immunol Res*, 2016. **2016**: p. 4097642.
30. Kennedy, J., et al., *A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM)*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(5): p. 725-34.
31. Yeh, J.H., S.S. Sidhu, and A.C. Chan, *Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam*. *Cell*, 2008. **132**(5): p. 846-59.
32. Takeuchi, A., et al., *CRTAM determines the CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte lineage*. *J Exp Med*, 2016. **213**(1): p. 123-38.
33. Galibert, L., et al., *Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(23): p. 21955-64.
34. Patino-Lopez, G., et al., *Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8⁺ T lymphocytes*. *J Neuroimmunol*, 2006. **171**(1-2): p. 145-55.
35. Arase, N., et al., *Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8⁺ T cells*. *Int Immunol*, 2005. **17**(9): p. 1227-37.
36. Takeuchi, A., et al., *CRTAM confers late-stage activation of CD8⁺ T cells to regulate retention within lymph node*. *J Immunol*, 2009. **183**(7): p. 4220-8.

37. Medina-Contreras, O., et al., *Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development*. Dev Comp Immunol, 2010. **34**(2): p. 196-202.
38. Garay, E., et al., *CRTAM: A molecule involved in epithelial cell adhesion*. J Cell Biochem, 2010. **111**(1): p. 111-22.
39. Matesanz-Isabel, J., et al., *New B-cell CD molecules*. Immunol Lett, 2011. **134**(2): p. 104-12.
40. Ramirez-Velazquez, C., et al., *Peripheral blood T cells and neutrophils from asthma patients express class-I MHC-restricted T cell-associated molecule*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2014. **10**(1): p. 46.
41. Valle-Rios, R., et al., *Characterization of CRTAM gene promoter: AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes*. Mol Immunol, 2009. **46**(16): p. 3379-87.
42. Rojas-Marquez, C., et al., *CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells*. Mol Immunol, 2015. **66**(2): p. 290-8.
43. Boles, K.S., et al., *The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM*. Blood, 2005. **106**(3): p. 779-86.
44. Vadillo, E., *Regulation of hematopoietic stem/progenitor cell development by inflammation cues*. Molecular Aspects of Inflammation, 2014. **37/661**: p. 71-87.
45. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
46. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
47. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.
48. Purizaca, J., I. Meza, and R. Pelayo, *Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Arch Med Res, 2012. **43**(2): p. 89-101.
49. Wu, Q., et al., *Signal via lymphotoxin-beta R on bone marrow stromal cells is required for an early checkpoint of NK cell development*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1684-9.
50. Moretta, L., et al., *Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications*. Int Arch Allergy Immunol, 2014. **164**(4): p. 253-64.
51. Rouce, R.H., et al., *The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2016. **30**(4): p. 800-11.
52. Vilchis-Ordonez, A., et al., *Bone Marrow Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia Create a Proinflammatory Microenvironment Influencing Normal Hematopoietic Differentiation Fates*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 386165.
53. Balandran, J.C., et al., *Pro-inflammatory-Related Loss of CXCL12 Niche Promotes Acute Lymphoblastic Leukemic Progression at the Expense of Normal Lymphopoiesis*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 666.
54. Mehrotra, P.T., et al., *Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2637-44.