



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE
INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA

T E S I S

Análisis de la expresión de MICA y MICB en líneas linfoides humanas:
YTS y JURKAT vs células normales linfoides

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

Presenta

Estrada Salas Alejandra Sarahí

Director:

Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón



CD.MX.,2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular L-9 P.B., de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Bajo la dirección del Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón.

Así mismo, el proyecto contó con el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA, clave de proyecto: IN220616.

En memoria del pequeño Luis Angel Martinez Huerta , esta tesis va dirigida para tí hasta donde te encuentres, tú me motivaste a terminarla, porque a pesar de todo nunca te rendiste y luchaste hasta el último instante, aunque la leucemia haya ganado la batalla.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y por permitirme conocer a excelentes personas que se convirtieron en mi familia en toda esta travesía.

Al Dr. **Jorge Flavio Mendoza Rincón**, por todo el apoyo, tiempo y paciencia para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. **Benny Weiss Steider** por la orientación brindada en este proceso.

Al Dr. **Isaías Hazarmabeth Salgado Ugarte** por la paciencia, tiempo y la orientación brindada para realizar el análisis numérico del presente trabajo.

A mis sinodales: **Dr. Benny Weiss Steider**, **Dra. Adriana Gutiérrez Hoya**, **M. en C. Reynalda Roldán Pérez** y **Dra. Yolanda Córdova Galaviz** por sus consejos y observaciones tan acertadas que complementaron esta tesis.

A **Don José Chavarría** por todo el trabajo técnico del laboratorio y por mantener todo en orden en el laboratorio para poder realizar los ensayos.

A mis amigos y compañeros del laboratorio que estuvieron desde el principio de este camino hasta el fin compartiendo y soportando mis locuras, alegrías, enojos y una que otra frustración: **Lupe, Marce, Octavio, Diego, Tomas, Leo y Alexa**, gracias por todos esos ratos tan amenos en el laboratorio. Un especial agradecimiento a estas dos personitas que más que mis compañeros se convirtieron en mis hermanos y camaradas **Ricardo** y **Edgar**, gracias por toda la paciencia, los consejos y por nunca dejarme sola cuando necesitaba de su apoyo.

Finalmente y no por ello menos importante a mis profesores de licenciatura sin sus enseñanzas, consejos y paciencia no estaría parada en donde estoy y gracias a ellos me enamore día con día de esta hermosa y apasionante carrera.

DEDICATORIAS:

A mi papá, por apoyarme en todos los sentidos y por brindarme sus consejos cuando sentía que me iba a derrumbar, porque siempre me ha dado su ejemplo para levantarme y luchar por lo que quiero para cumplir mis metas y porque con tu cariño siempre me has dado animo para terminar este proceso y seguir adelante.

A ti mamá por tus sabios consejos, por el amor, los cuidados, la paciencia y cariño que siempre me has brindado a pesar de las adversidades, gracias por nunca dejarme caer y motivarme con esas palabras de aliento que solo tu sabes dar para ser quien soy el día de hoy y sobre todo gracias infinitas por permitirme estar aquí en este preciso momento escribiendo estas palabras por medio del milagro de la vida.

A mis hermanas **Mari** y **Shes** por siempre estar ahí para mi brindándome su apoyo incondicional a pesar de mis locuras y por nunca dejar de creer en esta loquita, gracias por todo su amor, regaños, consejos y por ser ejemplos para mi y llevarme siempre por el buen camino de lograr mis objetivos.

A mi Chispa que siempre estaba conmigo cuando me quebraba la cabeza y no fluían mis ideas, llenando de alegría los momentos de desesperación con su mirada tierna y sus travesuras.

A mis amigos y confidentes **Lyssette**, **Oscar**, **Miguel** y **Chino** por estar conmigo en este camino que se llama vida y por compartir las alegrías, tristezas y sobre todo gracias por su hermosa y valiosa amistad.

A ti mi persona especial y favorita gracias por estar ahí para mí, por tu paciencia en mis ratos de desespero y enojos, por siempre brindarme animo, por motivarme a terminar este largo camino y por ayudarme a superar mis miedos en todo este proceso.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
----------------	---

I.INTRODUCCIÓN

1. Hematopoyesis	2
a. Compartimentos celulares	2
b. Generación de linajes hematopoyéticos	3
b.1 Mielopoyesis	3
b.2 Linfopoyesis	4
b.2.1 Células B	4
b.2.2 Células T	4
b.2.3 Células NK	5
2. NKG2D/NKG2DL en evasión inmune.	13
3. Familia de genes MIC	16
4. Genómica y genética de MICA	16
5. Polimorfismo	18
6. El receptor NKG2D es expresado en líneas de células epiteliales tumorales de cáncer de cérvix	20
7. Líneas linfoides co-expresan las proteínas MICA y MICB	20
II. JUSTIFICACIÓN	22
III.HIPÓTESIS	23
IV.OBJETIVOS	24
V. METODOLOGÍA	25
VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	29

1. Expresión de los ligandos MICA y MICB y su receptor NKG2D por citometría en la línea de tumor de NK (YTS) y de leucemia aguda de células T (Jurkat)	29
2. Las líneas celulares (YTS) y (Jurkat) secretan los ligandos MICA y MICB	36
3. Las líneas celulares tumorales YTS y Jurkat proliferan con la administración exógena de las proteínas MICA y MICB	41
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. PERSPECTIVAS	47
X. BIBLIOGRAFÍA	48
XI. APÉNDICE	62

ABREVIATURAS.

ABC: Anticuerpos unidos por célula

AcMo: Anticuerpo Monoclonal

AICL: Lectina tipo-C inducida por activación (Activation Induced C-Type Lectin)

ADCC: Citotoxicidad Mediada por Células

ARNm: ARN mensajero

ATM: Ataxia telangiectasa mutada

BAX: Proteína citoplasmática Pro-apoptótica que se inserta en la membrana externa mitocondrial, para formar poros y desregular a la misma.

BID: Proteína Pro-Apoptótica que favorece la activación de BAX y otros miembros pro-apoptóticos

CCDA: Citotoxicidad Celular dependiente de anticuerpos

CD2: Marcador por excelencia de linfocitos T, aparece en la maduración de los linfocitos en el timo.

CD4: Glucoproteína monomérica de 55kDa, con 4 dominios extracelulares de tipo Ig (D1, D2, D3 y D4), región transmembrana y larga cola citoplasmática en la que existen tres serinas fosforilables.

CD8: Heterodímero $\alpha\beta$ donde las dos cadenas están unidas por puente disulfuro. Cada cadena tiene de 30 a 38 kDa y un solo dominio extracelular de tipo Ig, una región transmembrana y cola citoplásmica de 25 a 27 aminoácidos, varios de ellos susceptibles de ser fosforilados.

CD10+: Marcador por excelencia de linfocitos B.

CD16: También es conocido como Fc γ RIII.

CD19: Marcador de células B posee un peso molecular de 95kDa.

CD20: Marcador para etapas avanzadas del desarrollo de linfocitos B

CD34: Glucoproteína transmembrana de cadena simple con una masa molecular de 110kD.

CD38: Marcador para la activación de los linfocitos T.

CD44: Glicoproteína transmembranal implicada en la adhesión celular y diferentes componentes de la matriz extracelular.

CD45: Antígeno común leucocítico

CD56: Molécula de adhesión de células neurales (NCAM)

CD90: Proteína que contiene un dominio de inmunoglobulina único y se encuentra presente en todos los vertebrados, conocido como un marcador de diferenciación osteoblástica

CD117: También conocido como C-kit, receptor de superficie que fosforila y activa moléculas de transducción de señales que propagan señales de supervivencia celular, proliferación y diferenciación.

cDNA: DNA codificante

CDs: Clusters de diferenciación

CLP: Progenitor Linfoide Común

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas

CRACC: Proteína transmembrana de tipo I que pertenece al subconjunto CD2 de la superfamilia de Ig.

CTH: Células Troncales Hematopoyéticas

DAG: Diacilglicerol

DAP10: Proteína de activación de DNAX de 10 KDa

DNA: Acido Desoxirribonucleico

ELPs: Early Lymphoid Progenitors

FADD: Dominio de Muerte Asociado al Receptor FAS.

FAS: CD95/APO-1. Miembro de la súper-familia de receptores de muerte TNF.

FAS L: Ligando de FAS.

FitC: Isotocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotocianato; (Fluorescein IsoTioCyanate).

GPI: Glicosilfosfoinositol

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

HMGB1: High-mobility group box 1

Hsp: Proteína de shock-térmico

IFN- γ : Interferón γ

Ig: Inmunoglobulina

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-7: Interleucina 7

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-13: Interleucina 13

IL-15: Interleucina 15

IL-18: Interleucina 18

IP3: Inosiltrifosfato

ITAM: Motivo de Activación basado en Tirosina.

ITIM: Motivo de Inhibición basado en Tirosina.

kDa: Kilo Dalton.

KIR: Receptores tipo Inmunoglobulina de las células asesinas

LcT: Linfocito T citotóxico

LIR: Receptores Inhibidores Leucocitarios

LRC: Complejo de Receptores Leucocitarios

MICA: Proteína relacionada a la cadena A de MHC I

MICB: Proteína relacionada a la cadena B de MHC I

miRNA: Micro RNA mensajeros

ml: Mililitros

MMP: Metaloproteínasa

NF- κ B: Complejo proteico que controla la transcripción del DNA.

NK: Células citotóxicas naturales. Natural Killer.

NKG2D: Receptor de Activación de células NK grupo 2, miembro D

NKG2DLs: Ligando de NKG2D

NKp30: Receptor de Activación NK30

NKp44: Receptor de Activación NK44

NKp46: Receptor de Activación NK46

NKp80: Receptor de Activación NK80

PEM: Progenitores eritroides-megacariocíticos

PGM: Progenitores Granulo-monocíticos

PI3K: Fosfatidil-inositol Kinasa

PLC: Progenitor Linfoide Común

PMC: Progenitores mieloides comunes

PMP: Progenitores Multipotentes

PBS: Tampón Salino Fosfato

RAET: Transcritos Inducidos por Ácido Retinoico

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SFB: Suero Fetal Bovino.

TCR: Receptor de linfocitos T (T-cell receptor)

TLR: Receptores de Tipo Toll (Toll-like receptors)

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α

TNF- β : Factor de Necrosis Tumoral β

ULBPs: Proteínas de unión a UL16

RESUMEN.

Las proteínas MICA/MICB se expresan como señales de alerta a nivel fisiológico para que el sistema inmune reconozca células tumorales o dañadas, y por medio de mecanismos mediados por receptores y citocinas, dichas células son eliminadas por un proceso conocido como inmuno vigilancia.

Antecedentes de nuestro grupo de trabajo han mostrado de manera fehaciente que líneas celulares epiteliales tumorales, expresan el receptor NKG2D y mediante su interacción con los ligandos MICA/MICB solubles se favorece su proliferación, escapando del reconocimiento del sistema inmune y subvertiendo el fenómeno de inmuno vigilancia. La expresión del receptor NKG2D en células epiteliales tumorales, además de células linfoides tumorales, puede tener implicaciones en el contexto del desarrollo tumoral, el proceso de metástasis y la invasividad. Por otro lado, se desconoce si las células citotóxicas NK y CD8⁺ que normalmente expresan el receptor NKG2D, expresen o secreten de forma paralela los ligandos MICA/MICB u otras moléculas conocidas como ULBP's, ya que es polémica su presencia en este contexto. Tampoco conoce si los ligandos MICA/MICB/ULBP se pueden encontrar intracelularmente. Por lo anterior, en el presente trabajo se analizó la expresión de MICA/MICB/ULBP1-3 en dos diferentes líneas linfoides tumorales, JURKAT y YTS, comparando los resultados con células NK no tumorales. Los resultados muestran la presencia de MICA/MICB/ULBP en las líneas celulares tumorales YTS (NK) y en la línea celular tumoral Jurkat (LcT) sólo se observó la presencia de MICA/MICB. Aunado a esto se observó un aumento en la proliferación de las líneas celulares YTS y Jurkat mediante la administración exógena de MICA/MICB. Concluimos que las líneas celulares YTS (NK) y Jurkat (LcT), son capaces de secretar las moléculas MICA/MICB/ULBP1-3 y que la administración exógena de MICA/MICB estimula la proliferación de YTS y Jurkat.

I. INTRODUCCIÓN.

Nuestro organismo diariamente produce grandes cantidades de células sanguíneas. En un adulto de aproximadamente 70 kg de peso, se deben producir 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas y 7×10^{10} granulocitos para mantener el status quo (Wintrobe, 1981). El objetivo de la generación de células sanguíneas también conocido como hematopoyesis es compensar la pérdida celular diaria para mantener niveles adecuados en la circulación.

1. Hematopoyesis.

La hematopoyesis es el proceso a través del cual se generan células sanguíneas y ocurre bajo condiciones específicas en la médula ósea (Torok, 1988). En este proceso complejo intervienen una gran variedad de tipos celulares y es regulado por diversos factores:

a) Compartimientos celulares

El sistema hematopoyético puede ser dividido de acuerdo al grado de madurez de las células que lo conforman y de acuerdo a los distintos linajes celulares que de él se generan. De acuerdo al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimientos.

1. Células primitivas, denominadas células troncales hematopoyéticas (CTH).

Son células con capacidad de auto-renovación (al dividirse, por lo menos una de las células hijas conserva las propiedades de la célula madre y con características multipotenciales) pueden dar origen a distintos linajes sanguíneos. Dichas corresponden al 0.01% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea con morfología linfoblastoide, las cuales expresan los antígenos CD34, CD90 y CD133 (Wognum, 2003).

2. Células progenitoras hematopoyéticas (CPH).

Estas células son originadas por las CTH y corresponden a <0.5% del total de las células en la médula ósea, presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares de acuerdo al linaje al que pertenecen (Civin, 1993).

3. Células precursoras.

Son células reconocibles por su morfología, constituyen a la mayor parte de las células de la médula ósea aproximadamente >90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular

4. Células sanguíneas circulantes.

Este tipo de células son originadas a partir de los precursores hematopoyéticos maduros.

b) Generación de linajes hematopoyéticos.

Las células blancas de la sangre o leucocitos se dividen en dos grandes grupos: células mieloides y células linfoides.

Las primeras comprenden a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, eritrocitos y trombocitos y las segundas comprenden a los linfocitos B, linfocitos T, células $\gamma\delta$ y células NK. Las células mieloides son producidas a través de un proceso conocido como mielopoyesis, mientras que las linfoides son resultado de la linfopoyesis. Ambos procesos independientes pero están muy relacionados entre sí y la interacción que existe entre uno y otro es muy estrecha (Mayani, 2007)

b.1) Mielopoyesis.

La mielopoyesis tiene lugar dentro de la médula ósea, sitio en donde las células troncales hematopoyéticas dan lugar a los progenitores mieloides comunes (PMC). Los PMC son células con una alta capacidad proliferativa, pero incapaces de auto-renovarse y cuyo potencial de diferenciación está restringido a linajes específicos (Quesenberry, 2001). Los PMC se pueden diferenciar en progenitores específicos, como son los progenitores granulo-monocíticos (PGM), y los progenitores eritroides-megacariocíticos (PEM) como se muestra en la Figura 1 (Back, 2005).

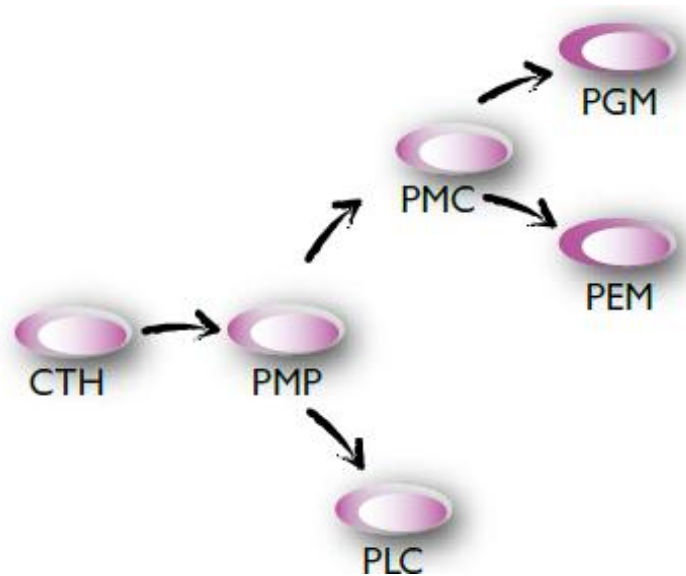


Figura 1. Muestra la mielopoyesis, en la cual la célula troncal hematopoyética (CTH) da lugar a los Progenitores Multipotentes (PMP), las cuales pierden la capacidad de autorenovarse generando al Progenitor Linfoide Común(PLC) y al Progenitor Mieloide Común(PMC) , siendo este último capaz de generar Progenitores Granulocito/Monocíticos (PGM) y a progenitores Eritroides/Megacariocíticos (PEM).(Mayani, 2007).

La maduración en cada uno de los linajes hematopoyéticos está definida por dos procesos fundamentales: la pérdida definitiva del potencial de auto-renovación y la adquisición de una identidad específica. Estos procesos son controlados por programas genéticos en donde los genes que mantienen la capacidad de auto-renovación se apagan, al mismo tiempo que los genes que regulan la diferenciación se encienden. De esta manera, los progenitores hematopoyéticos se diferencian en células precursoras, a través de una serie de eventos en donde grupos alternados de genes en asociación con diversos factores de crecimiento determinan el destino celular de una célula la cual madurará y tendrá una identidad y función definitiva.

b.2) Linfopoyesis

La producción de las células del linaje linfoide (linfocitos B, linfocitos T, células $\gamma\delta$ y células NK) es un proceso dinámico y complejo, el cual está determinado por combinaciones de factores intrínsecos y microambientales que son los encargados de guiar la diferenciación de los progenitores linfoides a partir de las células troncales hematopoyéticas (Baba, 2004.)

La diferenciación del linaje linfoide es un proceso progresivo en la médula ósea desde progenitores muy primitivos con potenciales múltiples hasta precursores restringidos que pierden opciones de diferenciación con una ganancia de funciones especializadas (Baba, 2004). Los progenitores linfoides tempranos ELPs muestran un gran potencial para generar todas las líneas de células linfoides. Dando origen a los progenitores linfoides comunes (CLPs), que son reconocidos como los más eficientes precursores de los linfocitos B y células NK en la médula ósea (Kondo, 1997)(Pelayo, 2006).

b.2.1) Células B

En la ontogenia, el desarrollo de las células B en la etapa fetal puede ocurrir en el epiplón y el hígado, mientras que después del nacimiento se confina primordialmente a la médula ósea (Busslinger, 2004).

b.2.2) Células T

Debido a que el timo no produce progenitores de renovación autóloga, la linfopoyesis de las células T es mantenida por la importación periódica de progenitores hematopoyéticos a través de la corriente sanguínea (Bhandoola, 2003).

Las bases moleculares de su entrada no han sido totalmente dilucidadas, pero se hipotetiza que pudiera ser un proceso secuencial análogo al „homing“ de leucocitos, esto es: la adhesión débil al endotelio vascular mediado por selectinas,

y la señalización vía quimiocinas, también la adhesión fuerte a través de integrinas y la transmigración (Schwarz, 2007).

b.2.3) Células NK

Las células asesinas naturales, también conocidas como células NK (del inglés Natural Killer), son una sub-población de linfocitos los cuales no pertenecen al grupo T (CD3 negativos) y tampoco al grupo B (CD19 negativos), caracterizada por su gran tamaño y por la presencia de numerosos gránulos citoplasmáticos. Las células NK constituyen entre un 14% de las células mononucleares de la sangre periférica (Bueno, 2004).

Ontogenia de las células NK

En su ontogenia las células NK comparten una vía en común con células linfoides T. Hasta tiempos actuales la relación entre células B, T y NK en su desarrollo era desconocido. Previamente se había propuesto que las células NK estaban relacionadas en su ontogenia con células T o con células mieloides, o que podrían constituir un linaje independiente.

Como es sabido las células NK maduras se producen en la médula ósea a partir de un progenitor linfoide común (CLP) el cual es derivado previamente de una célula madre hematopoyética pluripotencial. En la ontogenia de las células NK se reconocen varios pasos: el primero de ellos se da a partir del progenitor linfoide el cual se diferencia inicialmente en un progenitor bipotencial T/NK, el segundo paso es cuando este progenitor bipotencial se convierte en un progenitor NK y finalmente éste madura para dar origen a las células NK, como se muestra en la Figura 2 (Yokoyama, 2004).

Como es sabido morfológicamente las células NK son los linfocitos más grandes, poseen un diámetro de 10 a 15 μm y contienen numerosos gránulos citoplasmáticos, esta es la razón por la cual también se denominan linfocitos grandes granulares. Esos gránulos, igual que los de los linfocitos T citotóxicos, contienen perforina, granzimas, proteoglicanos (condroitín sulfato-A) y citocinas como el factor de necrosis tumoral β (TNF- β) (Moretta, 2002).

La mayoría de las células NK se encuentra en los órganos linfoides, especialmente en el bazo; no obstante, también se puede observar una importante cantidad en el hígado, en el endometrio de las mujeres embarazadas y en sangre periférica (Abbas, 2003).

Los factores de transcripción Id2 y Id3 controlan el desarrollo temprano de las células NK, mientras que los tres estadios que definen el proceso completo: el compromiso de linaje, la selección del repertorio de receptores NK y la maduración funcional son críticamente dependientes de IL-15, que mantiene la viabilidad y sostiene la proliferación de las células en desarrollo (Di Santo, 2006).

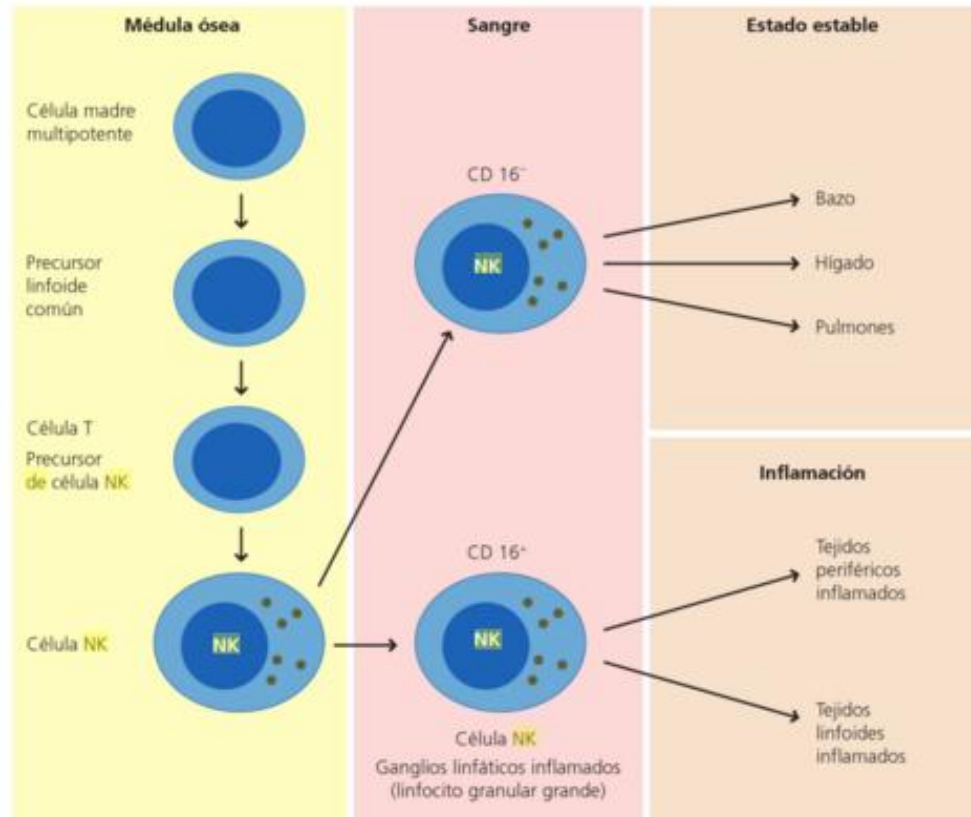


Figura 2. Ontogenia de células NK. Las células NK se desarrollan a partir de PLC en la médula ósea. Son liberadas hacia la sangre como células tipo linfocito, con gránulos citoplasmáticos conspicuos (linfocitos granulares grandes). En el estado estable, un subgrupo de células NK CD16⁻ pueden entrar al hígado, los pulmones y el bazo, o regresar a la médula ósea. Durante la inflamación otro subgrupo CD16⁺ puede reclutarse hacia tejidos inflamados y sus ganglios linfáticos de drenaje. Las células NK no son de vida prolongada; casi todas son reemplazadas a partir de precursores en días o semanas. (Mc Pherson, 2013)

Función efectora de las células NK

Los mecanismos efectores de las células NK pueden ser de dos tipos, líticos y no líticos.

1) Los mecanismos líticos incluyen tanto la destrucción directa de las células blanco como el fenómeno de ADCC. La citotoxicidad directa puede ser mediada por perforinas y granzimas, o por una apoptosis independiente de estas dos proteínas (Smith, 2005) (Lieberman, 2003).

2) La función efectora no lítica corresponde a la producción de diferentes quimocinas y citocinas inmunomoduladoras, por medio de las cuales estas células regulan la hematopoyesis, diferentes células y eventos de la respuesta inmune (Loza, 2004) (Robertson, 2002).

Citotoxicidad mediada por perforinas y granzimas

Las células NK destruyen a las células blanco por un mecanismo similar al utilizado por los linfocitos T CD8⁺, el cual involucra la liberación del contenido de los gránulos ricos en perforinas y granzimas. Las perforinas son moléculas que se integran a la membrana celular y forman poros que pueden conducir a una lisis osmótica (Podack, 1995).

Las granzimas son proteínas que entran a la célula blanco y activan el programa de apoptosis por varias vías (Simón, 1997). La incorporación de las granzimas dentro de la célula blanco no requiere necesariamente de la acción previa de las perforinas, y puede ser mediada eficiente y rápidamente por endocitosis (Trapani, 1996).

Estudios recientes sugieren que tanto las perforinas como las granzimas también pueden formar parte de un complejo macromolecular asociado al proteoglicano serglicina, el cual media la entrada de estas proteínas a la célula blanco. (Metkar, 2002).

Se han descrito 11 tipos de granzimas, de las cuales 5 se han encontrado en los humanos (los tipos A, B, H, K y M) (Simon, 1997):

1) la granzima A induce la muerte celular por una vía independiente de las caspasas, pues genera cortes en el DNA de cadena sencilla, causando fragmentación oligonucleosomal del DNA (Lieberman, 2003) (Beresford, 1999).

2) La granzima B juega un papel crítico en la activación de la apoptosis.

3) Grandes niveles de granzima K son expresados en las células NK; esta es una proteasa que, en presencia de perforinas, tiene la capacidad de mediar la muerte celular en una forma independiente de caspasas que no incluye fragmentación del DNA ni alteraciones en la mitocondria.

4) La granzima M produce cortes después de residuos alifáticos tales como metionina, norleucina y leucina.

5) La granzima H es una proteasa que hace cortes después de residuos aromáticos y causa una muerte celular caracterizada por la rápida externalización de fosfatidilserina, condensación nuclear y colapso celular.

Producción de citocinas

Las células NK representan una fuente importante de citoquinas que participan en la regulación de la hematopoyesis y de la respuesta inmune; los factores solubles más importantes que son secretados por las células NK son: IFN- γ , TNF- α , G-CSF, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, quimocinas como MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MDC y linfotactina, y las α defensinas. Algunos de estos factores son necesarios en la respuesta inicial de control de los microorganismos patógenos, así como para la promoción de la respuesta inmune adaptativa específica y de larga vida contra ellos (Robertson, 2002) (Fehniger, 1999).

Células NK y sus receptores

Las células NK derivan de un precursor CD34⁺ y completan su desarrollo en la médula ósea. Para su maduración requieren de varias citocinas, entre ellas la IL-15, que es liberada por células estromales de la médula ósea (Shibuya, 1995). Esta maduración puede ocurrir cuando se da la ausencia de un timo funcional tanto en humanos como en ratones (Dorshkind, 1985). Sin embargo, las células NK comparten un precursor común con los linfocitos T que sufre diferenciación hacia un linaje T o NK en función del microambiente (Sánchez, 1994).

Las células NK fueron descritas hace más de 30 años por su capacidad de lisar células tumorales o células infectadas con virus que no expresaban las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I). Este concepto le permitió a Klas Karre proponer la hipótesis del “missing self”, en la que se planteaba que las células NK monitoreaban los niveles de expresión de moléculas del MHC-I sobre la célula y destruían a aquellas células que por diversos mecanismos las habían dejado de expresar niveles normales de estas moléculas (Cooper, 2001), esto ocurre generalmente con células tumorales o infectadas por virus. Aunque se asoció inmediatamente a las células NK con el fenómeno de vigilancia inmunológica, el reconocimiento de células con bajos o nulos niveles de MHC-I implicaba necesariamente la existencia de receptores activadores de citotoxicidad las cuales disparaban la actividad biológica de estas células. En este sentido, las moléculas del MHC-I no son siempre necesarias para evitar la lisis por parte de las células NK.

La unión de receptores activadores a moléculas de membrana de células blanco de la sangre no solo desencadena la citotoxicidad sino que también promueve la producción de citocinas, la migración de las células NK, su activación y su proliferación. Cada célula NK parece expresar su propio repertorio de receptores activadores e inhibidores (usualmente entre 3 y 4 de cada tipo). De manera que la citotoxicidad se encuentra regulada por un balance de señales inhibitoras que interactúan con las moléculas del MHC-I y señales activadoras que reconocen moléculas relacionadas con el MHC-I en las células blanco (Bryceson, 2006).

Hoy en día podemos definir a una célula NK como un linfocito presente en todas las especies de mamíferos, dependiente de IL-15 y con capacidad de respuesta a IL-12. Las principales funciones de las células NK son la secreción de grandes cantidades de IFN- γ y la lisis de células que han perdido la expresión constitutiva del MHC y/o que expresan ligandos para estas células (por ejemplo: ligandos del receptor activador NKG2D -NKG2DLs-) (Walzer, 2007).

Existen diferentes subpoblaciones de células NK y en humanos se han identificado dos de ellas:

- 1) CD56^{dim} CD16^{bright} constituye el 90% de las células NK y son las responsables de la citotoxicidad natural, son capaces de lisar células tumorales *in vitro* e *in vivo* (Cooper, 2001) (Lanier, 2005) y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA, (Cooper, 2001)). Este tipo de células no expresa CCR7 ni L-selectina (CD62L), pero expresan altos niveles de otras moléculas de adhesión, por lo que son capaces de migrar a tejidos periféricos donde ejercen su actividad (Robertson, 2002).
- 2) CD56^{bright} CD16^{dim} o CD16⁻ constituyen el 10% de las células NK de sangre periférica; esta subpoblación constituye una fuente importante de citocinas inmunorregulatorias (IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-10, IL-13, GM-CSF) que juegan un papel importante durante el desarrollo de la respuesta inmune innata y el disparo de la respuesta inmune adaptativa. Esta subpoblación expresa altos niveles de CCR7 y L-selectina (CD62L), lo que les confiere la habilidad de migrar y establecerse en órganos linfoides secundarios, donde juega un papel importante regulando la polarización de respuesta inmune adaptativa regulando a los linfocitos T y B (Robertson, 2002).

Aunado a todo lo mencionado anteriormente se ha demostrado que la subpoblación de células NK CD56^{bright} pueden dar lugar a células NKCD56^{dim} (Romagnani, 2007).

Receptores de células NK

Los receptores de las células NK se dividen en dos: los receptores inhibidores y los receptores activadores de citotoxicidad (Cerwenka, 2001) (Moser, 2002). (Figura 3).

- 1) Los receptores inhibidores poseen una cola citoplasmática con motivos ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina o *immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*), el cual recluta tirosin-fosfatasa que previenen las funciones efectoras de las células NK. Cada receptor inhibidor es expresado por un subtipo, además todas las células NK maduras expresan al menos un receptor específico para las células del MHC-I propias. Como consecuencia de esto, todo el conjunto de células NK hace posible que se pueda detectar la pérdida de un solo alelo en las células autólogas (Moretta, 1997). La existencia de estos receptores protege a las células autólogas normales de la acción lítica de NK, prevaleciendo la acción inhibidora, para las moléculas del MHC propias, sobre la de los receptores activadores.

Entre los receptores inhibidores podemos encontrar a los receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas, a los receptores tipo lectina y a otros receptores inhibidores.

- 2) Los receptores activadores de citotoxicidad poseen una cola citoplasmática corta que posee dominios ITAM (motivo de activación basado en tirosina o *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) (Lainer, 2005) (Long, 1999). Para llevar a cabo la señalización se asocian con diferentes moléculas adaptadoras como DAP12 la unión de estos receptores a sus ligandos resulta en la activación de una cascada de fosforilación mediada por tirosininas intracelulares que son las responsables de la transducción de señales para la producción de citosinas y la movilización de gránulos secretores con alto contenido en perforina y granzimas (Moretta, 2001).

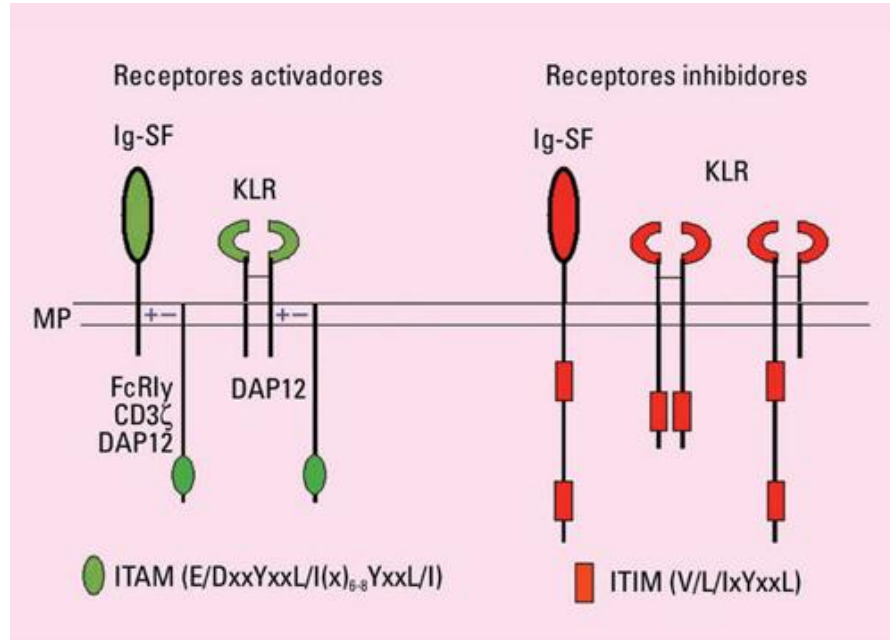


Figura 3 Características estructurales de los receptores de las células *natural killer* (NK) responsables de la función activadora o inhibidora. En la figura se muestra cómo estas características son comunes para la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig-SF) y la familia de las lectinas KLR. Además, se señalan las moléculas transductoras de la señal que se asocian con receptores activadores modelo, mediante interacciones electrostáticas llevadas a cabo por residuos cargados presentes en los segmentos transmembrana. Se muestran las secuencias consenso de los motivos ITIM y los ITAM, donde X representa cualquier aminoácido. MP: membrana plasmática. (Roda-Navarro 2005)

NKG2D.

NKG2D es una molécula de membrana de tipo II que pertenece a la familia de las lectinas tipo C. Es codificada por un gen situado en el cromosoma 12 en humanos y cercana a otros genes NKG2 en el complejo genético NK (Figura 4).

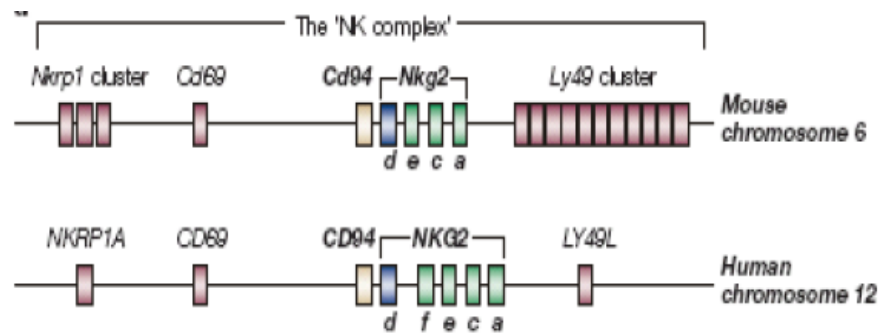


Figura 4. Esquema del gen de los receptores tipo lectina C en el ratón y en humanos (Navarro, 2001).

NKG2D fue identificado por primera vez en 1991 por Houchins y col, como un cDNA expresado por células NK humanas (Houchins, 1991). El rol de esta molécula fue ignorado hasta 1999, cuando NKG2D fue identificado como receptor de una molécula relacionada con el MHC de clase I, MICA (MHC class I chain-related gene A (Bauer, 1999)). Desde entonces NKG2D y sus ligandos fueron objeto de intensa investigación.

Este receptor se acopla a la molécula adaptadora DAP-10 de forma no covalente. DAP-10 presenta en su dominio citoplasmático un motivo YINM y recluta fosfatidil-inositol kinasa (PI3K) para la supervivencia celular y la citotoxicidad de las células (Raulet, 2003). (Figura 5.)

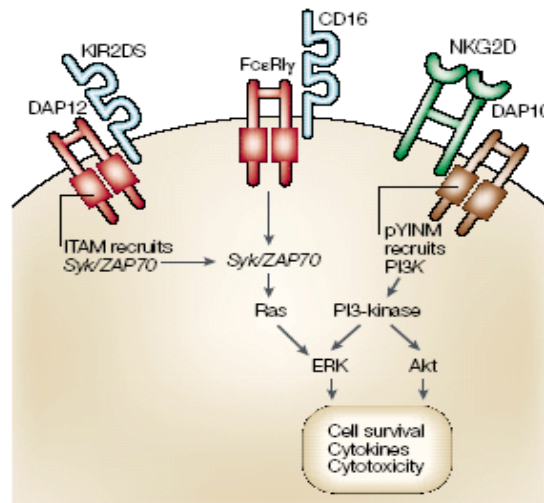


Figura 5. Receptores activadores de la célula NK (Cerwenka y col, 2001). En esta figura se representan los complejos formados por los receptores activadores con las moléculas activadoras: KIR2DS asociado a DAP-12, CD16 asociado a FcεR1γ y NKG2D asociado a DAP10.

El receptor NKG2D se expresa en las células NK, siendo incrementado tras la exposición con IL-15. Todos los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica expresan el receptor antes de su activación, incluyendo aquellos que han perdido la expresión de la molécula co-estimuladora CD28. NKG2D también es expresado por las células T $\gamma\delta$ intestinales e intraepiteliales, estas últimas expresan NKG2D en niveles bajos pudiendo ser aumentada la expresión tras la incubación con IL-15, por el contrario los linfocitos T CD4⁺ no expresan NKG2D salvo en una fracción de células T CD4⁺ de pacientes con artritis reumatoide (Groh, 2003).

Ligandos de NKG2D

En humanos, NKG2D reconoce a las moléculas denominadas *UL16 binding proteins* (ULBP), existen 3 formas diferentes de ULBPs, ULBP1, ULBP2 y ULBP3 (Cosman, 2001) (Sutherland, 2002).

Este grupo de moléculas de superficie ancladas a GPI (glucofosfatidilinositol) se expresan en algunos tejidos normales, pero se ha observado que se expresan en mayores niveles en tumores de diversos fenotipos (Cosman, 2001) (Sutherland, 2002). Del mismo modo, se ha detectado la expresión de las proteínas integrales de membrana ULBP-4 (RAET1E) y RAET1G en diferentes líneas tumorales (Cao, 2007) (Bacon, 2004). En humanos, así como en varias especies de mamíferos pero no en ratón, existe otro grupo de NKG2DLs (las proteínas integrales de membrana denominadas MICA y MICB, (Bauer, 1999) como se muestra en la Figura 6.

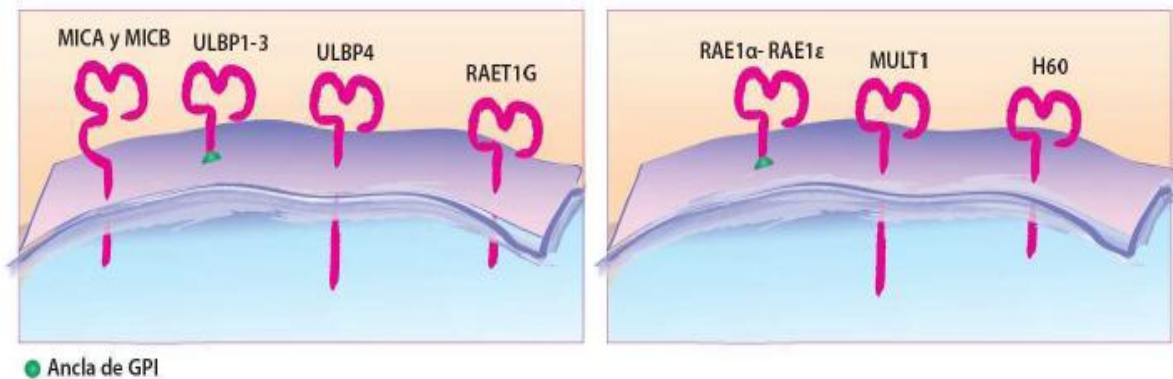


Figura 6. Representación esquemática de los ligandos de NKG2D. Tanto en humanos (izquierda) como en ratón (derecha) algunas de estas moléculas están ancladas a GPI y otras poseen dominios transmembrana. (Eagle, 2007).

2. NKG2D/NKG2DL en evasión inmune

A pesar de la inmunovigilancia, la presencia de un tumor indica que el cáncer que se está desarrollando fue capaz de evadir la respuesta inmune. El incremento del tamaño del tumor o el proceso de metastasis frecuentemente exhibe estrategias que promueven la evasión del reconocimiento inmune (Marincola, 2000), tales como la exclusión física de las células inmunes desde el sitio del tumor, pobre inmunogenicidad debido a la reducida expresión de moléculas MHC o proteínas coestimuladoras y rompimiento del reconocimiento celular por parte de las células NK y NKT (Groh, 2002), sumado a esto los tumores pueden suprimir la inmunidad de ambas formas, sistémicamente y en el microambiente tumoral (Ravinovich, 2007), debido a la producción de moléculas inmunosupresoras que previenen el inicio de una respuesta inflamatoria, tales moléculas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Teicher, 2007) y Fas ligando (Fas-L) (Houston, 2003), la interleucina 10 (IL-10) que interfieren con la activación y diferenciación de las células dendríticas o por bloqueo de la producción de moléculas proinflamatorias. Si la respuesta es inducida, las células tumorales pueden escapar a la eliminación por la pérdida de antígenos blanco, la generación de células T y eliminando a las células T respondedoras (Staveley-O'Carroll, 1998).

Se ha planteado que podría existir una selección negativa sobre las células tumorales que expresan NKG2DLs sobre su superficie. Investigaciones en melanoma indican que la expresión de los ligandos MICA/MICB/ULBP"s depende del estado de avance tumoral, existiendo una alta expresión de éstos en las lesiones primarias, pero disminuye en las lesiones metastásicas. Esto sería una forma de escape de la inmunovigilancia por parte de los tumores, debido a que con el tiempo quedarían sólo las células que no expresan o poseen una baja expresión de los NKG2DLs (Vetter, 2009).

En gliomas está reportada la expresión reducida de MICA y ULBP2 asociándolos a una progresión maligna y a metástasis. Esto indica que la inmunogenicidad de los gliomas decrece a medida que se incrementa el grado de malignidad, posiblemente mediante un proceso de selección que favorece la sobrevivencia de la célula menos inmunogénica. Los niveles de MICB y ULBP1 no se modifican en el glioma en relación a su estado de avance, solo ULBP3 disminuye levemente en el estadio metastásico (Eisele, 2006).

El comportamiento de los NKG2DLs en la membrana en la progresión tumoral se correlaciona directamente con la expresión de citocinas inmunosupresoras como TGF- β y de MMP (Stiles, 1997) (Kjellman, 2000). La expresión de MMP está incrementada en casi todos los tipos de cáncer y se ha implicado en la invasión tumoral y metástasis debido a su habilidad de degradar a la matriz extracelular (Coussens, 2002). Existe evidencia de la sobreexpresión de MMP en tumores y la liberación a la circulación de MICA por parte de las células tumorales MMP, que corta a MICA en la superficie del tumor generando así una fracción soluble sérica que funcionan como NKG2DLs (Waldhauer, 2008).

Se han detectado formas solubles de MIC-A/B (sMIC) en la circulación y su relación con la disminución de la cantidad y funcionalidad del receptor NKG2D en la superficie de las células T citotóxicas y NK (Groh, 2002). Las formas solubles de MIC A/B desactivan la inmunidad de las células NK, debido a que pueden actuar como inhibidor competitivo bloqueando el reconocimiento de moléculas MIC unidas a la membrana. Incluso, se ha observado una correlación entre los niveles de sMIC en suero y la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de próstata (Wu, 2004) con valores significativamente más altos que en individuos sanos o pacientes con enfermedades benignas (Holdenreider, 2006).

Inducción de NKG2DL

La expresión de MICA y MICB aumenta en muchas líneas celulares tumorales y tumores primarios de origen epitelial. Se piensa que esto es el resultado de la activación de la transcripción de elementos de shock térmico, lo cual se sabe que acompaña a la transformación celular en un proceso tumoral. Además, se ha visto en células dendríticas que la expresión de MICA y MICB puede ser inducida por INF- α . Se ha demostrado recientemente que ciertos agentes genotóxicos productores de estrés o inhibidores de la replicación del DNA pueden aumentar la expresión de NKG2DLs a través de ATM (ataxia telangiectasia mutada) y ATR (ATM y Rad3 relacionada) proteína quinasa en fibroblastos humanos y/o líneas tumorales murinas induciendo su destrucción por las NK (Silloh, 2006) (Soriani, 2009).

La respuesta NKG2D/NKG2DL se ve incrementada por el microambiente inflamatorio generado por la interrelación de vías de la respuesta inmune innata como la maduración de células dendríticas y la producción de citocinas, el reconocimiento de proteínas liberadas en procesos de necrosis, la activación de TLR, etc. La modulación mediada por citocinas es un fenómeno que podría explicar la variación en la expresión de éstos durante el desarrollo de una masa tumoral. Las citocinas inmunoactivadoras para NKG2D son inductoras también de la expresión de los ligandos en la célula blanco, estos son IFN γ , IL12, IL15 e IL-18 (Song, 2006) (Zhang, 2008) aunque aún no se ha descrito los mecanismos por el cual actúan. Sí se conoce que los promotores de los NKG2DLs presentan elementos de respuesta para proteínas de shock térmico (HSP), ATF, ERK/JNK y NF κ B, vías inducidas por estas citocinas y las proinflamatorias en general (Venkataraman, 2007). La liberación de proteínas inducidas en estados de estrés como con las HSP favorece la respuesta mediada por NK y estimulan la inducción de NKG2DLs, además de favorecer el ambiente inflamatorio y la maduración de células dendríticas (Elsner, 2009) (Qiao, 2008). Adicionalmente, en el promotor de los NKG2DLs existen elementos de respuesta a estas proteínas, que podría asociarse a la inducción de los ligandos en casos de shock térmico e indicar vías autocrinas y paracrinas de activación de las células en el microambiente tumoral (Venkataraman, 2007). Las HSP pueden ser reconocidas por TLR4 en un ambiente inflamatorio aséptico, junto a otras moléculas liberadas durante un daño inflamatorio como HMGB1 o proteínas de la matriz (Kluwe, 2009), la función proinflamatoria de los TLR se ha asociado a la inducción de NKG2DLs en

experimentos in vitro. La activación de TLR4 con LPS genera una inducción de MICA en superficie (Kloss, 2008). Estudios en gliomas indican que la expresión de MICA y ULBP2 decrecen a medida que aumenta el grado de malignidad, mientras que MICB y ULBP1 se expresan independientemente del grado tumoral (Friese, 2004).

Regulación de NKG2DL

Mecanismos descritos en los últimos años involucran a las citocinas para explicar la evasión de la inmuno vigilancia por parte del tumor, las cuales, dependiendo del tipo y del contexto, podrían aumentar o disminuir la expresión en superficie de los NKG2DL. Las citocinas son un grupo heterogéneo de pequeños péptidos solubles o glicoproteínas, las que ejercen efectos pleiotrópicos, como promover el crecimiento, diferenciación y activación de las células. Estas moléculas pueden tener actividad pro o anti-inflamatoria. Además de una función inmunosupresora, lo que depende del microambiente en el que se encuentren. El microambiente tumoral es rico en citocinas y otros mediadores inflamatorios que estimulan la inmuno supresión, crecimiento de las células tumorales, reorganización del tejido y angiogenesis (Seruga, 2008).

Se ha observado que el efecto de IFN γ y TGF- β es inverso, estas citocinas son capaces de disminuir la expresión de los ligandos, favoreciendo la evasión de la respuesta citotóxica y la sobrevivencia de las células tumorales (Eisele, 2006) (Schwinn, 2009). Los mecanismos descritos para estas citocinas es la disminución de la expresión de NKG2D a través de membranas exocíticas en el caso de TGF- β (Clayton, 2008) (Eisele, 2006) (Huang, 1999) y disminución de los ligandos en el caso de IFN γ , donde hasta el momento se han descrito inducción de MPP e inducción de miRNA anti MIC (Schwinn, 2009). Se ha observado que INF- α aumenta la expresión de MICA en la superficie de células tumorales y, contrariamente, INF- γ la disminuye (Zhang, 2008).

3. Familia de genes MIC

La familia de genes MIC fue identificada en 1994 por el grupo de Spies cuando buscaba nuevos genes en la región del HLA-B (Bahram, 1994). Esta familia se compone de dos genes (MICA y MICB) y 4 pseudogenes (Bahram, 1994) (Leelayuwat, 1994), cuya ubicación se muestra esquemáticamente en la siguiente Figura:

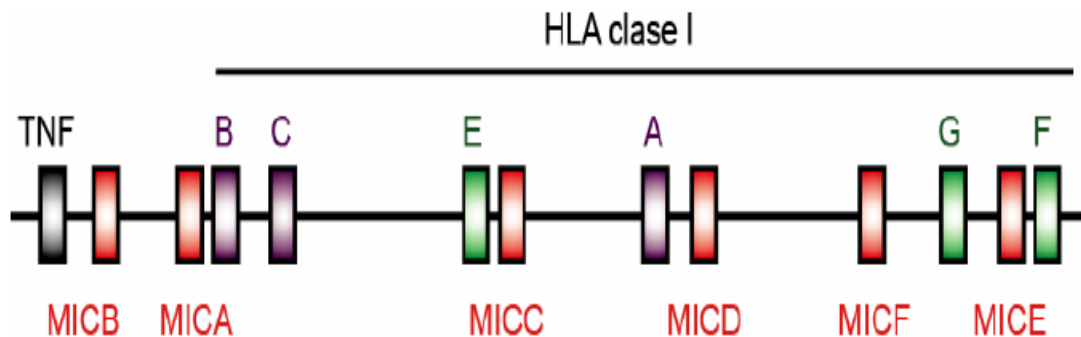


Figura 7. Ubicación de los genes de la familia MIC en la región de clase I del HLA. Se muestran los genes para las moléculas de clase I HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G, así como los 2 genes (MICA y MICB) y 4 pseudogenes (MICC, MICD, MICE y MICE) de la familia MIC. (Bahram, 1994)(Leelayuwat, 1994).

Se ha demostrado que los genes MIC están conservados en muchos mamíferos, entre los que se encuentran primates (chimpancé, orangután, babuino, gibón), cabra, cerdo, vaca, perro y hámster (Bahram, 1994) (Steinle, 1998). Sin embargo, no se ha encontrado dicho gen en el genoma murino. No obstante, se ha descrito una familia de genes en ratón denominada Mill (*MHC class I-like located near the LRC*), compuesta por los genes *Mill 1* y *Mill 2* que están relacionados con MICA y MICB (Kasahara, 2002) (Rabinovich, 2008).

4. Genómica y Genética de MICA.

Los genes MICA y MICB son de 11,7 kpb y 12,9 kpb, respectivamente. Son inusualmente largos comparados con los genes del HLA, que tienen una longitud promedio de 3,5 kpb (Bahram, 1996) (Bahram, 1996). Sin embargo, la estructura genómica general semeja aquella de los genes de clase I del CMH, donde cada dominio está codificado por un exón diferente (Barclay, 1999). MICA posee un primer intrón muy largo (Bahram, 1994) donde existen sitios de unión para factores de transcripción como NFκB (Molinero, 2004).

Transcripto y proteína de MICA

El gen de MICA codifica para un ARNm de 1.382 nucleótidos (nt) que contiene un marco de lectura abierta de 1.149 nt, originando un polipéptido de 383 aminoácidos con un peso molecular de 43 kDa (Bahram, 1994). Esta longitud varía de acuerdo al número de repeticiones de alanina del segmento transmembrana de diferentes alelos (Mizuki, 1997). El gen de MICB genera un transcripto de 2.376 nt y un marco de lectura abierto de la misma longitud que MICA, con quien comparte un 83% de similitud de secuencia aminoacídica (Bahram, 1996). La homología entre MICA y otros genes del HLA de clase I es muy baja, siendo de 15 a 21% en el dominio $\alpha 1$, 19 a 30% en el dominio $\alpha 2$ y 32 a 36% en el dominio $\alpha 3$ (Bahram, 1994). Esta baja homología entre miembros de la familia de genes MIC y los genes de clase I del HLA es reflejo de una diversificación muy temprana en la evolución.

El polipéptido de MICA neosintetizado consta de 383 aminoácidos, contiene un péptido líder para la translocación al retículo endoplasmático (RE), tres dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, un segmento hidrofóbico de transmembrana y una cola citoplasmática relativamente corta (Bahram, 1996). En células epiteliales polarizadas se observó que la cola citoplasmática dirige a esta molécula a la superficie basolateral (Suemizu, 2002). El dominio $\alpha 3$ carece de la secuencia de unión al correceptor CD8. La presencia de 8 sitios de N-glicosilación en MICA y 5 en MICB, contrasta con el único sitio de glicosilación de las moléculas clásicas de clase I, el que a su vez está ausente en MICA y MICB (Bahram, 1996).

La proteína MICA nativa está altamente glicosilada, lo que incrementa su peso molecular de 43 kDa (péptido desnudo) a 65 kDa (proteína madura (Groh, 1996). Además, no requiere de β_2 -microglobulina ni del procesamiento antigénico o de las proteínas TAP para su expresión en superficie (Groh, 1998) (Zwirner, 1998).

En 1999 se cristalizó la porción extracelular del alelo MICA*001 (**Figura 8** (Li, 1999) y se pudo observar que efectivamente el hipotético bolsillo de unión de péptido es muy angosto (10 Å de ancho) como para contener un ligando, comparado a los 18 Å del bolsillo de las moléculas clásicas de clase I del CMH. Además, la estructura obtenida confirmó que MICA no se une a β_2 -microglobulina

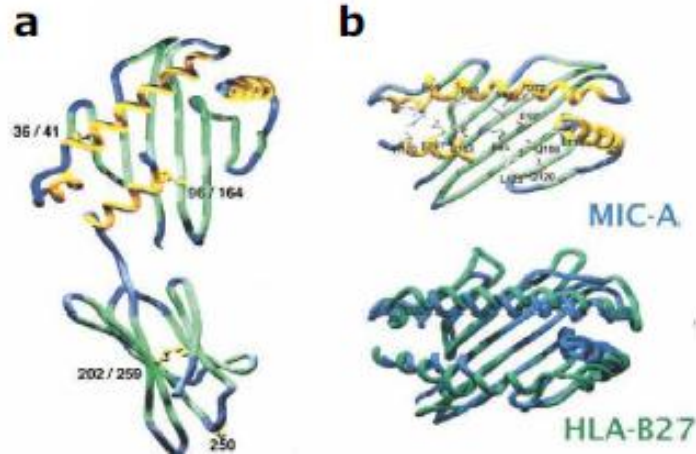


Figura 8. Estructura cristalográfica de MICA: a) La estructura de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ responden a la estructura general de las moléculas de clase I del CMH, pero b) el bolsillo formado por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es demasiado angosto para contener un péptido, comparado con la molécula clásica HLA-B27. Tomado de (Li, 1999).

5. Polimorfismo

Al igual que los genes de clase I del HLA, MICA y MICB son polimórficos y se expresan de forma codominante (Moliner, 2002), conociéndose hasta la fecha más de 60 alelos de MICA (Fodil, 1996) (Quiroga, 2006) (Cox, 2009) y 30 alelos de MICB (Ando, 1997) (Visser, 1998) (Pellet, 1997). La mayoría de los sitios polimórficos varían en posiciones nucleotídicas no redundantes, con predominancia en los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Una lista actualizada de los alelos de MICA y MICB se encuentra en el sitio de Internet del *The Anthony Nolan Trust* (<http://www.anthonynolan.org.uk/research/hlainformaticsgroup/>).

La gran divergencia entre MICA y MICB reside dentro de los respectivos exones del segmento transmembrana. A diferencia de MICB, MICA posee variaciones en el número de repeticiones de la secuencia en tándem GCT, que codifica para diferente número de alaninas (Mizuki, 1999). Basado en el número de estas repeticiones, los alelos se denominaron A4 (4 repeticiones de la secuencia GCT), A5 (5 repeticiones de la secuencia GCT), A6 (6 repeticiones de la secuencia GCT), A9 (9 repeticiones de la secuencia GCT), A10 (10 repeticiones de la secuencia GCT) y A5.1. Este último es idéntico a A5 excepto que posee una inserción (G) que genera un corrimiento del marco de lectura y un codón de terminación prematuro dentro de la región transmembrana (Ando, 1997). Además, el alelo ICA*010 codifica para una proteína inestable que es degradada rápidamente dentro de la célula y que no alcanza a expresarse en superficie celular (Li, 2000).

Los alelos más frecuentes en diferentes grupos étnicos son MICA*008, seguido por MICA*002, MICA*004 y MICA*010, dependiendo de las poblaciones (Petersdorf, 1999). Los genes MIC parecen no ser esenciales para la vida, ya que por una delección en la región del CMH, el 0,1024% de la población japonesa

carece completamente del gen de MICA y el gen de MICB contiene un codón de terminación prematuro (Komatsu-Wakui, 1999). A diferencia de las graves consecuencias de la ausencia de genes funcionales de clase I o clase II del CMH, los individuos MIC son aparentemente normales. Probablemente esto se deba a que NKG2D es un receptor promiscuo que reconoce a MICA, MICB y otros ligandos.

Patrón de expresión y modulación de MICA

Hasta hace muy poco tiempo atrás se creía que MICA tenía un patrón de expresión restringido a células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, monocitos y epitelio gastrointestinal, y que no se expresaba en linfocitos T o B en reposo (Groh, 1996) (Zwirner, 1998) (Zwirner, 1999). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que se puede detectar el ARNm tanto de MICA como MICB en una amplia variedad de tejidos (con excepción de las células del sistema nervioso central), lo que indica que existe la posibilidad de que se expresen dichas proteínas y en consecuencia puedan detectarse en la membrana celular (Schrambach, 2007).

En la región promotora de MICA se ha demostrado la existencia de un elemento regulador de la respuesta al choque térmico, similar al que se encuentra en el gen de la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70, (Groh, 1996)) y en otros genes que se inducen frente a estímulos de estrés. Como era de esperar, MICA se induce por choque térmico (Groh, 1996) y estrés oxidativo (Yamamoto, 2001) en líneas de carcinoma humano. Por otro lado, fibroblastos y células endoteliales sometidas a un estrés biológico como lo es la infección con citomegalovirus humano (CMV) aumentan los niveles de expresión de MICA (Groh, 2001). No obstante, se ha observado que las células infectadas con este virus escapan al reconocimiento por células T debido a que expresan productos virales que impiden el procesamiento de antígenos y la expresión de moléculas clase I del CMH (Yewdell, 2002). Sin embargo, al inducir la expresión de MICA, el virus facilita el reconocimiento a través de NKG2D, lo que aumenta fuertemente la respuesta mediada por células citotóxicas T $\alpha\beta$ CD8+ específicas del virus (Groh, 2001). No obstante, el aumento de MICA se ve contrarrestado por la proteína viral UL16, la que es capaz de inducir la degradación de MICA (Zou, 2005).

Llamativamente, el alelo más frecuentemente encontrado en diversas poblaciones, MICA*008 que posee una inserción que genera un codón stop prematuro y una proteína truncada que carece de la porción citoplasmática, pero que mantiene su capacidad de estimular a las células NK –*natural killer*-, es resistente a esta degradación (Zou, 2005). Por lo tanto, aquellas personas portadoras del alelo MICA*008 serían más resistentes a la infección por CMV. De esta manera, la interacción con patógenos como el CMV durante el transcurso de la evolución, pudo haber ejercido una presión selectiva para el desarrollo del polimorfismo de los genes MIC. Por otro lado, los linfocitos T $\gamma\delta$ (V γ 2V δ 2) que tienen la capacidad de expresar el receptor NKG2D, poseen un rol importante en la respuesta inmune contra la bacteria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (La

infección de células dendríticas (CDs) y de líneas epiteliales con *Mycobacterium tuberculosis* también induce un aumento en la expresión de MICA en la superficie de dichas células tanto *in vivo* como *in vitro* (Das, 2001) lo que las hace susceptibles al reconocimiento por NKG2D presente en linfocitos T $\gamma\delta$ (V γ 2V δ 2).

Este reconocimiento permite potenciar la respuesta celular dependiente del TCR contra antígenos no peptídicos y a superantígenos, por lo que en determinadas circunstancias MICA actuaría como molécula coestimuladora (Das, 2001).

Asimismo, la infección de líneas epiteliales con bacterias del grupo de *Escherichia coli* también induce la expresión de MICA en superficie, e induce la liberación de IFN- γ en la línea celular NKL (Tieng, 2002).

Por lo tanto, estos hallazgos indican que MICA funcionaría como un sensor de homeostasis celular. El reconocimiento de células que han inducido expresión de altos niveles de MICA en superficie celular por estímulos de estrés, activación celular o infección induce su destrucción en forma NKG2D-dependiente por parte de células citotóxicas (Groh, 1996) (Groh, 2001) (Zou, 2005) (Bauer, 1999) (Pende, 2001). Este fenómeno, constituye un novedoso mecanismo de eliminación de células infectadas.

6. El receptor NKG2D es expresado en líneas de células epiteliales tumorales de cáncer de cérvix

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han permitido demostrar que la presencia del receptor activador NKG2D no es exclusiva de linfocitos T y células NK debido a que encontramos que la expresión de este receptor también está presente en células epiteliales de cáncer de cérvix humano (Weiss-Steider B et al). Este hecho, reportado por primera vez por nuestro grupo nos hizo pensar en la función que podría tener el receptor NKG2D en las células tumorales mismas y demostramos que esto favorece su proliferación al reconocer los ligandos solubles MICA y MICB con lo que no únicamente evita el reconocimiento y su eliminación por las células linfoides efectoras (NK y T) sino además aprovecha la co-expresión del receptor activador NKG2D para incrementar la proliferación de las células tumorales

7. Líneas linfoides co-expresan las proteínas MICA y MICB

Debido a que la presencia del receptor activador NKG2D es constitutiva en células linfoides citotóxicas como las NK y T como parte de la respuesta inmune innata y se acepta que se une a los ligandos MICA y MICB como parte del proceso de inmunovigilancia que lleva a cabo de manera natural en este trabajo se analizó la posibilidad de que líneas tumorales linfoides de NK y T pudieran co-expresar los ligandos MICA/MICB como un mecanismo producido por su estatus de transformación tumoral.

Fuertes y su grupo de trabajo demostraron que MICA se induce en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ estimulados con células halogenicas in vitro, proceso en el que interviene la microagregación del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora CD28 (Molinero,2002). Sin embargo, en la superficie de linfocitos T CD4⁺ activados solo se detecta una mínima expresión de MICA. Esto podría constituir un mecanismo para protegerlos de la lisis mediada por células NK en un microambiente tumoral o inflamatorio (Molinero, 2006). No obstante, otros autores detectaron expresión de MICA en la superficie tanto de linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ lo que los hace susceptibles a la lisis por células NK autólogas, limitando de esta manera la respuesta T (Cerboni, 2007).

Por otra parte, se ha observado que carcinomas de mama, pulmón, ovario, próstata, colon, riñón y melanomas expresan altos niveles de MICA, por lo que se ha asociado la expresión de esta proteína a la neotransformación (Pende, 2002) (Vetter, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN.

Las células tumorales epiteliales son capaces de secretar las moléculas MICA y MICB como mecanismo de evasión de la respuesta inmune tumoral. Aunado a esto nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las células tumorales epiteliales también poseen la capacidad de expresar el receptor NKG2D para inducir una mayor proliferación (Weiss-Steider, Mendoza-Rincon, 2011). Sin embargo, aunque esto ocurre con células epiteliales tumorales, hasta la fecha no se ha explorado si las células linfoides positivas para NKG2D poseen la misma capacidad de expresar simultáneamente a MICA/MICB con lo cual se demostraría que una célula en hiperproliferación, generalmente tumoral, presenta este fenómeno que probablemente está asociado al proceso oncogénico y de metástasis.

Por otro lado, hay debate acerca de si las células linfoides en proliferación constante expresan de manera simultánea las proteínas de estrés fisiológico MICA/MICB ya que no en todos los casos se detecta la presencia de estas proteínas. Además, hay otros ligandos que reconocen al receptor NKG2D diferentes a MICA/MICB.

Por lo anterior, en el presente trabajo se analizó de manera paralela en dos líneas de tumor linfoides la expresión del receptor activador NKG2D y de sus ligandos: MICA/MIB y ULBP 1, ULBP2 y ULBP3 y se evaluó la administración exógena de estas proteínas en aumentar su estatus proliferativo y se determinó la inhibición al emplear anticuerpos específicos dirigidos contra los ligandos MICA y MICB.

La importancia del eje NKG2D-MICA/MICB/ULBPs es un área de la oncogénesis tumoral de relevancia actual por lo que consideramos que el análisis de estas proteínas y su receptor en líneas tumorales linfoides contribuye al conocimiento de los mecanismos involucrados en el creciente interés de este eje el escape tumoral y la oncogénesis.

III. HIPÓTESIS

Las líneas celulares de linfoma humano de NK y de leucemia aguda de linfocitos T portadoras del receptor activador NKG2D expresan de manera paralela a los ligandos MICA, MICB y ULBPs. Por lo tanto son susceptibles de aumentar su proliferación con la administración exógena de MICA/MICB.

IV. OBJETIVOS

❖ OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la expresión del receptor NKG2D y sus ligandos MICA, MICB, ULBP1, 2 y 3 en células de tumor de NK y de leucemia aguda de linfocitos T, analizando su contribución al proceso de proliferación.

❖ OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Mantener las líneas celulares linfoides YTS y Jurkat en condiciones de cultivo
2. Realizar la extracción de células sanguíneas y estimularlas con IL-15.
3. Analizar la expresión de los ligandos MICA y MICB y su receptor NKG2D mediante la técnica de Citometría de Flujo (FACS) en las líneas celulares de interés.
4. Buscar la expresión de los ligandos MICA y MICB, tanto como su receptor NKG2D por medio de la Inmunohistoquímica en las líneas linfoides humanas y en las células linfoides normales NK.

V. METODOLOGÍA

Cultivo de las células linfoides humanas: YTS y Jurkat.

Las células linfoides humanas YTS (células de linfoma de NK) y Jurkat (linfoma T) (Carsten,2017) fueron obtenidas del Laboratorio de Bioquímica en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán, éstas fueron mantenidas y cultivadas en frascos para cultivo celular de 25 cm² (CORNING) en medio RPMI-1640^(MICROLAB) suplementados al 10% SFB (Suero Fetal Bovino) (GIBCO).

Los cultivos se mantuvieron a 37°C, con un 5% de CO₂ y a una atmósfera húmeda a saturación en incubadora^(SANYO MCO-17AIC).

Para poder realizar los ensayos con estas células, se utilizaron los cultivos en fase de crecimiento exponencial.

Obtención de las células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvieron 40mL de sangre periférica (SP) de un voluntario clínicamente sano, los cuales fueron recolectados en tubos vacutainer con EDTA, posteriormente las muestras de SP se colocaron en tubos cónicos estériles^(CORNING) de 15ml, éstos se centrifugaron^(CENTRIFUGA BECKMAN) a 2000rpm durante 10 minutos para separar el plasma del paquete celular. Posteriormente se retiró el plasma y todo el volumen celular se disolvió con el mismo volumen de PBS^(Ver apéndice), el cual se virió por las paredes en varios tubos cónicos estériles^(CORNING) de 15ml que contenían ficoll-histopaque^(SIGMA-ALDRICH), en una relación (1:2). Los cuales se centrifugaron^(CENTRIFUGA BECKMAN) a 1500-2000rpm durante 30 minutos, después se colectó el anillo leucocitario y éste se transfirió a un tubo cónico estéril^(CORNING) de 15ml, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X^(Ver apéndice) y se centrifugaron^(CENTRIFUGA BECKMAN) a 1500rpm durante 5 minutos para cada lavado, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de RPMI-1640^(MICROLAB).

Las células obtenidas se sembraron en cajas petri de vidrio^(PYREX) en un volumen total de 10ml de RPMI suplementado al 20% de SFB, las cuales se incubaron durante 2 horas para que se separaran las células adherentes de las no adherentes, transcurrido este tiempo se cosecharon las células en suspensión en un tubo estéril^(CORNING) de 15 ml, la suspensión celular se centrifugó^(CENTRIFUGA BECKMAN) a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el botón celular en 1ml de RPMI aproximadamente, éstas se incubaron en frascos para cultivo celular de 25cm²^(CORNING) en RPMI suplementado al 10% de SFB con IL-15^(R&D SYSTEMS) (10ng/ml) durante dos semanas, manteniéndolas a 37°C, con un 5% de CO₂ y una atmosfera húmeda a saturación en incubadora^(SANYO MCO-17AIC).

Purificación de células NK mediante selección negativa

Para esta técnica se realizó primeramente la extracción de células mononucleares por medio de la técnica mencionada anteriormente, una vez obtenidas estas células se procedió a la separación de células NK mediante selección negativa utilizando el kit Easy Sep Negative Selection Human NK Cell Enrichment Cocktail, para ello se utilizó una suspensión de células mononucleares a una densidad de 5×10^7 células /ml en el medio recomendado (ver apéndice). Posteriormente las células se colocaron en un tubo de polystireno de 12X75mm (Falcon TM).

Se añadieron 50µl/ml del cocktail de selección negativa para células NK Easy Sep a las células, se mezclaron bien y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agitó la muestra para asegurar una suspensión uniforme, después se agregaron 50µl/ml de las micropartículas magnéticas del kit, se mezclaron bien y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos.

Las células en suspensión se llevaron a un volumen total de 2.5 ml añadiendo el medio recomendado (ver apéndice), se mezclaron las células en el tubo pipeteando suavemente entre dos y tres veces, se colocó el tubo con las células dentro del magneto Easy Sep, se reservaron durante 2.5 minutos.

Se tomó el magneto Easy Sep con el tubo y se llevó a cabo la inversión de éste en un movimiento continuo derramando la fracción a un nuevo tubo de 12x75 mm de polystireno, esto con la finalidad de separar las células enriquecidas seleccionadas negativamente.

Análisis de expresión de los ligandos MICA y MICB y su receptor NKG2D mediante la detección de proteínas intracelulares por Citometría de Flujo (FACS)

Se recuperaron las células linfoides humanas YTS y Jurkat y las células NK de SP, se les realizó un lavado con PBS 1X (ver apéndice) colocándolas en tubos cónicos esteriles (CORNING) de 15ml y se centrifugaron (CENTRIFUGA BECKMAN) durante 5 minutos a 1500rpm, se determinó el número celular con una pequeña alícuota con ayuda de la cámara de Neubauer (MARIENFELD-SUPERIOR). Se colocaron aproximadamente 2×10^6 de células de cada línea en tubos para microcentrífuga (EPPENDORF) con capacidad de 1.5ml, en donde se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 2% (ver apéndice) a una temperatura de 4°C en agitación constante transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados con 100µl de solución de saponina al 0.3% (ver apéndice) cada lavado y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm (EPPENDORF) a 4°C. Se incubaron las células con los anticuerpos primarios (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 y NKG2D) (R&D SYSTEMS) en 300 µl de solución de saponina al 0.1% (ver apéndice) durante una hora con treinta minutos y estas se mantuvieron en agitación constante a 4°C, transcurrido el tiempo de incubación las líneas celulares se centrifugaron durante 5 minutos 1500 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con solución de saponina al 0.3% (ver apéndice) y las mismas se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C.

Se incubaron las células con el anticuerpo secundario marcado con FITC50^(THERMO SCIENTIFIC) con solución de saponina al 0.1%, durante una hora en agitación constante y manteniéndolas a 4°C, transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados con PBS-SFB al 5% (5 min a 1500 rpm) a 4°C, se fijaron de nuevo las células durante 20 minutos con paraformaldehído ^(Ver apéndice) a 4°C y se lavaron dos veces con PBS-SFB (5 min, 1500 rpm a 4°C), se colectó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS^(Ver apéndice) y éstas se colocaron en tubos para citometría y cada línea celular se analizó en el Citómetro FACS Flow.

Expresión de los ligandos MICA y MICB y su receptor NKG2D por medio del procedimiento para teñir laminillas para inmunocitoquímica con Diaminobenzidina (DAB) Peroxidasa

Las células linfoides humanas YTS, Jurkat y células NK de SP se fijaron una solución de metanol/acetona 1:1 durante 30 minutos y se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 0.03% durante 5 minutos, posteriormente se lavaron en agua para eliminar los residuos de peróxido, y las células se colocaron en tubos para microcentrífuga^(EPPENDORF) con capacidad de 1.5 ml y se bloquearon con SFB (Suero Fetal Bovino)^(GIBCO) al 5% durante 30 minutos en agitación, transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados con PBS para eliminar la solución de bloqueo, se detectó el antígeno buscado en las células las cuales fueron cubiertas con 10µl de anticuerpo primario por ml de BSA al 1%.

Las células se incubaron toda la noche en una cámara húmeda, después del tiempo transcurrido se retiró la solución de anticuerpo y se les realizó un lavado con PBS, éstas se incubaron con el anticuerpo secundario Peroxidasa anti-ratón durante 70 minutos a una concentración de 10µl de anticuerpo por ml de solución de PBS-BSA 1% o SFB-PBS al 5%. Posteriormente se lavaron 2 veces con solución de PBS, esto con el objetivo de revelar los sitios de las células donde se fijaron los anticuerpos, se preparó el substrato de peroxidasa (OPD) y se incubaron las células con la solución OPD durante 1 ½ horas a temperatura ambiente y en agitación constante, se retiró el sobrenadante y se colocaron en placas de 96 pozos, se realizaron las lecturas correspondientes en el lector de ELISA BIO-RAD a 450nm. Se enjuagaron las células con PBS para eliminar la solución y las células se montaron en laminillas con ayuda alcohol absoluto^(ALDRICH) y solución de bálsamo de Canadá disuelta en Xileno^(SIGMA), las preparaciones celulares se dejaron secar durante 24 horas y posteriormente se observaron al microscopio óptico acoplado a un sistema computarizado de adquisición de imagen, las microfotografías tomadas se almacenaron en forma digital en un archivo usando el programa LEICA versión 2.3 para su análisis.

Determinación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta

Las líneas celulares YTS y Jurkat y también las células normales linfoides NK se sembraron en placas de 96 pozos (10,000 células por pozo) y se estimularon con MICA, MIC B y α -NKG2D a una concentración de 10 ng/ml, durante 24, 48 y 72 horas transcurridos los tiempos de incubación se procedió a evaluar la proliferación celular por medio de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta a los núcleos celulares, la cual consistió en fijar las células con glutaraldehído al 1.1% (Ver apéndice), para después lavar y secar las placas al aire.

Se añadieron 50 μ l/pozo del colorante al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico con un pH 6.0 y se mantuvieron durante 10 minutos en agitación constante. Después de la tinción, se lavaron tres veces las placas de cultivo con agua desionizada o bidestilada, de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos.

Posteriormente se añadieron 50 μ l de ácido acético al 10%, y las placas se dejaron en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente para desteñir a las células y que el colorante quede en suspensión de forma homogénea.

Finalmente, se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA a 595 nm, y las densidades ópticas se graficaron.

VI. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

1. Expresión de los ligandos MICA y MICB y su receptor NKG2D por citometría en la línea de tumor de NK (YTS) y de leucemia aguda de células T (Jurkat)

Es conocido que el receptor activador NKG2D normalmente se encuentra en la superficie de las células NK normales, las cuales utilizan este receptor para reconocer MICA y MICB, que se expresa en células tumorales y mediante esta interacción ligando receptor, es posible la activación de las células NK y la eliminación de las células blanco mediante lisis celular. Resultados aportados por nuestro laboratorio han mostrado que el receptor NKG2D se encuentra presente en células epiteliales tumorales y que la presencia de sus ligandos MICA/ MICB solubles induce aumento en la proliferación en dichas células tumorales (Weiss-Steider), sin embargo, en células tumorales linfoides (NK y T) positivas para NKG2D existe debate acerca de la expresión de los ligandos MICA y MICB y si esta les confiere alguna ventaja de proliferación, metástasis, invasividad o mayor poder oncogénico, esto debido a que estas moléculas no siempre son detectadas (Suresh).

Con la finalidad de explorar la presencia de MICA/MICB en células tumorales de células NK y células T se emplearon las líneas celulares tumorales YTS (NK) y Jurkat (T) para su análisis por citometría. Como se observa en la Figura 9 la línea tumoral de células NK YTS se expresan los ligandos MICA (54.03%) MICB (53.62%) y el receptor NKG2D (52.58%).

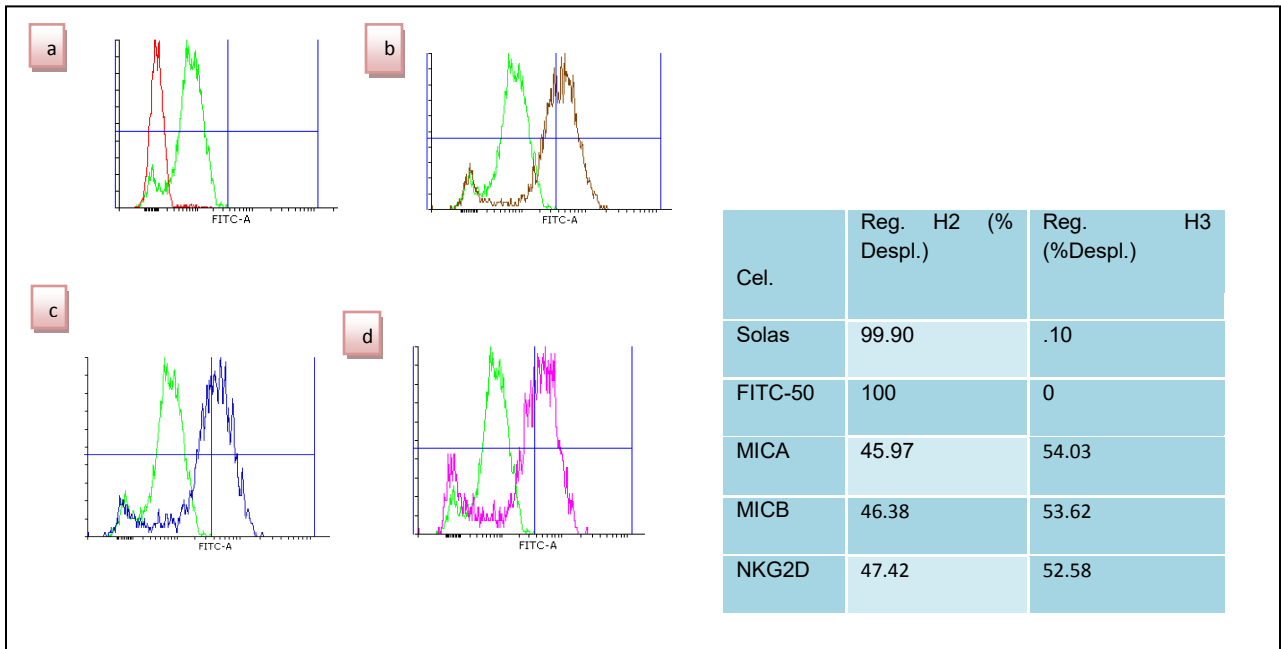


Figura 9. Representación del análisis de la expresión de los ligandos MICA y MICB en la línea celular YTS. a) la línea verde corresponde a las células sin teñir, la línea roja representa a las células teñidas con el anticuerpo secundario acoplado a FITC 50 b) la línea verde representa a las células sin teñir, mientras que la línea café corresponde a las células teñidas para MICA (54.03%). c) la línea verde corresponde a las células sin teñir, la línea azul representa las células teñidas para MICB (53.62%) d) la línea verde representa a las células sin teñir mientras que la línea rosa corresponde a las células teñidas para NKG2D (52.58%) para esta línea celular se realizaron 5 repeticiones.

Posteriormente se analizó la presencia de ULBP1, 2 y 3, estas moléculas también son ligandos del receptor NKG2D, en la Figura.10 podemos observar que las células YTS, expresan ULBP2 (44.88%) y ULBP3 (93.44%), pero no hay presencia de ULBP1.

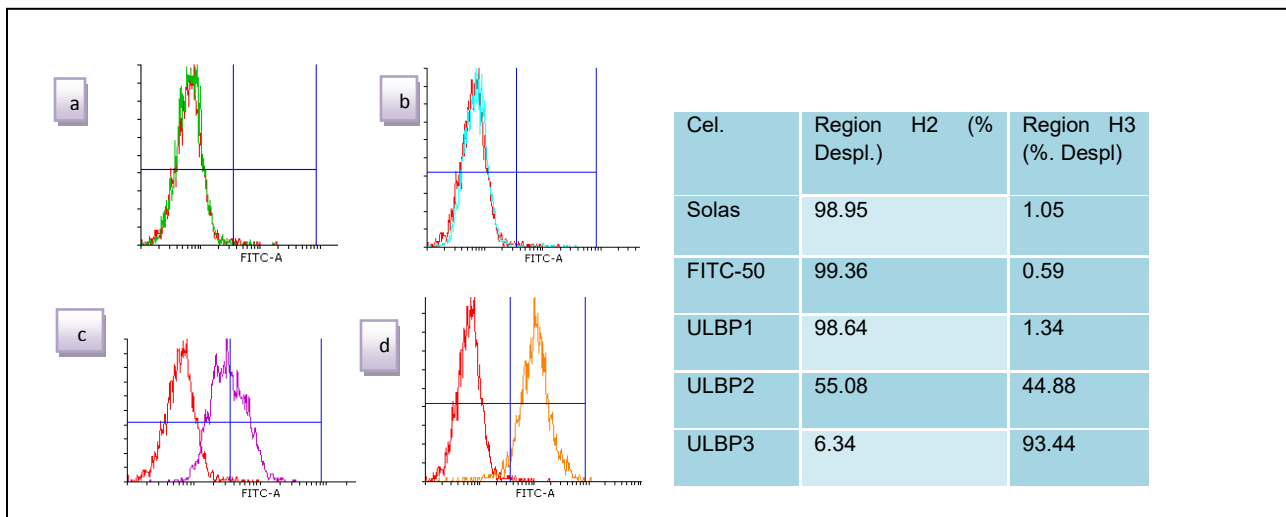


Figura 10. Representación del análisis de la expresión de ULBPS para la línea linfóide YTS, a) la línea roja representa a las células sin teñir, la línea verde corresponde a las células teñidas con el anticuerpo secundario acoplado a FITC-50 b) la línea roja corresponde a las células sin teñir y la línea azul representa a las células teñidas para ULBP(1.05%) c) la línea roja representa a las células sin teñir, línea morada corresponde a las células teñidas para ULBP2(44.88) d) la línea roja corresponde a las células sin teñir mientras que la línea naranja representa a las células teñidas para ULBP3(93.44). Para esta línea se realizaron 4 repeticiones.

Otro de los objetivos en el presente trabajo fue analizar la presencia de MICA/MICB y NKG2D en la línea celular Jurkat, la cual fue derivada a partir de células T de una leucemia aguda, como se observa en la Figura 11, dichas células también expresan MICA(75.72%), MICB(84.10%) y NKG2D(57.76%)

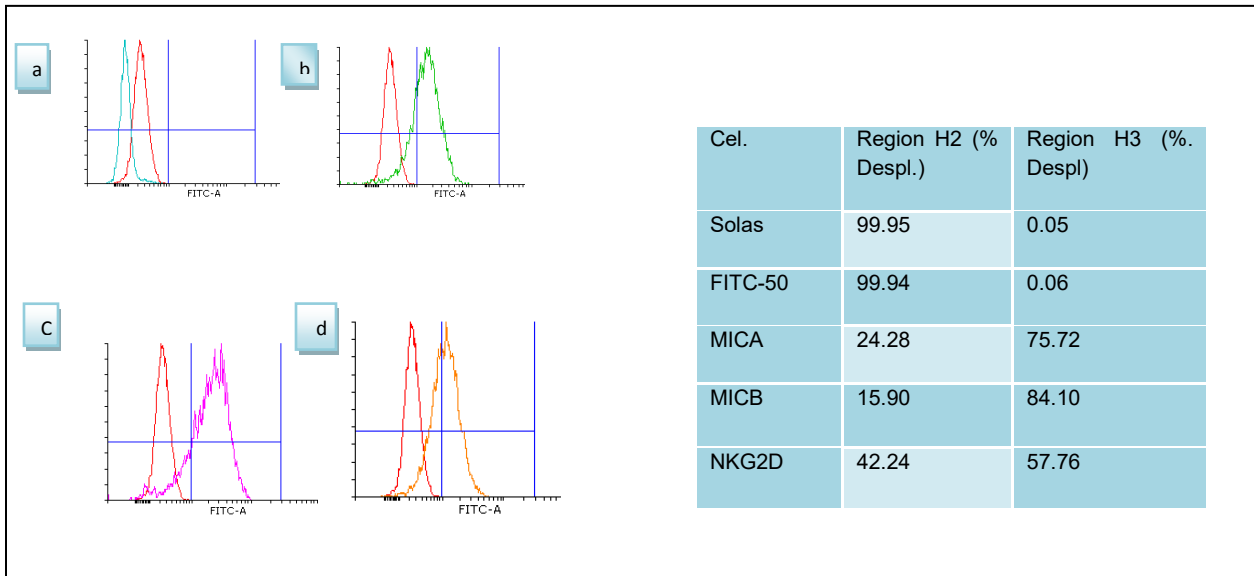


Figura 11. Representación del análisis de la expresión por citometria para la línea linfoide Jurkat a) la línea roja representa a las células sin teñir y la línea azul corresponde a las células teñidas con el anticuerpo acoplado a FITC50 b) la línea roja corresponde a las células sin teñir mientras que la línea verde representa a las células teñidas para MICA(75.72%), c) la línea roja representa las células sin teñir, la línea rosa corresponde a las células teñidas para MICB(84.10%) d) la línea roja corresponde a las células sin teñir mientras que la línea naranja representa a las células teñidas para NKG2D(57.76%). Para esta línea celular se realizaron 3 repeticiones.

Para el análisis de células NK normales, se obtuvieron CMN de sangre periférica y mediante selección negativa, se purificó a la población de células NK, para posteriormente analizar la presencia de las moléculas MICA y MICB, como se observa en la Figura 12, las células NK normales no expresan los ligandos MICA/MICB.

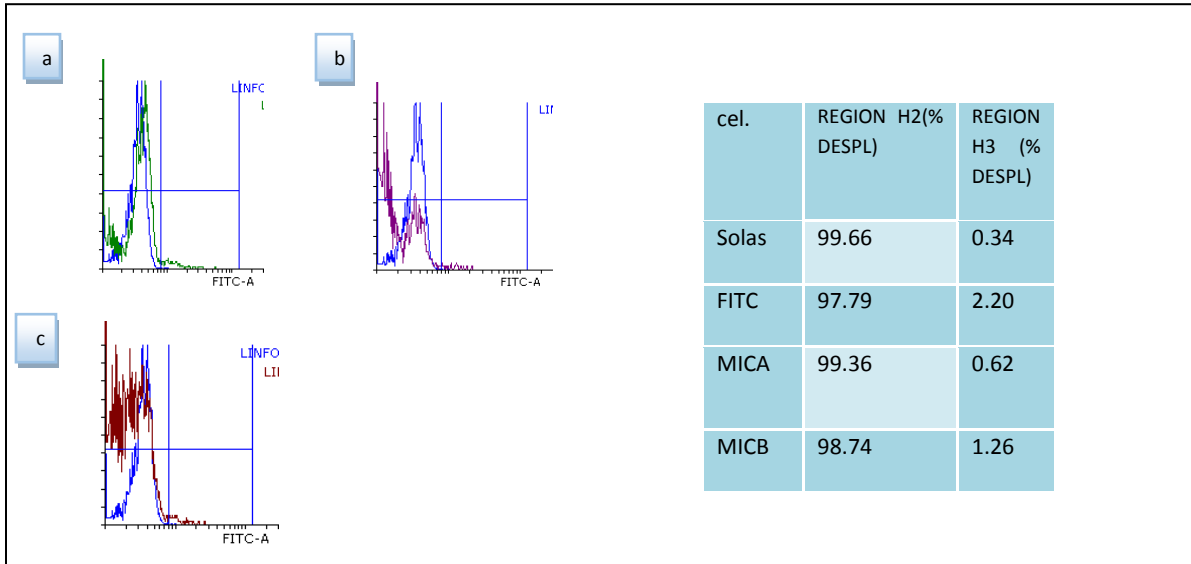


Figura 12. Analisis de la expresión de las proteínas de interés en las células NK obtenidas por selección negativa a) la línea azul representa a las células sin teñir, la línea verde corresponde a las células teñidas con el anticuerpo secundario acoplado a FITC-50 b) la línea azul corresponde a las células sin teñir mientras que la línea morada corresponde a las células teñidas para MICA c) la línea azul representa a las células sin teñir y la línea café representa a las células teñidas para MICB, para esta línea se realizaron 2 repeticiones.

Es interesante mencionar que cuando se realizo un estimulo con IL-15 a las células de sangre periférica proliferan formando agrupaciones y por igual al medir MICA (69.96%), MICB (79.18% y NKG2D (82.67%) son detectadas Figura 13 indicando que células NK en activación/proliferación expresan los ligandos MICA/MICB

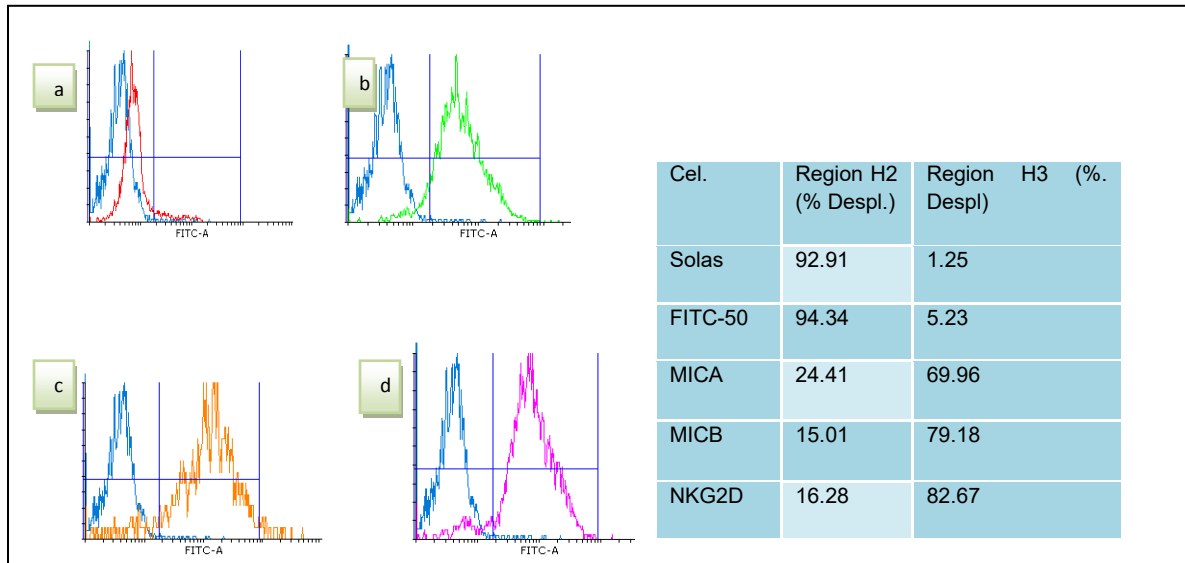


Figura 13. Expresión de los ligandos de interés en células NK estimuladas con IL-15, a) la línea azul representa a las células sin teñir, la línea roja corresponde a las células teñidas con el anticuerpo secundario acoplado a FITC-50, b) la línea azul corresponde a las células sin teñir, la línea verde corresponde a las células teñidas para MICA (69.96%), c) la línea azul representa a las células sin teñir, la línea naranja corresponde a las células teñidas para MICB (79.18%), d) la línea azul corresponde a las células sin teñir mientras que la línea rosa representa a las células teñidas para NKG2D (82.67%), para estas células se realizaron 3 repeticiones

Posteriormente se analizó la presencia de ULBP 1, 2 y 3, en la Figura 14 podemos observar que las células NK estimuladas con IL-15 presentan una nula expresión de estas moléculas.

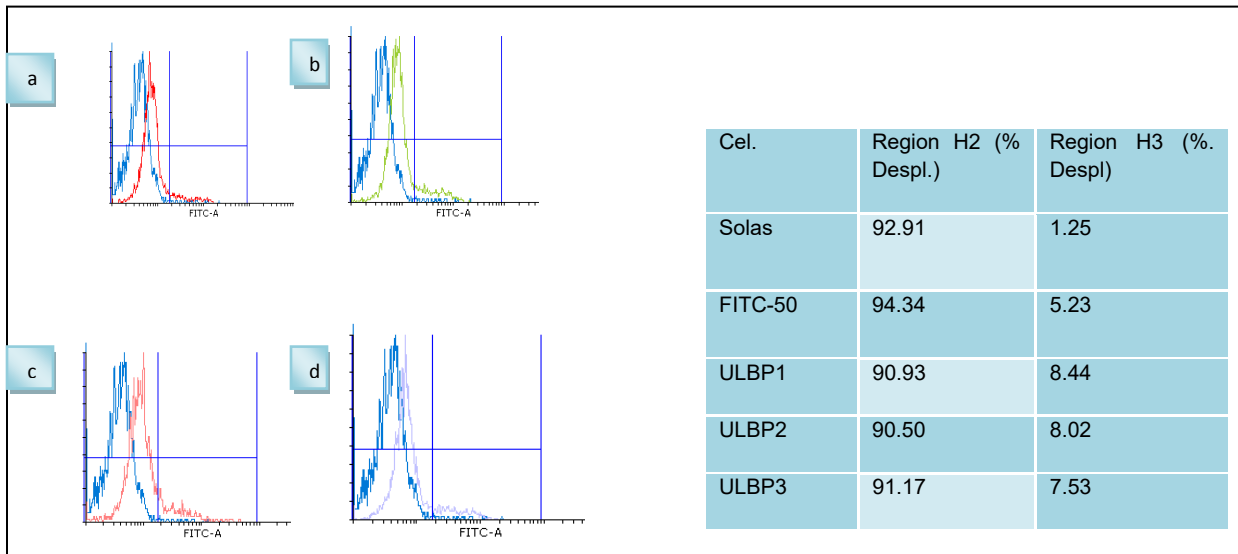


Figura 14. Analisis de la expresión de las proteínas integrales para las células normales linfoides NK estimuladas con IL-15 para su diferenciación a) la línea azul corresponde a las células sin teñir, la línea roja representa a las células teñidas con el anticuerpo secundario acoplado a FITC-50 b) la línea azul representa a las células sin teñir y la línea verde corresponde a las células teñidas para ULBP1 (8.44%) c) la línea azul corresponde a las células sin teñir, la línea rosa representa a las células teñidas para ULBP2 (8.02%) d) la línea azul representa a las células sin teñir mientras que la línea lila corresponde a las células teñidas para ULBP3 (7.53%). Para estas células NK normales estimuladas se realizaron 3 repeticiones.

Al utilizar el anticuerpo CD56 que es específico para células NK este tiñe a la población obtenida de sangre periférica las cuales fueron usadas como control indicando que las células purificadas son precisamente NK, Figura 15

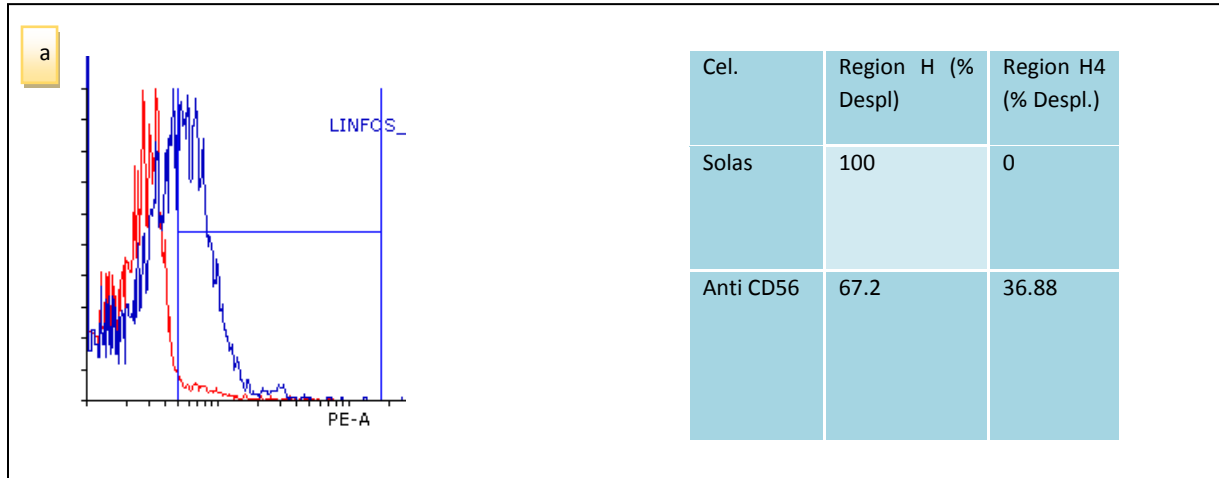


Figura 15. Expresión de CD56 para las células NK obtenidas por la técnica de selección negativa la línea roja corresponde a las células sin teñir, la línea azul representa a las células teñidas para CD56 (36.88%), para evaluar este se realizaron dos repeticiones.

Finalmente en la Figura 16 podemos observar el comparativo de la expresión de las moléculas MICA, MICB en las células NK normales y las líneas celulares YTS y Jurkat, se puede observar que para las células NK normales hay una nula expresión de estas moléculas mientras que las líneas celulares trabajadas si se encontró la expresión de estos ligandos.

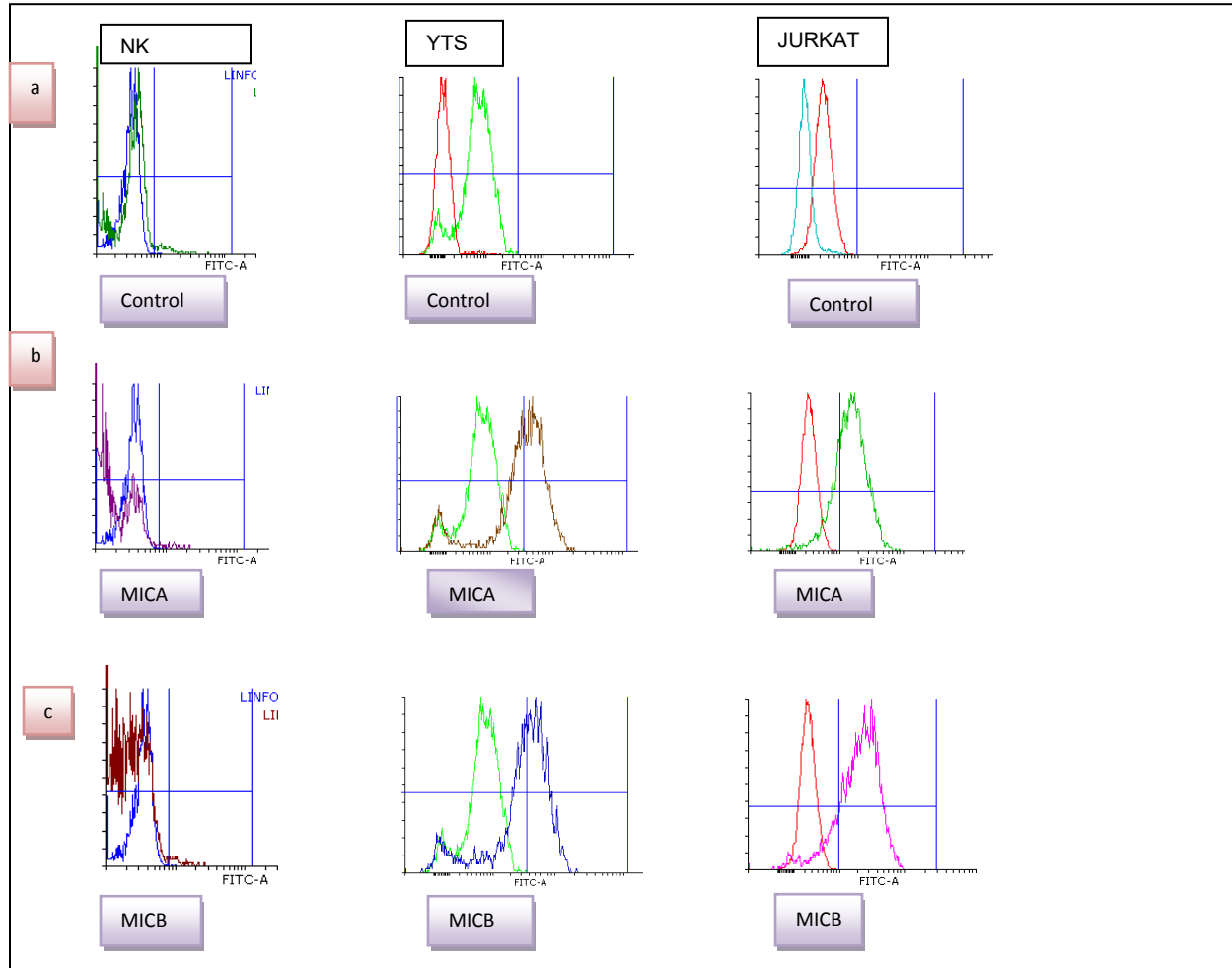


Figura 16. Comparación de la expresión de los ligandos de interés obtenidos por citometría de flujo en células NK vs Línea celular YTS y Jurkat, a) para las células NK la línea azul representa a las células sin teñir mientras que la línea verde corresponde a las células teñidas con el anticuerpo secundario acoplado a FITC-50, para la línea celular YTS la línea verde representa a las células sin teñir y la roja corresponde a las células teñidas con FITC-50, finalmente para la línea Jurkat la línea roja corresponde a las células sin teñir mientras que la línea azul representa a las células teñidas con FITC-50 b) para las células NK la línea azul representa a las células sin teñir y la línea morada corresponde a las células teñidas para MICA (0.62%), para YTS la línea verde corresponde a las células sin teñir y la línea café representa a las células teñidas para MICA (54.03%), finalmente para Jurkat la línea roja representa a las células sin teñir y la línea verde corresponde a las células teñidas para MICA (75.72%), c) para NK la línea azul representa las células sin teñir, la línea café corresponde a las células teñidas para MICB (1.26%), para YTS la línea verde representa a las células sin teñir y la línea azul corresponde a las células teñidas para MICB (53.62%), en Jurkat la línea roja representa a las células sin teñir y la línea rosa corresponde a las células teñidas para MICB (84.10%).

En la tabla n° 1 se observa una comparación del porcentaje de desplazamiento de las moléculas MICA, MICB y NKG2D para la línea celular Jurkat, YTS y para las células NK estimuladas con IL-15 y se observa que la molécula MICA tiene un mayor porcentaje de desplazamiento en la línea celular Jurkat (75.72%), para MICB hay un mayor desplazamiento en la línea celular Jurkat y finalmente para la molécula NKG2D el mayor desplazamiento se dio en las células NK (82.67%), también se observan una tabla comparativa que muestra el porcentaje de desplazamiento de ULBP1,2 y 3 en la línea celular YTS y en las células NK.

	JURKAT (% Despl.)	YTS (% Despl.)	NK (% Despl.)
MICA	75.72	54.03	69.96
MICB	84.10	53.62	79.18
NKG2D	57.76	52.58	82.67

	JURKAT (% Despl.)	YTS (% Despl.)	NK (% Despl.)
ULBP1	N.D	1.34	8.44
ULBP2	N.D	44.88	8.02
ULBP3	N.D	93.44	7.53

Tabla 1. Comparación de MICA, MICB, NKG2D y ULBPS para la línea celular JURKAT, YTS y para las células normales linfoides NK, en las cuales se observa que hay una mayor expresión de MICA en la línea celular JURKAT, para MICB se encuentra un mayor porcentaje en JURKAT, mientras que para NKG2D hay un mayor porcentaje de proliferación en las células normales linfoides.

2. Las líneas celulares (YTS) y (Jurkat) secretan los ligandos MICA y MICB.

Se midió la presencia de MICA/MICB y del receptor NKG2D en los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares YTS y Jurkat. Como se observa en la Figura 17, Figura 18.

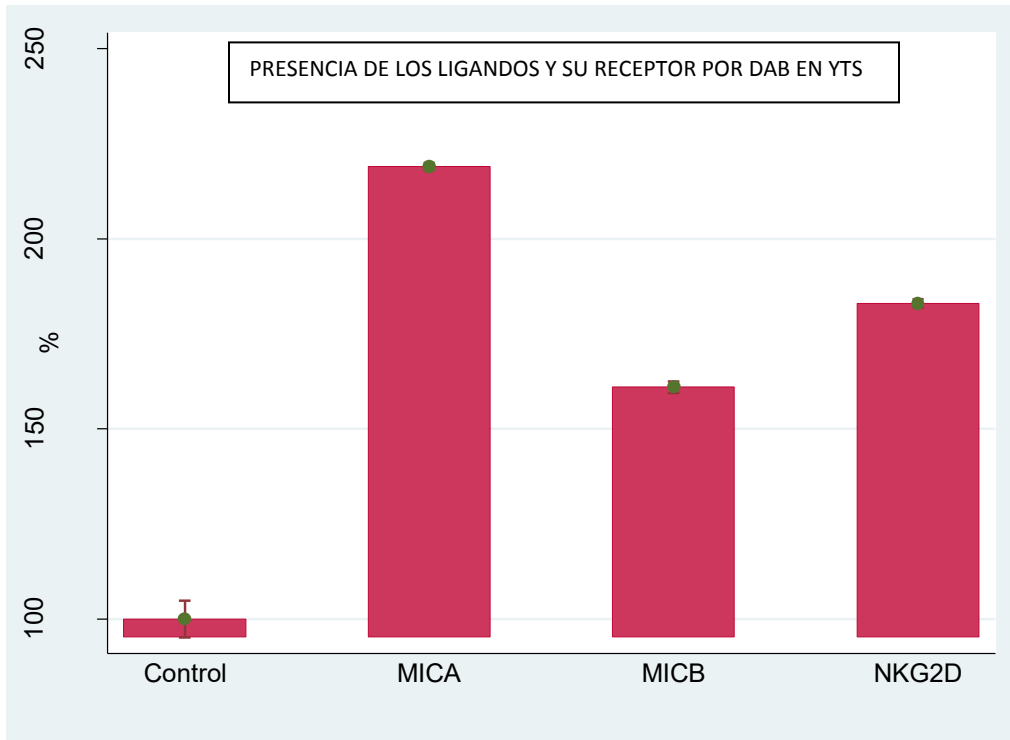


Figura 17. Presencia de los ligandos MICA, MICB y su receptor NKG2D en la línea linfocítica humana YTS, en ella se puede observar la presencia de manera soluble del ligando MICA, seguido por la presencia de NKG2D y presentándose una menor cantidad de MICB (n=2).

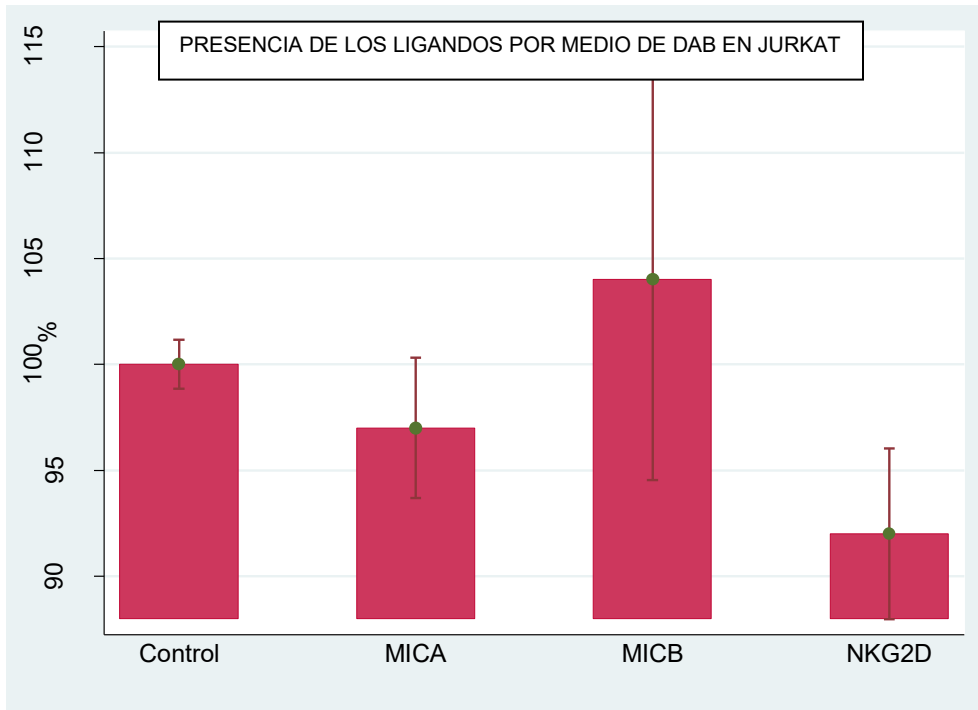


Figura 18. Presencia de los ligandos MICA, MICB y su receptor NKG2D en la línea celular Jurkat, en ella se puede observar la presencia de manera soluble del ligando MICB, seguido por la presencia de MICA y presentándose una menor cantidad de NKG2D (n=2)

De manera adicional también se realizó la medición de las moléculas MICA, MICB y NKG2D en los sobrenadantes de las células NK las cuales fueron estimuladas con IL-15 y se observa en la Figura 19.

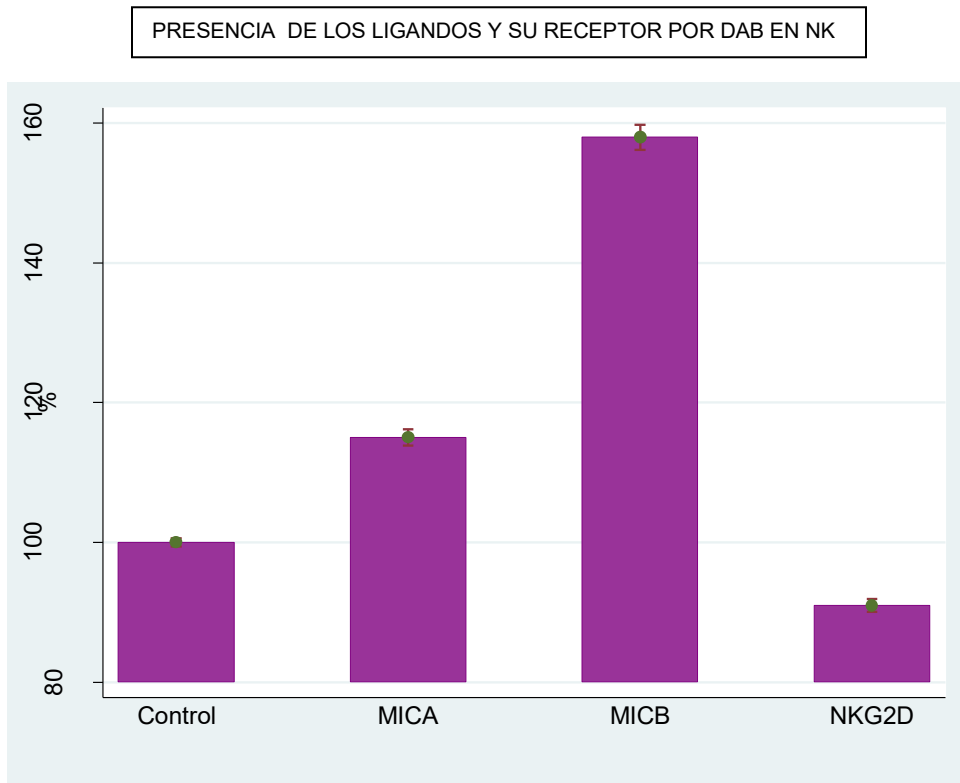


Figura 19. Presencia de las moléculas MICA, MICB y NKG2D en las células NK estimuladas con IL-15, se observa la presencia de manera soluble de la molécula MICB, seguido por la presencia de MICA y presentándose una menor cantidad de NKG2D (n=2)

Adicional a las lecturas mediante citometria de flujo, se realizaron tinciones para evidenciar la presencia de MICA, MICB y NKG2D en la línea celular YTS como se observa en la Figura 20 en la cual podemos hacer una comparación de nuestras células control y las distintas tinciones realizadas para observar la presencia de las moléculas antes mencionadas.

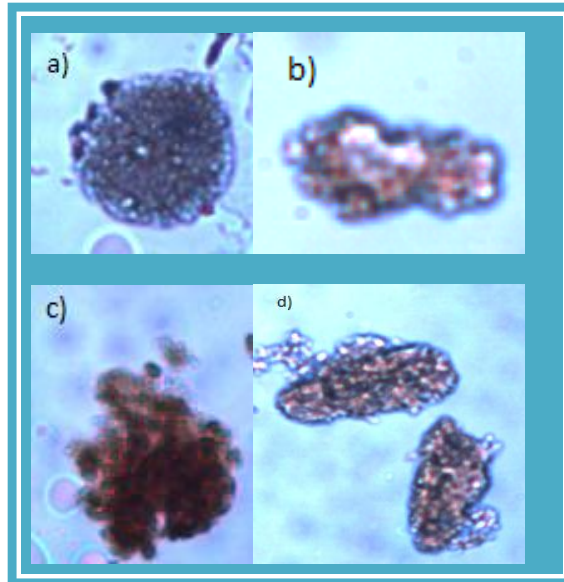


Figura 20. Microfotografías tomadas para las células de tumor NK (YTS) se muestran: a) nuestras células control, b) expresión del ligando MICA, c) expresión del ligando MICB, d) expresión del receptor NKG2D en la presente línea. La tinción café muestra la presencia intracelular de MICA, MICB y NKG2D.

También se realizaron tinciones para evidenciar la presencia de las moléculas MICA, MICB y NKG2D en la línea celular Jurkat como se observa en la Figura 21 en la cual se encuentra en primera instancia las células control y seguidamente se observan las células que evidencian la presencia de las moléculas mencionadas anteriormente.

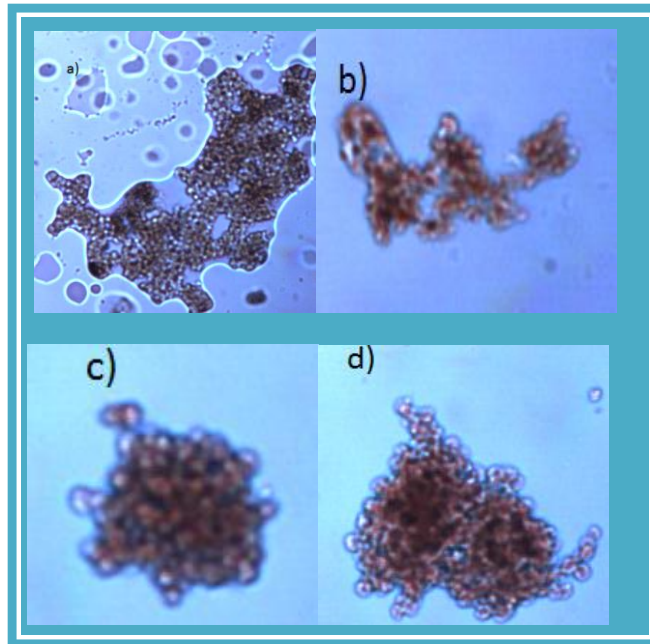


Figura 21. Microfotografías tomadas para la línea celular linfóide Jurkat: a) células control teñidas con DAB b) expresión del ligando MICA, c) expresión de MICB y d) células con el receptor NKG2D. La coloración café muestra la presencia intracelular de MICA, MICB y NKG2D.

Como se observa en la Figura 22 se realizaron algunas tinciones para evidenciar la presencia de MICA/MICB y NKG2D en las células normales linfoides estimuladas con IL-15, en la cual se observa que hay presencia de las moléculas de interés.

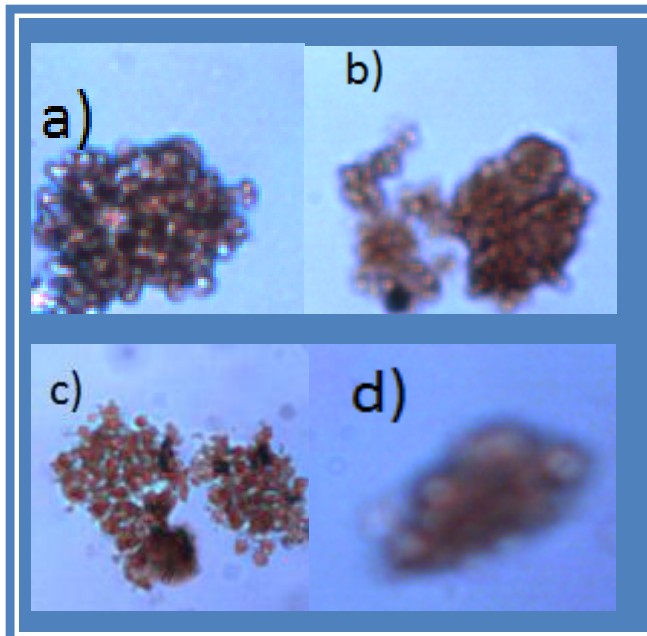


Figura 22. Microfotografías obtenidas a partir del programa LEICA versión 2.3 para las células normales linfoides se observa: a) células control, b) células teñidas con DAB y estimuladas con MICA, c) expresión del ligando MICB y finalmente células estimuladas con el receptor NKG2D (d). La coloración café muestra la presencia intracelular de MICA, MICB y NKG2D.

3. Las líneas celulares tumorales YTS y Jurkat proliferan con la administración exógena de las proteínas MICA y MICB

En resultados previos nuestro grupo mostró que la administración exógena de las proteínas MICA y MICB estimulan la proliferación de células epiteliales tumorales positivas para el receptor NKG2D, mostrando una función no reportada en células de tumor de origen epitelial (Weiss-Steider). Debido a la expresión de NKG2D en las líneas celulares tumorales YTS y Jurkat postulamos que en dichas células tumorales la producción de MICA y MICB podría establecerse un circuito autócrino inductor de proliferación, el eje NKG2D-MICA/MICB, es similar a lo encontrado en tumores de origen epitelial (Weiss-Steider).

En la línea celular Jurkat se analizó si la administración exógena de las proteínas MICA y MICB estimulaban la proliferación. Como se observa en la Figura 23 la administración exógena de MICA y MICB estimulan la proliferación.

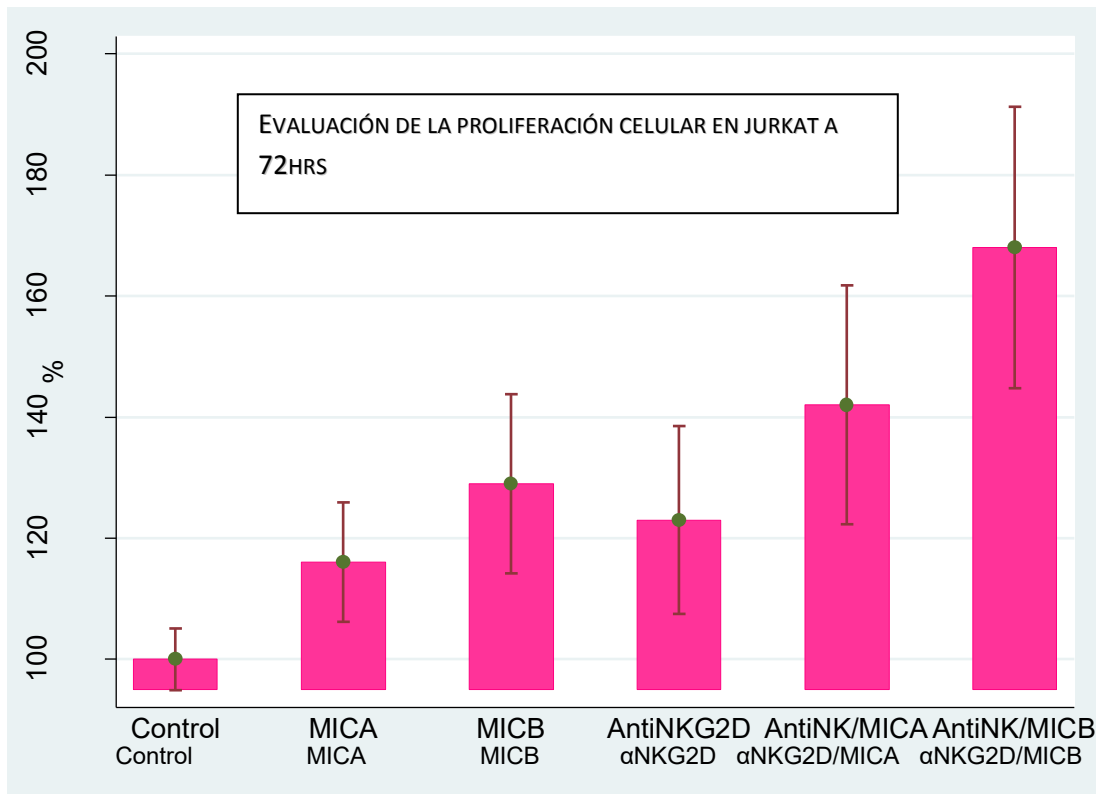


Figura 23 Resultado que muestra la absorbancia obtenida mediante la técnica de proliferación celular por medio de tinción con cristal violeta en la línea linfóide Jurkat a las 72hrs con una n=2 ensayos.

Posteriormente se evaluó si la administración exógena de las proteínas MICA y MICB en las células YTS estimulaban la proliferación. Como se observa en la Figura 24 en estas células no se observa ningún efecto.

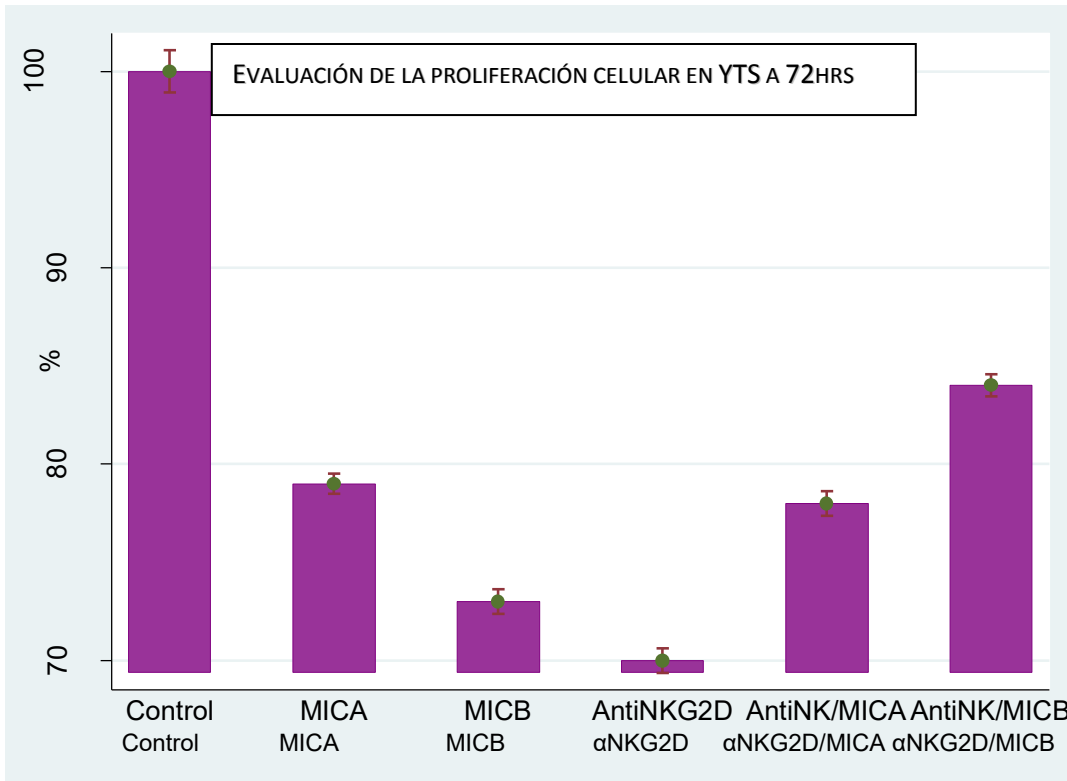


Figura 24 Gráfico que muestra la absorbancia obtenida mediante la técnica de cristal violeta en un periodo de 72 horas, en la línea linfocítica humana YTS (n=2 ensayos)

Adicionalmente se evaluó si la administración exógena de MICA/MICB tenía efecto sobre las células NK de sangre periférica de individuos normales. Como se muestra en la Figura 25, la administración exógena de estas moléculas no tiene efecto sobre la proliferación de las células NK.

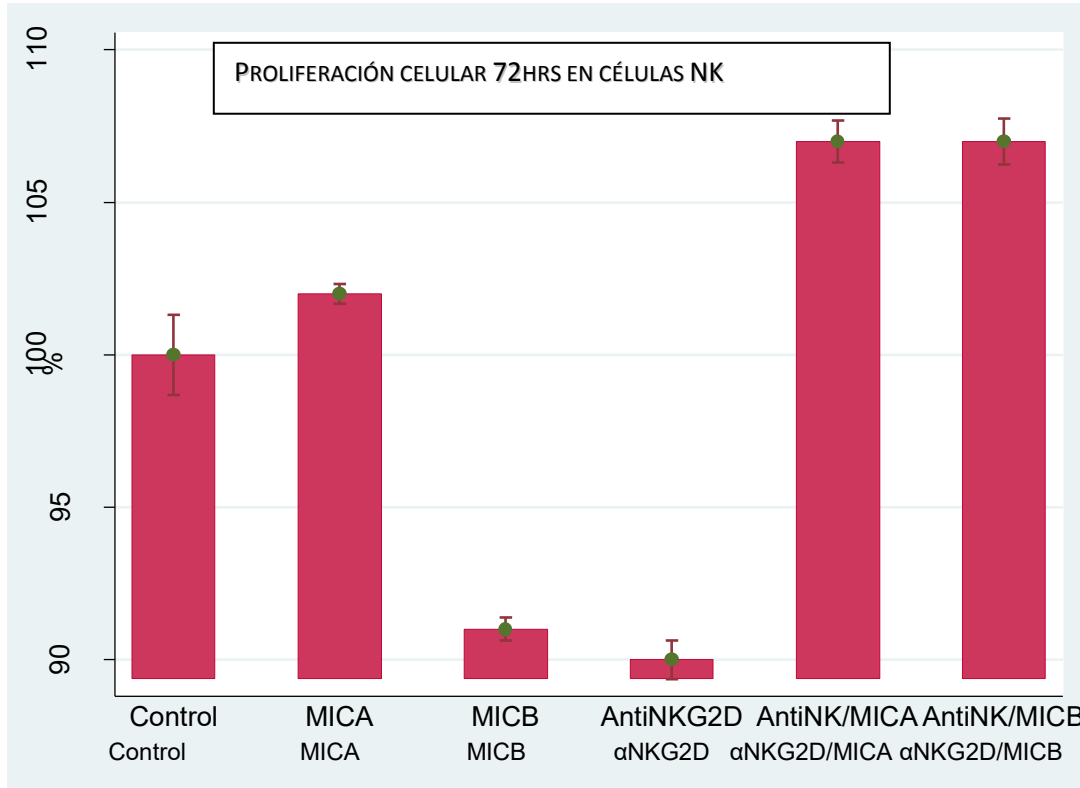


Figura 25 Se muestra la evaluación de la proliferación celular de las células normales linfoides NK obtenida a las 72 hrs por medio de la técnica de proliferación por cristal violeta teniendo una n=2.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En este trabajo se analizó la expresión de moléculas activadoras del sistema inmune MICA y MICB, estas moléculas son inducibles en condiciones de estrés y en células cancerosas o infectadas y funcionan como una marca de destrucción ya que son ligandos del complejo formado por el receptor NKG2D y la molécula adaptadora DAP-10(Bauer) y son moléculas involucradas en la respuesta inmune innata. Sin embargo en nuestro grupo de trabajo se demostró la presencia de las moléculas MICA/MICB en células tumorales leucémicas y en células tumorales epiteliales (Weiss-Steider), nuestros resultados indican que las líneas celulares tumorales YTS y Jurkat expresan los ligandos MICA (54.03% y 75.72% respectivamente) y MICB (53.62% y 84.10% respectivamente), la expresión de estas moléculas las haría blanco de las células NK, las cuales expresan el receptor que las reconoce, el receptor NKG2D, en nuestro grupo de trabajo también observamos que las células tumorales epiteliales son capaces de expresar NKG2D, de manera interesante las células YTS y Jurkat también son capaces de expresar este ligando (52.58% y 57.76% respectivamente) como se muestra en la Figura 9 y en la Figura 11.

Contrario a lo reportado en la literatura aquí mostramos que células linfoides tumorales YTS (NK) y Jurkat (T) son positivas para receptor activador NKG2D, expresan MICA/MICB/ULBP2 /ULBP3 (Figura 9, Figura 10 y Figura 11).

Es interesante mencionar que cuando se generaron células NK en presencia de IL-15 proliferan formando agrupaciones y al mismo tiempo al medir MICA y MICB son detectadas, indicando que células NK en proliferación tanto normales como tumorales expresan los ligandos MICA (69.96%), MICB (79.18%) (Figura 13 y Figura 14) y cómo se señaló en YTS ULBP2 (44.8%) y ULBP3 (93.44%).

Al mismo tiempo se logro observar por medio de diversas tinciones la presencia de las moléculas MICA, MICB y NKG2D para las líneas celulares YTS (Figura 20) y Jurkat (Figura 21), así como también para las células mononucleares de sangre periférica que recibieron un estímulo con IL-15 (NK) (Figura 22).

Estos hallazgos nos llevaron a la evaluación de la administración exógena de MICA/MICB la cual estimula una mayor proliferación de las células de tumor de linfocitos T (JURKAT) como se muestra en la figura 23 en comparación con YTS ya que en esta línea celular se da una inhibición de la proliferación (Figura 24) y con las células NK de sangre periférica no tumorales (Figura 25) sugiriendo que el fenómeno de hiperproliferación que se presenta en tumores en conjunto con la expresión de MICA y MICB favorece un mecanismo autócrino en el que participa el eje NKG2D-MICA/MICB.

Sería interesante evaluar si lo mismo ocurre con los ligandos ULBP2 y ULBP3 detectados en YTS y JURKAT. De manera adicional, sería interesante evaluar el ciclo celular de estas líneas tumorales para corroborar su capacidad de entrar a fase S en presencia de los ligandos MICA y MICB por igual de ULBP2/ULBP3.

Evidentemente, un mecanismo que ayudaría a proteger de esta hiperproliferación sería utilizar anticuerpos específicos contra MICA/MICB y algunas ULBPs. Sin embargo, al emplear esta estrategia en ensayos las líneas de tumor YTS y JURKAT no obtuvimos inhibición de la proliferación (Figura 24, 25 y 26) por el contrario se observó un aumento considerable en la misma por los anticuerpos específicos o combinación de ellos. Llama poderosamente la atención este efecto proliferador de anticuerpos específicos y sólo podemos especular una interacción de los mismos con la porción Fc de los receptores Fc presentes en células NK y linfoides que es conocido que expresan 3 tipos diferentes de receptores Fc (FcRI, FcRII y FcRIII) que sería interesante investigar en un futuro próximo.

Los resultados obtenidos en su conjunto corroboran la premisa asumida por nuestros resultados preliminares que células linfoides de tumor (NK y T) positivas para el receptor activador NKG2D por igual pueden expresar MICA/MICB y como se muestra en este trabajo algunas ULBPs (ULBP2 y ULBP3). Asimismo, esta característica puede ser útil como biomarcador en un evento de activación en células normales y de proliferación como consecuencia de infección o desarrollo de tumor (oncogénesis).

Los resultados presentados aquí en su conjunto muestran que en las líneas de tumor de NK y de leucemia aguda de linfocitos T empleadas presentan la capacidad de expresar los ligandos MICA/MICB y de manera adicional ULBP2 y ULBP3 y que hasta el momento no había sido reportada su presencia en tumores de NK y de linfocitos T. Por igual, se muestra que el eje NKG2D-MICA/MICB favorece la proliferación de estos tumores como se demostró en los ensayos de administración exógena de MICA/B. La función oncogénica del receptor NKG2D en tumores sólidos ha ido incrementando con diversos estudios recientes y en leucemias deberá estudiarse más a fondo, ya que una estrategia para bloquear el eje podría ser utilizar anticuerpos anti-NKG2D. Sin embargo, como mostramos aquí esto puede ser contraproducente por el efecto proliferador que mostró en estos tumores. Evidentemente, es necesario ampliar estos ensayos en otro tipo de líneas leucémicas humanas para corroborar si es un fenómeno generalizado en este tipo de tumores versus tumores sólidos.

VIII. CONCLUSIONES.

* Los ligandos MICA y MICB y el receptor NKG2D se expresan en las líneas celulares linfoides humanas Jurkat (leucemia aguda de células T) y la línea celular YTS (tumor de NK).

* Las proteínas de unión (ULBP2, ULBP3) se expresan en la línea celular YTS y no en Jurkat.

*En las células NK de sangre periférica no expresan los ligandos de NKG2D (MICA/MICB).

*El estímulo de células linfoides normales con IL-15 para la maduración de células NK induce la expresión de los ligandos MICA/MICB.

IX. PERSPECTIVAS.

- Evaluación de la proliferación en YTS/JURKAT empleando ULBP2/ULBP3.
- Se sugiere evaluar la expresión de las proteínas de unión (ULBP's) en la línea celular YTS y en las células NK.
- Se sugiere evaluar ULBP4 y ULBP5 en las líneas celulares YTS y Jurkat y en células NK de sangre periférica.
- Evaluar el efecto de los ligandos MICA y MICB sobre la proliferación celular en las líneas celulares Jurkat y YTS.
- Evaluar la expresión de CD56 en las células NK obtenidas por selección negativa mediante diferentes técnicas.
- Evaluar el ciclo celular en células de YTS y Jurkat estimuladas con los ligandos MICA/MICB/ULBP1-3.
- Analizar el efecto de la eliminación de los ligandos MICA/MICB/ULBP2/ULBP3 utilizando iRNA o shRNA.

X. BIBLIOGRAFIA.

- * Abbas AK, Lichtman AH. Innate Immunity. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2003. p. 289-292.
- * Abbas AK, Lichtman AH. Immunologic Tolerance. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2003. p. 227-230.
- * Aguera-Gonzalez S, Boutet P, Reyburn HT, Vales-Gomez M. Brief residence at the plasma membrane of the MHC class I-related chain B is due to clathrin-mediated cholesterol-dependent endocytosis and shedding. *J Immunol* 2009; 182: 4800-8.
- * Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S, Inoko H: Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics* 1997, 46:499-508.
- * Arnon Ti, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O: Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 2001, 31:2680-9
- * Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol* 2004; 25: 645-649
- * Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp. Hematol* 2005; 33: 395-402
- * Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J: Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J immunol* 2004, 173:1078-1084
- * Barclay AN: Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:14672-4
- * Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:6259-6263
- * Bahram S, Mizuk N, Inoko H, Spies T: Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996, 44:80-1
- * Bahram S, Shiina T, Oka A, Tamiya G, Inoko H: Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics* 1996, 45:161-2
- * Bakker AB, Wu J, Phillips JH, Lanier LL: NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol* 2000, 61:18-27

- * Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activacion of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999, 285:727-729}
- * Belleudi F, Leone L, Nobili V, Raffa S, Francescangeli F, Maggio M et al. Keratinocyte growth factor receptor ligands target the receptor to different intracellular pathways. *Traffic* 2007; 8: 1854-72.
- * Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A loading induces rapid cytotoxicity and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 1999; 10: 585-594.
- * Bhandoola A, Sambandam A, Allman D, Meraz A, Schwarz B: Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J Immunol* 2003; 171: 5653-5658
- * Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, Hershkovitz O, Gazit R, Fima E, Korc M, Vlodavsky I, Bovin NV, Porgador A: Membrane-associated heparin sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46, *J Immunol* 2004, 173:2392-401.
- * Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L222-31.
- * Borrego F, Masilamani M, Marusina AL, Tang X, Coligan JE: The CD94/NKG2D family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunol Res* 2006, 35:263-78
- * Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, Landi E, Biassoni R, Notarangelo LD, Moretta L, et al : NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med* 2001, 194:235-46.
- * Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, et al: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998, 391:795-9.
- * Braud VM, Allan DS, Wilson D, McMichael AJ: TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 1998, 8:1-10.
- * 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, 107:159-166.

- * Bueno JC, Cadavid AP. Células citotóxicas y mecanismos de citotoxicidad. In: Rugeles MT, Patiño PJ, editors. *Inmunología. Una ciencia activa*. Medellín: Biogénesis Fondo Editorial; 2004. p. 219-238
- *Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 55-79
- * Cantor A, Orkin S. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002; 21: 3368-76.
- * Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, Ma C, Ba D, He W: RAET1E2, a Soluble Isoform of the UL16-binding Protein RAET1E Produced by Tumor Cells, Inhibits NKG2D-mediated NK Cytotoxicity. In: *J Biol Chem*, vol. 282. City; 2007: 18922-18928.
- * Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM: Murine UL16-binding proteinlike transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 2002, 169:4079-4083.
- *Carsten W, Stebbins C, Long E: Cutting Edge: NK Cell Inhibitory Receptors Prevent Tyrosine Phosphorylation of the Activation Receptor 2B4 (CD244). *The Journal of Immunology* 2000, 165: 3545–3548.
- *Cerboni, C., A. Zingoni, M. Cippitelli, M. Piccoli, L. Frat i, and A. Santoni. 2007. Ant igen-act ivated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ ATR-dependent mechanism and become suscept ible to autologous NK-cell lysis. *Blood* 110: 606-615.
- * Cerwenka A, Lanier LL: Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001, 1:41-49.
- *Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 129-35.
- * Chang C, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist Jam Haude A, Loke YW, King A, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ: Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* 1999, 163:4651-4.
- *Chau LA, Bluestone JA, Madrenas J. Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor. *J Exp Med* 1998; 187: 1699-709.
- * Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993; 2: 137-144

- *Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008; 180: 7249-58.
- * Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001, 22:633-640.
- * Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ: ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001, 14:123-133.
- *Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; 295: 2387-92.
- * Cox ST, Stephens HA, Fernando R, Grant J, Madrigal JA, Little AM: Two novel MICA alleles, MICA*054 and MICA*056. *Tissue Antigens* 2009, 73:85-7.
- * Das G, Janeway C, MHC specificity of iIELs. *Trends Immunology*.2003.24 (2):88-93
- *Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF: MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001, 15:83-93.
- * Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH: Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000, 1:119- 126.
- * Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsia JK, Vivier E, Raulet DH: Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 2002, 3:1142-1149.
- * Di Santo JP, Vosshenrich CA. Bone marrow versus thymic pathways of NK cell development. *Immunol Rev* 2006; 214: 35-46
- *Dorshkind, K., S. B. Pollack, M. J. Bosma, and R. A. Phillips. Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid) . *J Immuno* 1985| 134: 3798-3801.
- * Eagle RA, Trowsdale J: Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* 2007, 7:737- 744.
- * Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A et al. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 2006; 129: 2416-25.

- *Elsner L, Flugge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY et al. The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *J Cell Mol Med* 2009.
- * Faure M, Long EO: KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 2002, 168:6208-14. 160.
- * Fehniger TA, Carson WE, Caligiuri MA. Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production. *Transplant Proc* 1999; 31: 1476-1478.
- * Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G Steinman RM, Munz C: Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. *J Exp Med* 2002, 195:343-351.
- * Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S: Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996, 44:351-7.
- *Friese MA, Wischhusen J, Wick W, Weiler M, Eisele G, Steinle A et al. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 2004; 64: 7596-603.
- * Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig KW. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7641- 6.
- * Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M: NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 2002, 3:1150-1155.
- * Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:12445-12450.
- * Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998, 279:1737-1740.
- * Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T: Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001, 2:255-260
- *Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419: 734-8.

- * Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson LJ, Spies T: Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its ligands in rheumatoid arthritis. *PNAS*.2003. 100:9452-9457.
- * Hershlovitz O, Jivov S, Bloushtain N, Zilka A, Landau G, Bar-Ilan A, Lichtenstein RG, Campbell KS, van Kuppeyelt TH, Porgador A: Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry* 2007, 46:7426-36.
- * Ho EL, Heusel JW, Brown MG, Matsumoto K, Scalzo AA, Yokoyama WM: Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:6320-5.
- *Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 2006; 118: 684-7.
- *Houston A., Bennett MW., O" Sullivan GC., Shanahan F., O" Connell J. Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer irrespective of TGF-beta expression.*Br J Cancer* 2003. 89:1345-51
- *Hruby VJ, Cai M, Dedek M, Qu H, Palmer E, Mayorov A et al. Peptide and non-peptide mimetics utilize different pathways for signal transduction. *Adv Exp Med Biol* 2009; 611: 305-7.
- *Huang DR, Zhou YH, Xia SQ, Liu L, Pirskanen R, Lefvert AK. Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL-10) gene in myasthenia gravis: implications of diverse effects of IL-10 in the pathogenesis of the disease. *J Neuroimmunol* 1999; 94: 82-7.
- * Jacobs R, Heiken H, Schmidt RE. Mutual interference of HIV and natural killer cell-mediated immune response. *Mol Immunol* 2005; 42: 239-249.
- * John F, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, John F, Gasson J. Characterization of HOX Gene Expression During Myelopoiesis: Role of HOX A5 in Lineage Comminment and Maturation. *Blood* 1999; 93: 3391-3400
- *Kasahara M, Watanabe Y, Sumasu M, Nagata T: A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:13687-13692.
- * King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 601-617.
- *Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer* 2000; 89: 251-8.

- *Kloss M, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee HG et al. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol* 2008; 181: 6711-9.
- *Kluwe J, Mencin A, Schwabe RF. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med* 2009; 87: 125-38.
- * Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ado H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, et al: MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics* 1999, 49:620-8.
- * Kondo M, Weissman IL, Akashi K: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91: 661-672
- * Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH: Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998, 391:703-7.
- * Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH : Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell . *Immunity* 1998, 8:693-701.
- * Lanier LL: NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005, 23:225-74.
- *Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2009; 119: 1251-63.
- * Leelayuwat C, Towned DC, Degli-Esposti MA, Abraham LJ, Dawkins RL: A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 1994, 40:339-51.
- * Li Z, Groh V, Stong RK, Spies T: A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 2000, 51:246-248.
- * Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme Abomb. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 553-559.
- * Long EO: Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999, 17:875-904.
- * Long EO: Versatile signaling through NKG2D. *Nat Immunol* 2002, 3:1119-20
- * Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008; 14: 179-89.

- * Lowry J, Mackay J. GATA-1: one protein, many partners. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 6-11
- * Loza MJ, Perussia B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* 2004; 172: 88-96.
- * Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A: Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001, 409:1055-60
- *Marin Iglesias R. Expresión de las moléculas HLA-E y MICA en tumores humanos, 2005.
- *Marincola F.M., Jaffe E.M., Hiddin D.J., Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance, 2000. *Adv. Immunol* 74:181-273
- * Mayani, H. et al: Hematopoiesis. *Cancerología* 2007; 2: 97-107.
- *Mc Pherson G, M. Austyn J. *Inmunología: Conceptos y evidencias*. Mc Graw Hill Interamericana Editores, 2003; 164.
- * Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 2002; 16: 417-428.
- * Mizuki N, Ota N, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, et al: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:1298-303.
- * Molinero LL, Marcos CY, Mirbaha F, Fainboim L, Stastny P, Zwirner NW: Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur J Immunogenet* 2002, 29:315-319.
- *Molinero, L. L., M. B. Fuertes, G. A. Rabinovich, L. Fainboim, and N. W. Zwirner. 2002. Activated ion-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol*.
- * Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, Zwirner NW: NF kappa B Regulates Expression of the MHC Class I-Related Chain A Gene in Activated T Lymphocytes. *J Immunol* 2004, 173:5583-5590.

- * Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001, 19:197-223.
- *Moliner, L. L., C. I. Domaica, M. B. Fuentes, M. V. Girart, L. E. Rossi, and N. W. Zimmerman. 2006. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Hum Immunol* 67: 170-182.
- *Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 2002; 3: 6-8.
- * Moser JM, Byers AM, Lukacher AE: NK cell receptors in antiviral immunity. *Curr Opin Immunol* 2002, 14:509-16.
- * Navarro F, López-Botet M. Receptores de células NK específicas para moléculas HLA de clase I. 2001. Vol.1 (1):38-48.
- * Okuda T, van D J, Hiebert S, Grosveld G, Downing J: AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 87: 321-330
- * Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, Kincade PW: Life before the Pre-BCR checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin. Immunol* 2006; 18: 2-11
- * Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Inoko H, Hauptmann G, Debre P, Bahram S, Theodorou I: Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics* 1997, 46:434-6.
- * Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, Nanni N, Biassoni R, Bottino C, Moretta A, et al: Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 2001, 31:1076-1086.
- * Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA: Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 1999, 49:605-12.
- * Podack ER. Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 548-552.
- *Qiao Y, Liu B, Li Z. Activation of NK cells by extracellular heat shock protein 70 through induction of NKG2D ligands on dendritic cells. *Cancer Immun* 2008; 8: 12. 128.

- * Quesenberry P, Colvin G. Hematopoietic Stem Cells, progenitor cells and cytokines. En: Hematology. Beutler E, Marshall S, Collier B, Kipps T, Seligsohn M. Mc Graw Hill, 2001, pp153.
- * Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Ahmad T, Walton R, Barnardo MC, Fuggle SV : The identification of three novel MICA alleles by sequence-based typing. Tissue Antigens 2006, 67:321-5.
- *Rabinovich GA., Gabilovich D., Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. 2007. Annu Rev Immunol25:267-96
- *Rabinovich BA, Ketchum RR, Wolfson M, Goldstein L, Skelly M, Cosman D: A role for the MHC class I-like MIM molecules in nutrient metabolism and wound healing. Immunol Cell Biol 2008, 86:489- 96.
- *Raulet D. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nat Rev Immunol 2003; 3: 781-90.
- * Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, Jabri B: NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. J Immunol 2001, 167:5527
- * Robertson MJ: Role of chemokines in the biology of natural killer cells. J Leukoc Biol 2002, 71:173- 183.
- *Rodriguez-Rodero S, Gonzalez S, Rodrigo L, Fernandez-Morera JL, Martinez-Borra J, Lopez- Vazquez A et al. Transcriptional regulation of MICA and MICB: a novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. Eur J Immunol 2007; 37: 1938-53.
- * Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, et al: CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. J Immunol 2007, 178:4947-55.
- * Rosenbauer F, Tenen DG: Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nat Rev Immunol 2007; 7: 105-17
- *Sanchez, M. J., M. O. Muench, M. G. Roncarolo, L. L. Lanier, and J. H. Phillips Identification of a common T/ natural killer cell progenitor in human fetal thymus. J Exp Med 1994 180: 569-576.
- * Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilja J, Bahram S: In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. PLoS One 2007, 2:e518.

- * Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE, Bhandoola A. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* 2007; 178:2008-2017
- *Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I et al. Interferon-gamma downregulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 1594-604.
- * Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends in immunology*.2003. 24 (2):82-87.
- *Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 887-99.
- * Shibuya A, Nagayoshi K, Nakamura K, Nakauchi H: Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995, 85:3538-46.
- * Shivdasani R, Mayer E, Orkin S. Absence of bloodformation in mice lacking the T-cell leukemia oncogene *tlx-1*/SCL. *Nature* 1995; 373: 432-434.
- *Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 402-10.
- * Simon MM, Hausmann M, Tran T, Ebnet K, Tschopp J, Thahla R, et al. In vitro and ex vivo-derived cytotoxic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *J Exp Med* 1997; 186:1781-1786.
- * Simmons MA. Functional selectivity, ligand-directed trafficking, conformation-specific agonism: what's in a name? *Mol Interv* 2005; 5: 154-7.
- * Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42: 501-510.
- *Song H, Hur DY, Kim KE, Park H, Kim T, Kim CW et al. IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol* 2006; 242: 39-45.
- *Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, Iannitto ML, Ricciardi MR, Di Gialleonardo V et al. ATM-ATRdependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* 2009; 113: 3503-11.
- *Staveley-O'Carroll K., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1998 U.S.A. 95,1178

- *Steinle A, Groh V, Spies T: Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I related molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:12510-12515.
- *Stiles JD, Ostrow PT, Balos LL, Greenberg SJ, Plunkett R, Grand W et al. Correlation of endothelin- 1 and transforming growth factor beta 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 435-9.
- * Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H: A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:2971-2976.
- *Suresh P, Membrane-bound versus soluble major histocompatibility complex Class I-related chain A and major histocompatibility complex Class I-related chain B differential expression: Mechanisms of tumor eradication versus evasion and current drug development strategies. *J Can Res Ther* 2016;12:1224-33.
- * Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, D Cosman D: UL16-Binding Proteins, Novel MHC Class I-Related Proteins, Bind to NKG2D and Activate Multiple Signaling Pathways in Primary NK Cells. *J Immunol* 2002, 168:671-679.
- *Sweeney C, Carraway KL, 3rd. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* 2000; 19: 5568-73.
- *Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 2007 13:6247-51
- * Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, Charron D, Toubert A: Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:2977-2982.
- * Torok-Strob B. Cellular interactions. *Blood* 1988; 72: 373-385
- * Trapani JA, Browne KA, Smyth MJ, Jans DA. Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 4127-4133.
- *Venkataraman GM, Suci D, Groh V, Boss JM, Spies T. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 2007; 178: 961-9.

- * Vetter CS, Lieb W, Brocker EB, Becker JC. Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma. *Br J Cancer* 2004; 91: 1495-9.
- * Vilches C, Parham P: KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002, 20:217-51.
- * Visser CJ, Tilanus MG, Schaeffer V, Tatari Z, Tamouza R, Janin A, Charron D: Sequencing-based typing reveals six novel MHC class I chain-related gene B (MICB) alleles. *Tissue Antigens* 1998, 51:649-52.
- *Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; 68: 6368-76.
- *Weiss-Steider B, Soto-Cruz I, Martinez-Campos CA, Mendoza-Rincon JF. Expression of MICA, MICB and NKG2D in human leukemic myelomonocytic and cervical cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30:37.
- * Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N: Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998, 161:571-7.
- * Wintrobe MM. *Clinical Hematology*. 8th ed. Philadelphia Lea & Febiger. 1981, p35
- * Wognum A, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003; 34: 461-475
- * Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH: An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999, 285:730-732.
- *Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 2004; 114: 560-8.
- * Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba t, Okabe H: Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 2001, 1526:10-2.
- * Yamanaka R, Barlow C, Castilla L, Liu P, Eckhaus M, Deker T, Xanthopoulos K. Impaired granulopoiesis myelodysplasia and early lethality in CCAAT enhancer binding protein deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13181-13192.
- * Yewdell JW, Hill AB: Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol* 2002, 3:1019-25

* Yokoyama WM., Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 405-429..

*Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Tian Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol* 2008; 69: 490-500.

* Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P: Effect of Human Cytomegalovirus on Expression of MHC Class I-Related Chains A. *J Immunol* 2005, 174:3098-3104.

* Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P: MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1998, 47:139-148.

* Zwirner NW, Dole K, Stastny P: Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 1999, 60:323-330.

XI. APENDICE.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de sodio	8.00g
Cloruro de potasio	0.20g
Fosfato mono-ácido de sodio	2.16g
Fosfato di-ácido de potasio	0.20g

El cloruro de sodio se disuelve junto con el cloruro de potasio, el fosfato mono-ácido de sodio y el fosfato di-ácido de potasio y estos se disuelven en 900ml de H₂O bi-destilada. Se ajusta el pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana, la solución se almacena a 4°C hasta su uso.

Medio recomendado en la selección negativa.

El medio recomendado para la selección negativa consiste en solución amortiguadora de fosfatos la cual contendrá 2% de SFB.

Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% de PBS (Buffer de fosfato salino) (preparado al momento, para disolverlo se calentó la solución a temperatura no mayor a 60°C, si rebasa esta temperatura el paraformaldehído se polimeriza y la solución no sirve para fijar)

Solución de saponina

La saponina se disuelve en un buffer de fosfato salino (PBS)

Colorante Cristal violeta.

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200mM pH6, la cual consiste en agregar 3.96g de NaOH y 4.28ml de ácido fórmico aforados a 500ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución se filtra y posteriormente se utiliza.