



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

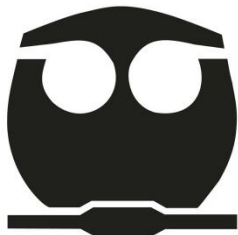
**“EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS NK
EN PACIENTES CON
INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

GABRIELA LUPERCIO RAMÍREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ
VOCAL: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA
SECRETARIO: GABRIELA LOPEZ HERRERA
1er SUPLENTE: HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA
2do SUPLENTE: ALBERTO GARCIA LOZANO

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO:
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA (INP)
TORRE DE INVESTIGACIÓN
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNODEFICIENCIAS

ASESOR DE TESIS:

DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA

SUSTENTANTE:

GABRIELA LUPERCIO RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

A la Facultad de Química

Al Instituto Nacional de Pediatría (INP)

Índice general

Lista de abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	IV
Resumen.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Sistema inmunológico.....	3
Células del sistema inmunológico.....	4
Células Natural Killer.....	5
Receptores de las células Natural Killer.....	7
Familias de receptores de las células NK.....	9
Mecanismos efectores de las células Natural Killer.....	12
Participación de las células NK con diversas enfermedades.....	14
Inmunodeficiencias.....	15
Inmunodeficiencia común variable.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Participantes.....	24
<i>Criterios de inclusión</i>	24
<i>Criterios de exclusión</i>	24
Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	25
Cultivo de la línea celular K562.....	25
Ensayo de la expresión de la molécula CD107a en células NK.....	25
Ensayo de la citotoxicidad de las NK mediante la muerte de las células K562.....	26
Tinción intracelular de perforina en células NK.....	26
Análisis de datos.....	27
RESULTADOS.....	28
Porcentaje de células NK.....	28

Evaluación de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediante la expresión de la molécula CD107a en la superficie celular.....	29
Expresión de CD107a en pacientes con COVID.....	31
Muerte de la línea celular K562 inducida por las células NK	35
Porcentaje de perforina en células NK.....	39
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIÓN.....	47
PERSPECTIVAS.....	47
REFERENCIAS.....	48

Lista de abreviaturas

°C: grados Celsius

μL: microlitro

ADCC: Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos

BCR: Receptor de célula B

CD: Cluster de diferenciación

CVID: Inmunodeficiencia común variable

DED: Dominio efector de la muerte

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FADD: Dominio de muerte asociado a FAS

FITC: Fluorescein isotiocyanate

ICOS: coestimulador inducible

IDP: Inmunodeficiencias primarias

IDPA: Inmunodeficiencias primarias de anticuerpos

IFN-γ: Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IgA: Inmunoglobulina de clase A

IgD: Inmunoglobulina de clase D

IgG: Inmunoglobulina de clase G

IgM: Inmunoglobulina de clase M

IL: interleucina

ILC: Células linfoides innatas

IMF: Intensidad media de fluorescencia

ITAM: Motivo activador con residuos de tirosina

ITIM: Motivo inhibidor con residuos de tirosina

KIR: Receptores tipo inmunoglobulinicos del linfocito NK

L: Litro

LIR: Receptores de tipo inmunoglobulina del leucocito

mg: miligramo

MHC-I: Complejo principal de histocompatibilidad de clase I

mL: Mililitro

mm³: Milímetro cúbico

MTOC: Centro de organización de microtúbulos

NCR: Receptores de citotoxicidad natural

ng: Nanogramo

NK: Natural Killer

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína clorofila piridina

PI3K: Fosfatidil inositol 3-cinasa

PMA: Forbol-12-Miristato-13-Acetato

PTK: Proteínas tirosina cinasas

PTP: Proteínas tirosinas fosfatasas

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

SE: Sin estímulo

SFB: Suero fetal bovino

TCR: Receptor de célula T

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionado a TNF

Índice de figuras

Figura 1. Funciones de receptores activadores e inhibidores de las células NK.	8
Figura 2. Mecanismos de activación de las células NK.	11
Figura 3. Respuesta citotóxica de las células NK.	12
Figura 4. Mecanismo inductor de apoptosis por Fas-FasL.	14
Figura 5. Frecuencia de inmunodeficiencias primarias.	16
Figura 6. Defectos genéticos en CVID.	20
Figura 7. Análisis de la población de células NK y la expresión de CD107a.	28
Figura 8. Porcentaje de células Natural Killer en controles y pacientes.	29
Figura 9. Estandarización de la expresión de CD107a en PBMCs de controles.	30
Figura 10. Análisis estadístico de la expresión de CD107a en células NK.	32
Figura 11. Análisis estadístico de la IMF de CD107a.	33
Figura 12. Análisis estadístico de la expresión de CD107a.	34
Figura 13. Análisis estadístico de la IMF de CD107a en tipo de CVID.	35
Figura 14. Esquematización del contacto entre las células NK y las células K562.	36
Figura 15. Análisis del porcentaje de muerte de las células K562.	37
Figura 16. Análisis estadístico del porcentaje de muerte de células K562.	38
Figura 17. Análisis del porcentaje de perforina en células NK.	39
Figura 18. Expresión de perforina en las células Natural Killer.	40

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de Freiburg.	19
Tabla 2. Relación de los genes asociados a CVID con la funcionalidad en células NK.	21
Tabla 3. Pacientes con alteración en porcentaje CD107a y/o porcentaje muerte de K562.	42

Resumen

La inmunodeficiencia común variable (CVID) es la inmunodeficiencia de anticuerpos más frecuente y se puede acompañar, además de diversos procesos infecciosos, de autoinmunidad y cáncer. De manera, general se caracteriza por presentar una reducción en los niveles séricos de al menos dos isotipos de inmunoglobulinas en circulación (IgM, IgA o IgG), alteración de las respuestas de anticuerpos a la infección o las vacunas y un aumento en la incidencia de infecciones aún con números normales de células B. La mayoría de los casos de CVID ocurren esporádicamente, entre el 5% y 25% de los pacientes tienen antecedentes familiares, siendo la herencia autosómica dominante reportada con mayor frecuencia.

En la CVID, se han reportado diversos defectos en la inmunidad innata, por ejemplo, defectos en la función y número de las células dendríticas y/o de linfocitos T. También se ha asociado con niveles reducidos en circulación de las células NK, sin embargo, a la fecha se desconocen defectos funcionales en estas células en los pacientes con CVID.

Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo evaluar la funcionalidad de las células NK mediante la determinación de la actividad citotóxica de éstas células, ya sea a través de la expresión de CD107a o bien, la muerte de una línea celular de eritroleucemia K562 tras ser expuesta a células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes con CVID. Para esto, se realizaron co-cultivos de PBMCs de pacientes y controles con la línea celular K562 y se evaluó la muerte de las células blanco, la expresión de CD107a y la expresión de perforina en condiciones basales.

Se encontró una disminución significativa en el porcentaje de células NK, sin embargo, la expresión de CD107a no se ve afectada por este hecho. En cuanto a la muerte de las células blanco K562, sólo se observó una tendencia en la disminución en la capacidad de las células NK de inducir la muerte del blanco cuando se utilizó una proporción 10:1 (PBMCs:K562). Lo anterior estaría relacionado posiblemente con el porcentaje de perforina en las células NK.

Obteniendo del mismo modo, una tendencia en la disminución del porcentaje de células expresando esta proteína en los individuos con COVID.

ANTECEDENTES

Sistema inmunológico

La inmunidad es la protección contra la enfermedad, está dada por el conjunto de células y moléculas que constituyen al sistema inmunitario, que al interactuar de manera conjunta y coordinada dan lugar a la respuesta inmunitaria; una reacción a los componentes de los microorganismos. (Abbas A., 2015)

La defensa contra los microorganismos está mediada por la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata se compone de células y proteínas que juegan un papel crucial en la primera línea de defensa contra los microorganismos, y la posterior activación del sistema inmune adaptativo. La respuesta inmunológica se da por el reconocimiento de estructuras que son comunes entre grupos de microorganismos, como lo son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y responden de la misma manera frente a infecciones repetidas (Abbas et al. 2015). Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas epiteliales, las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células natural killer (NK), el sistema del complemento y las citocinas que actúan regulando y coordinando las actividades de las células de la inmunidad innata (Quintin, Cheng, van der Meer, & Netea, 2014).

La inmunidad adaptativa proporciona una segunda y más completa línea de defensa. Las características que definen a esta inmunidad es la especificidad para los antígenos, pudiendo distinguir entre moléculas y microorganismo diferentes, incluso estrechamente relacionados. Capacidad de generar memoria para responder con más intensidad y rapidez a posteriores exposiciones. Los únicos componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos (Abbas A., 2015).

Células del sistema inmunológico

Tanto las respuestas inmunitarias innatas como las adaptativas dependen de las actividades de los glóbulos blancos o leucocitos. Todas estas células se originan en la médula ósea a partir de las células troncales hematopoyéticas. Esta célula troncal da lugar a todos los diferentes tipos de células sanguíneas, entre ellas, las dos categorías principales de leucocitos, las células de linaje mieloide y linfoide (Murphy K., 2012).

Linaje mieloide. Estas células se originan a partir de un progenitor mieloide común y representan los principales leucocitos en la sangre periférica. Las células pertenecientes a este linaje son los macrófagos, granulocitos, mastocitos y células dendríticas, también los megacariocitos y los glóbulos rojos. (Kawamoto & Minato, 2004)

Los fagocitos, entre los que se encuentran los neutrófilos y los macrófagos, son las células cuya principal función es ingerir y destruir los microorganismos y deshacerse de los tejidos dañados (Owen J., 2015). Un papel adicional y crucial de los macrófagos es colaborar en las respuestas inmunes: ayudan a inducir la inflamación y secretar citocinas que activan a otras células del sistema inmune y las reclutan. Los neutrófilos son las células más abundantes y median las primeras fases de las reacciones inflamatorias. Además fagocitan a los microorganismos y los destruyen eficazmente utilizando enzimas proteolíticas y otras sustancias antimicrobianas almacenadas en sus gránulos citoplasmáticos (Murphy K., 2012).

Linaje linfoide. El progenitor linfoide común da origen a los linfocitos que son específicos de antígeno del sistema inmunitario adaptativo (linfocitos B y T). También a un tipo de linfocito que responde a la presencia de infecciones virales y células tumorales, pero no presenta especificidad a los antígenos y por lo tanto se considera parte del sistema inmunitario innato. Éste último se denomina célula natural killer (NK), la biología de éstas células se describirá más adelante. (Owen J., 2014)

Los componentes de la inmunidad adaptativa, son los linfocitos B y T. Los linfocitos B al ser activados por un antígeno extracelular a través de su BCR

(receptor de célula B), conduce a la diferenciación en células plasmáticas o linfocitos B de memoria. La función de las células plasmáticas es producir en grandes cantidades diferentes clases de inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE). Estos anticuerpos al ser secretados, son capaces de unir antígenos para neutralizarlos o actuar como opsoninas, ya que son reconocidos por receptores expresados en el fagocito, lo que facilita su ingestión y degradación por parte de éstas células. Por su parte los linfocitos B de memoria son capaces de sobrevivir en un estado de reposo, es decir, sin secretar anticuerpos, durante periodos largos pero montan una respuesta rápida ante posteriores encuentros con el antígeno (Abbas A., 2015).

Los linfocitos T por su parte, se activan cuando el TCR (receptor de células T) se encuentra con el antígeno presentado por las células dendríticas, estos proliferan y se diferencian en alguno de los tipos funcionales de células T efectoras para inducir la muerte, activación o regulación de la respuesta inmune. Las células T citotóxicas, de manera similar a las células NK, destruyen las células infectadas por virus u otros patógenos intracelulares, sin embargo, esto es antígeno específico. Las células T cooperadoras proporcionan señales adicionales, como es el caso de citocinas y coestimulación por medio de proteínas membranales, las cuáles son esenciales en la regulación de la respuesta o en la activación de otras células de la respuesta inmunológica. Otro tipo celular, son las células T reguladoras, las cuáles suprimen la activación de otros linfocitos y ayudan a controlar las respuestas inmunitarias (Murphy K., 2012).

Con respecto a las células NK, se describirán a continuación, debido a que el presente trabajo está enfocado a la evaluación de la funcionalidad de éstas células.

Células Natural Killer

Las células NK constituyen del 5-15% de las PBMCs y son un subconjunto de linfocitos que se caracterizan por carecer de receptor de antígeno específico

(TCR o BCR), por lo que se les agrupa dentro de las células linfoides innatas (ILCs) (Serafini, Vosshenrich, & Di Santo, 2015).

Las NK desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria innata contra células tumorales o células infectadas que fallan en expresar de manera normal moléculas MHC de clase I, ya sea mediando la lisis celular directa o produciendo una gran cantidad de citocinas que llevan a la formación de la respuesta inmune adaptativa (Luevano, Madrigal, & Saudemont, 2012; Vivier & Ugolini, 2011). Las células NK reconocen a las células estresadas a través de una serie de receptores de reconocimiento codificados en la línea germinal, como lo son los receptores de citotoxicidad natural (Vivier & Ugolini, 2011).

Las células NK pertenecen a uno de los cinco grupos en que se clasifican las ILC con base a su función y desarrollo; NK, ILC1, ILC2, ILC3 y LTi. Las NK y los ILC1 tienen varias características en común. Ambos tipos de células producen IFN- γ como su principal citocina y requieren del factor T-bet para esta función. Sin embargo, las células NK y las ILC1 son funcionalmente diferentes, ya que las NK son citotóxicas y expresan perforina, mientras que las ILC1 tienen bajos niveles de expresión de perforina. (Vivier et al., 2018)

A su vez, las NK y las ILC1 tienen diferentes vías de desarrollo. Las células NK se desarrollan a partir de un progenitor linfóide innato (CILP) a través de un precursor de células NK (NKP) que luego en presencia de IL-15 se convierten en NK inmaduras y finalmente se diferencian a un estadio maduro. Para ello las células NK requieren del factor de transcripción EOMES para desarrollarse, mientras que las ILC1 pueden desarrollarse en ausencia de EOMES y surgen a partir de un CILP a través de un precursor de células linfoides innatas (ILCP) (Luevano et al., 2012; Vivier et al., 2018).

En los seres humanos, las NK se pueden dividir en subconjuntos de células de acuerdo a la intensidad de expresión de antígenos de superficie, como CD56 y el receptor de inmunoglobulina FC γ RIII (CD16). Basado en lo anterior, se han descrito dos subpoblaciones de NK. La primera comprende a las células que expresan en alta densidad el antígeno CD56 (CD56^{bright}) y un bajo

número o ninguno de CD16, es decir CD56^{bright} CD16^{dim/-}. Estas comprenden el 10% de las NK circulantes en sangre, y se caracterizan por su baja capacidad citotóxica y su alta capacidad inmunorreguladora, siendo responsables de la liberación de altas cantidades de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ) y anti-inflamatorias (IL-10). La segunda subpoblación, son las células CD56^{dim} CD16^{bright} (baja expresión de CD56 y alta expresión de CD16). Representan el 90% restante y se les denomina NK citotóxicas debido a su alta capacidad lítica y su baja capacidad de secretar citocinas (Montserrat Sanz, García Torrijos, Díaz Martín, & Prieto Martín, 2013).

Receptores de las células Natural Killer

Las funciones de las células NK van a ser determinadas por una compleja interacción entre los ligandos y un conjunto de receptores activadores e inhibidores (Fig.1) que darán lugar a la correspondiente inhibición o activación de estas células, induciendo una adecuada respuesta protectora en el organismo (Sanz et al. 2013).

Los receptores de las células NK son variados y su función radica en inhibir ó activar a éstas células. Los receptores inhibidores emiten señales a través de una cola citoplasmática larga de aminoácidos, con una o más secuencias ITIM (Motivo inhibidor con residuos de tirosina). Estas secuencias contienen tirosinas que se fosforilan tras la interacción del ligando con el receptor inhibidor. Lo anterior conduce al reclutamiento y activación de fosfatasas, que eliminan a los grupos fosfatos de proteínas que producen las señales activadoras, bloqueando así las funciones transmisoras (Abbas A., 2015; Pegram, Andrews, Smyth, Darcy, & Kershaw, 2011).

En contraste los receptores activadores se caracterizan por presentar proteínas adaptadoras asociadas con secuencias ITAM (Motivo activador con residuos de tirosina) en sus dominios intracelulares. Dichas proteínas adaptadoras como DAP10 o DAP12 (Proteína activadora DNAX de 10/12 kDa respectivamente) inician la cascada de señalización al ser fosforiladas en sus secuencias ITAM, tras la interacción del receptor activador con su ligando.

Posteriormente se recluta la tirosina cinasa ZAP70 y/o Syk que transducen señales activadoras a través de la fosforilación de proteínas tales como PLC γ o PI3K, que activan las funciones efectoras celulares (Chiesa, Tomasello, Vivier, & Vély, 2005). A continuación, se mencionan las familias principales de dichos receptores.

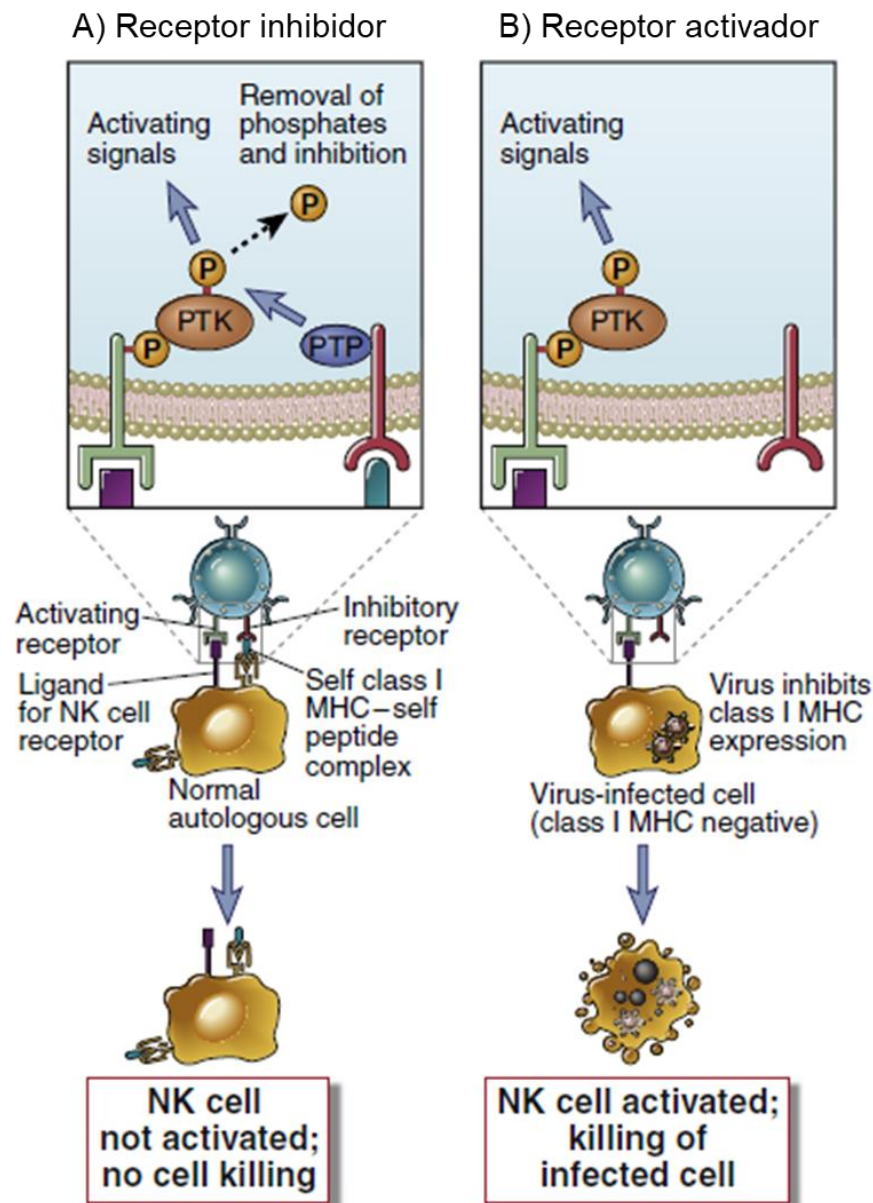


Figura 1. Funciones de receptores activadores e inhibidores de las células NK. A) Los receptores activadores de las células NK reconocen ligandos en las células diana y activan a las proteínas tirosina cinasa (PTK), cuya actividad es inhibida por los receptores inhibidores que reconocen moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y activan a las proteínas tirosinas fosfatasas (PTP). Por lo tanto no hay muerte de la célula diana por las células NK. B) Si se inhibe la expresión del MHC-I en las células infectadas (infección vírica o estrés) se induce la expresión de ligandos activadores adicionales, el receptor inhibidor de la NK no se une a su ligando y las funciones del receptor activador desencadenan la respuesta de las células NK, como la muerte de las células diana o la liberación de citocinas. (Tomado de Abbas A., 2015)

Familias de receptores de las células NK

Receptores tipo-inmunoglobulínicos del linfocito NK (KIR)

Esta familia de receptores se caracteriza por contener dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), según el número de dominios de tipo Igs en la región extracelular se distinguen dos grupos de KIR, denominados KIR2D y KIR3D. La activación o inhibición de una proteína KIR depende de la presencia o ausencia de señales particulares en su dominio citoplasmático. Los KIR inhibidores tienen colas citoplasmáticas largas con un motivo ITIM, mientras que los activadores tienen colas citoplasmáticas cortas con dominio ITAM. Los receptores con dominios ITIM se denominan KIR2DL y KIR3DL. Mientras que los receptores con ITAM, donde están unidas proteínas adaptadoras como DAP12, se denominan KIR2DS y KIR3DS (Pegram et al., 2011).

Los KIR reconocen determinantes de la molécula HLA de clase I, específicamente a las moléculas HLA-A, -B y -C, ya sea para activar o inhibir. Por ejemplo, la interacción de KIR2DL1/HLA-C2 evita que la NK ataque a la célula diana mediante la liberación de sus gránulos. En contraste, la interacción de KIR2DS27/HLA-C1 favorece la actividad citotóxica de la célula NK, llevando así a la muerte de la célula diana (Pegram et al., 2011)

Receptores de citotoxicidad natural (NCR)

Los NCR son receptores activadores, que también pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se ha sugerido que estos receptores son uno de los principales mecanismos por los cuales las células NK destruyen las células blanco tumorales. Cada NCR tiene un residuo cargado en el dominio transmembranal con capacidad de unirse a diversas moléculas adaptadoras para iniciar la señalización. Algunos receptores de esta familia son exclusivamente expresados por las células NK y, por tanto, son marcadores excepcionales para identificarlas; además, la densidad del receptor expresado en la membrana celular es proporcional a su actividad citotóxica frente a las células diana y al tamaño de la masa tumoral; ejemplos de NCRs son el NKp46, NKp44 y el NKp30

(Monserat Sanz et al., 2013; Pegram et al., 2011). Los ligandos reportados para NKp46 y NKp44 incluyen hemaglutininas víricas, mientras que el ligando de NKp30 es B7-H6, que se expresa en células tumorales y tras la interacción con su receptor induce la actividad citotóxica (Chen, Mo, Jia, & He, 2018; Pegram et al., 2011).

Receptores de la superfamilia de las lectinas tipo C

Uno de los receptores activadores mejor conocidos de esta familia es el NKG2D y se expresa constitutivamente en todas las células NK. Se une a proteínas similares al MHC de clase I, como MIC-A y MIC-B, cuya expresión incrementa en células infectadas por virus y en células tumorales. El NKG2D es capaz de asociarse a DAP10, generando señales que potencian la citotoxicidad del linfocito NK frente a las células blanco (Abbas A., 2015).

Receptores de tipo inmunoglobulina del leucocito (LIR)

Los receptores LIR igualmente pertenecen a la familia de las Ig, pero a diferencia de los NCR, estos son inhibidores. Se unen a moléculas clase I del MHC, aunque con menor afinidad que los KIR, y se expresan, en mayor cantidad en los linfocitos B que en los linfocitos NK. Se ha demostrado que el receptor LIR-1 se une a UL18, una proteína codificada por el virus citomegalovirus humano, lo que reduce la función de las células NK (Jost & Altfeld, 2013; Pegram et al., 2011).

En resumen, la activación de las células NK está regulada, por un balance complejo de las señales recibidas a partir de los receptores que expresan (Fig.2).

En general, las células NK pueden efectuar su actividad citotóxica por:

1. Disminución en la expresión de HLA-I en la superficie de la célula diana, lo que reduce las señales inhibitorias recibidas a través de los receptores KIR.
2. Moléculas expresadas en células anormales que son reconocidas por los NCR.
3. Células con anticuerpos IgG unidos a la membrana plasmática, mediante un mecanismo denominado citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).

Este mecanismo se lleva a cabo principalmente por las células CD16^{bright} (Taborda, Hernández, Montoya, & Rugeles, 2014).

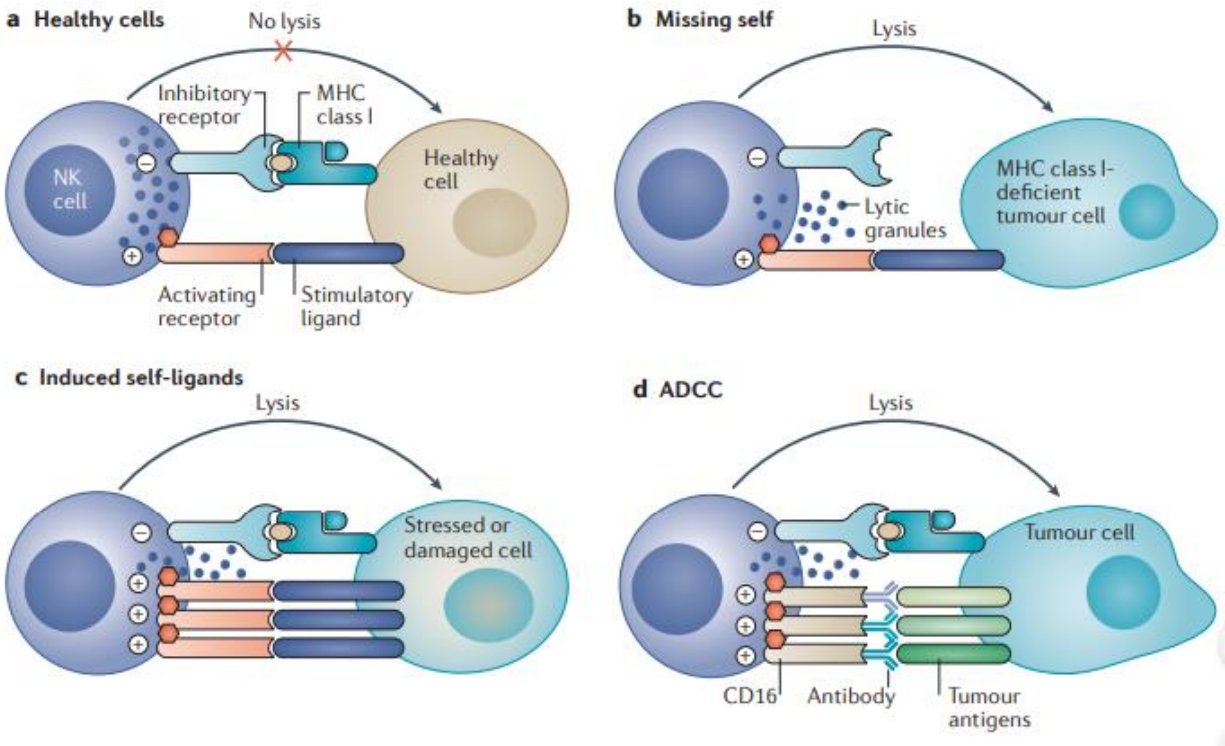


Figura 2. Mecanismos de activación de las células NK. a) Un equilibrio de señales emitidas por los receptores inhibidores y activadores regula el reconocimiento de las células sanas por las células NK. b) Las células tumorales que carecen de las moléculas del MHC-I son lisadas por las células NK. c) Las células tumorales pueden sobreexpresar los ligandos de que son reconocidos por los receptores activadores de las células NK, anulando las señales inhibitorias y provocando la lisis de las células diana. d) Los anticuerpos específicos del antígeno se unen a CD16 y provocan la citotoxicidad mediada por las NK dependiente de anticuerpos. (Tomado de Morvan *et al.* 2016)

Mecanismos efectores de las células Natural Killer

La interacción de los receptores de las células NK con sus respectivos ligandos, tiene como consecuencia la activación de los mecanismos que efectúan la respuesta citotóxica. Dicha respuesta está mediada principalmente por dos vías predominantes que se describirán a continuación.

Citotoxicidad mediada por gránulos: granzimas y perforinas.

Este mecanismo se divide en cuatro pasos principales: 1. Formación de sinapsis inmunológica entre la célula diana y la célula NK, seguida de la reorganización del citoesqueleto de actina. 2. Polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y del lisosoma secretor hacia la sinapsis lítica. 3. Acoplamiento del lisosoma secretor con la membrana de las células NK. 4. El lisosoma secretor se fusiona con la membrana plasmática de las células diana y libera los gránulos citotóxicos en la célula blanco (Fig. 3). (Paul & Lal, 2017)

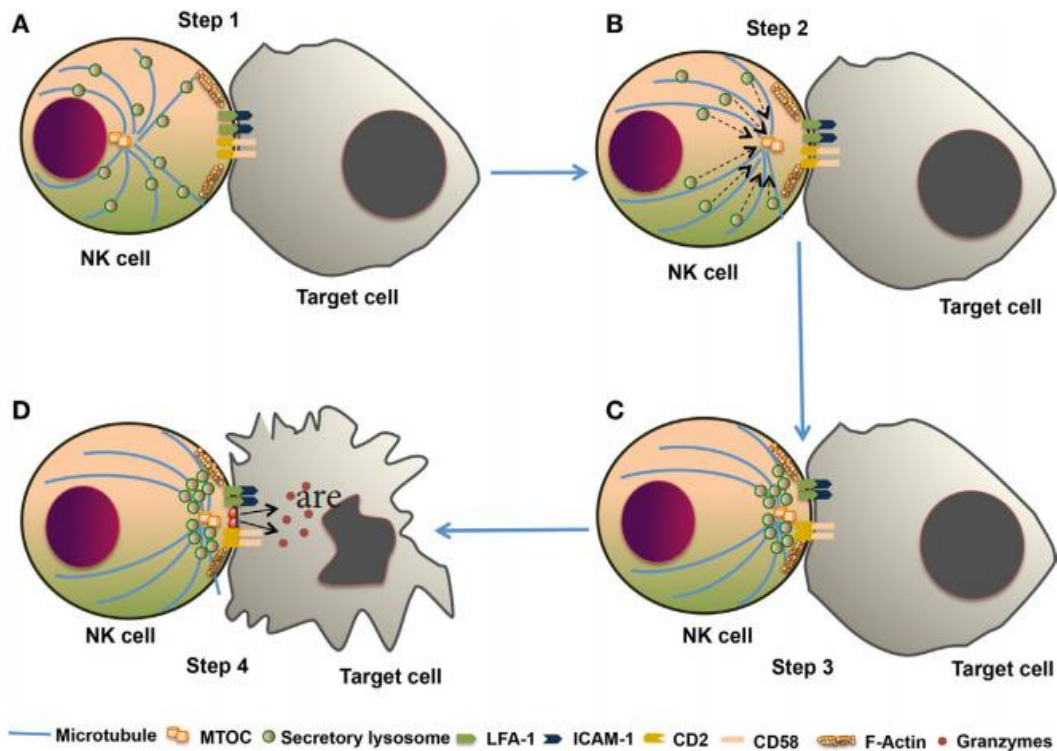


Figura 3. Respuesta citotóxica de las células NK. Se desarrolla en cuatro etapas. (A). Etapa 1: formación de sinapsis inmunológica. (B). Etapa 2: organización del centro de microtúbulos y el lisosoma secretor se polariza hacia la sinapsis inmunológica. (C). Etapa 3: movimiento del lisosoma a la membrana plasmática de la NK. (D). Etapa 4: liberación de los gránulos citotóxicos. (Tomado de Paul et al., 2017)

Este proceso, una vez concluido, conduce a la degranulación de la NK, es decir, la liberación de moléculas citotóxicas como la perforina y la granzima. La degranulación se usa a menudo para la medición de la actividad citotóxica de las células NK. Durante la degranulación, la proteína de membrana asociada a lisosoma 1 (LAMP-1 o CD107a) se transloca a la superficie de la membrana celular después de la estimulación, por ello, la expresión de CD107a se ha utilizado como un marcador para la degranulación de células NK y linfocitos T CD8+. La perforina liberada en las células blanco se polimeriza y forma los poros, facilitando así la entrada de granzimas en dichas células. Las granzimas son serin-proteasas que activan a las caspasas y por lo tanto inducen la apoptosis de las células diana (Paul & Lal, 2017).

Activación de receptores de apoptosis (Fas-FasL)

El otro mecanismo mediante el cual la célula NK induce la apoptosis de la célula diana es mediante la expresión del receptor de muerte; estos receptores pertenecen a la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) como son el FasL (CD95L), o receptores como TRAIL-R que transducen señales para activar la apoptosis vía sus ligandos Fas (CD95) o TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado al TNF). El más representativo es el FasL, el cual se localiza en la cara interna de las vesículas y solo se expresa en la superficie de las células NK cuando estas se activan. Fas es expresado en las células blanco de manera constitutiva y es un monómero que al activarse se trimeriza, por lo que recluta a una proteína adaptadora FADD (del inglés Fas-associated via death domain); FADD contiene un dominio de muerte y un dominio adicional llamado dominio efector de la muerte (DED) que recluta las caspasas iniciadoras pro-caspasa 8 y 10. Esto lleva a la activación de las caspasas, produciendo así la muerte celular programada en las células malignas (Fig. 4) (Montserrat Sanz et al., 2013; Murphy K., 2012).

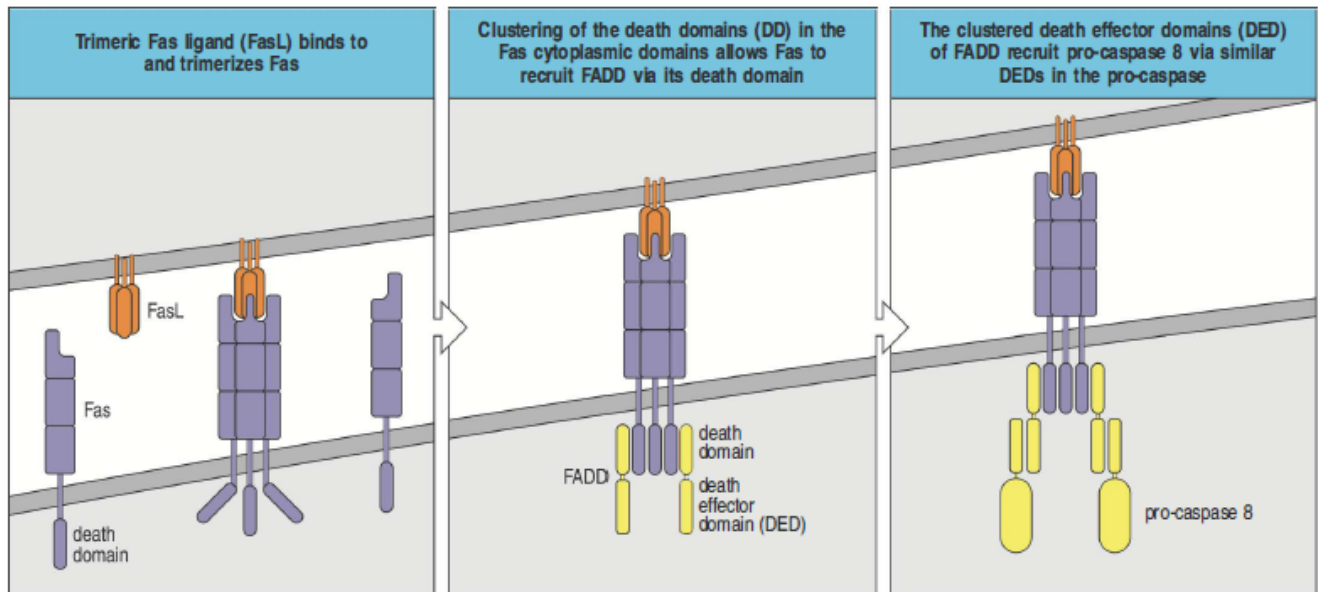


Figura 4. Mecanismo inductor de apoptosis por Fas-FasL. Unión de FasL trimerizado a Fas, reclutamiento de FADD y pro-caspasas 8 y 10, desencadenando así el mecanismo de apoptosis. (Tomado de Murphy k., 2012)

Participación de las células NK con diversas enfermedades

Se ha encontrado que las células NK participan en diversas enfermedades, ya que pueden actuar sobre otras células durante la condición de enfermedad. Como se mencionó anteriormente, las NK actúan en la defensa contra infecciones virales y contra las células tumorales, ya sea a través de sus receptores, la liberación de gránulos citotóxicos o debido a la producción de citocinas. En la mayoría de los casos, las células NK controlan estas enfermedades, sin embargo la importancia de las NK se ha estudiado en enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, en el asma, las células NK contribuyen de manera positiva, al progreso de la respuesta alérgica en las vías aéreas mediada por células T, durante la fase de sensibilización específica del antígeno. En algunas enfermedades autoinmunes humanas, como el lupus eritematoso sistémico se ha observado una disminución de la función citotóxica y una reducción en el número de células NK. Por otro lado, se ha observado un incremento en la actividad citotóxica de las células NK, como es el caso de la diabetes tipo I, en donde las NK aparentemente medían la destrucción de los islotes pancreáticos. En la artritis reumatoide, las células NK de los tejidos podrían promover la enfermedad, puesto que en 2005 se reportó que los

pacientes con esta enfermedad presentaban una acumulación en el líquido sinovial de NK CD56^{bright} que segregan cantidades elevadas de IFN- γ en comparación con las células NK presentes en circulación de los mismos pacientes. También se ha visto que en los modelos animales de esclerosis múltiple, la enfermedad se exagera cuando se eliminan las células NK, por lo que se le ha dado un papel a éstas células en el control de las enfermedades autoinmunes (Mandal & Viswanathan, 2015). Finalmente, las células NK se han visto alteradas en su función en diversas Inmunodeficiencias primarias, siendo este el tema principal del presente trabajo, por lo que a continuación se profundizará en definir a estas enfermedades y en particular, a la Inmunodeficiencia Común Variable.

Inmunodeficiencias

Las inmunodeficiencias son defectos en uno o más componentes del sistema inmunitario, las cuales se clasifican en secundarias y primarias. Las secundarias se originan por la pérdida de la función inmunitaria, que se produce por la exposición a un agente externo, como malnutrición, cáncer diseminado, tratamiento con fármacos inmunosupresores o citotóxicos, así como también la infección de células del sistema inmunitario, sobre todo por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Abbas A., 2015; Owen J., 2014). Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) forman un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios, generalmente causados por mutaciones genéticas específicas que afectan el desarrollo y la función de algún componente del sistema inmunitario. Las IDPs pueden caracterizarse por diversas manifestaciones clínicas, que van desde trastornos inmunes asintomáticos hasta enfermedades asociadas con infecciones graves, autoinmunidad y tumores malignos (Orange, 2014).

Estas enfermedades comprenden 330 trastornos distintos con 320 defectos genéticos diferentes, que aumentan la propensión a las infecciones. Con frecuencia, se manifiestan en la lactancia y la infancia, pero a veces en fases posteriores de vida (Abbas A., 2015; Picard et al., 2018).

Las IDPs han sido clasificadas por la unión internacional de sociedades de inmunología en: inmunodeficiencias combinadas de células T y B; defectos en fagocitos; trastornos genéticos de la regulación inmunológica; defectos en la inmunidad innata: receptores y componentes de señalización; deficiencias del complemento; síndromes bien definidos e inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos conocidas también como inmunodeficiencias humorales (Fig. 4). Siendo ésta última inmunodeficiencia la más frecuente ya que representa alrededor del 56% del total de las IDPs diagnosticadas y se detallará a continuación debido a que a este grupo pertenece la inmunodeficiencia común variable. (Fig. 5) (Van Dyke, 2007).

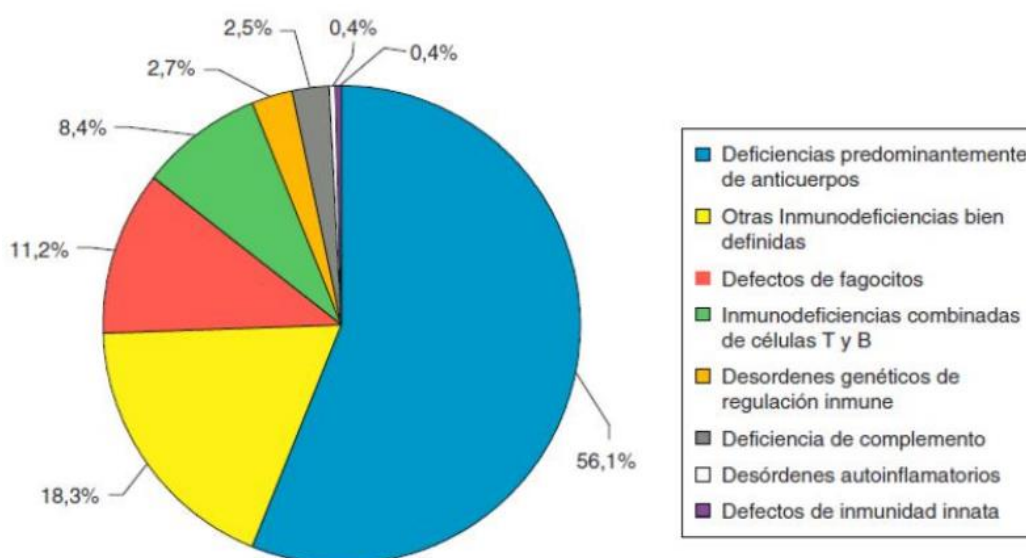


Figura 5. Frecuencia de inmunodeficiencias primarias de acuerdo al registro de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (Tomado de www.esid.org)

Inmunodeficiencias primarias de anticuerpos

En contraste con la mayoría de las IDPs que involucran otros componentes del sistema inmunológico, las inmunodeficiencias primarias de anticuerpos (IDPAs) pueden presentarse a cualquier edad con picos en la infancia y en la tercera década de la vida. Estas son un grupo heterogéneo de trastornos con diferentes etiologías, en el cual la consecuencia final común es la incapacidad de producir una inmunidad humoral efectiva contra patógenos invasores. Lo anterior es resultado de mutaciones genéticas únicas que codifican

proteínas que desempeñan un papel crítico en el desarrollo del linfocito B (Van Dyke, 2007). Las IDPAs, a su vez, se subclasifican en tres tipos principales: la agammaglobulinemia (caracterizada por la disminución drástica de todos los isotipos de inmunoglobulinas debido a un defecto en la diferenciación temprana del linfocito B), la inmunodeficiencia común variable (CVID) (en la que existe una reducción de las concentraciones de al menos dos de los tres isotipos de inmunoglobulinas que se encuentran en suero: IgM, IgG e IgA, sin embargo los linfocitos B están presentes en circulación, aunque comúnmente presentan defectos en la diferenciación a linfocitos B de memoria) y el síndrome de hiper-IgM, en el que sólo hay producción de IgM y la producción de IgG e IgA está disminuida, esto debido a un defecto en el cambio de isotipo en los linfocitos B (López-Herrera, 2016). Tanto en la agammaglobulinemia como en el síndrome de Hiper-IgM, los linfocitos B se encuentran afectados. Sin embargo los defectos genéticos reportados en estas enfermedades, difieren en que en la CVID, las proteínas afectadas por las mutaciones genéticas se expresan en varios tipos celulares, mientras que la agammaglobulinemia y el síndrome Hiper-IgM, los genes afectados son en su mayoría expresados en linfocitos B. Debido a que los genes involucrados en estas dos enfermedades no se relacionan con las células NK, no se esperan alteraciones en ellas. No obstante se ha propuesto que en CVID puede haber defectos en diferentes tipos celulares.

Inmunodeficiencia común variable

La CVID es una de las inmunodeficiencias primarias más prevalentes, con una morbilidad importante. Su prevalencia se estima 1:10,000 y 1:50,000, con una edad de inicio variable, con una incidencia máxima en la infancia y en la segunda y tercera década de la vida (Bogaert et al., 2016).

Los hallazgos clínicos asociados con este síndrome comprenden concentraciones bajas de dos de las tres inmunoglobulinas principales en suero (IgG, IgA e IgM), alteración de las respuestas de anticuerpos a la infección o las vacunas y aumento en la incidencia de infecciones. En la mayoría de los pacientes se encuentran números normales de células B, sin embargo, el 50%

de los pacientes tienen linfocitos B de memoria reducidos. Además se caracterizan por la ausencia de las células plasmáticas en los tejidos linfoides, lo que indica un bloqueo en la diferenciación del linfocito B hacia las células secretoras de anticuerpos (López-Herrera, 2016; Yong, Thaventhiran, & Grimbacher, 2011).

En general, la CVID se manifiesta por infecciones bacterianas severas, recurrentes y a veces crónicas principalmente de las mucosas de los tractos gastrointestinal y respiratorio (especialmente sinusitis, otitis, bronquitis y neumonías). Además de los problemas infecciosos, esta enfermedad también se ha asociado con una mayor ocurrencia de cáncer y autoinmunidad (Berrón-Ruiz, 2017).

Por otra parte, en CVID se han descrito defectos en respuestas celulares, por ejemplo, en la inmunidad innata se ve afectado el número y función de células dendríticas, éstas presentan un aumento en la secreción de TNF- α después de la estimulación con productos bacterianos. En el caso de las células T, éstas presentan una reducción de la proliferación en respuesta a mitógenos y antígenos, ausencia de la generación de células T específicas de antígeno después de una vacunación, expresión reducida de CD40L en células T activadas y una desregulación de citocinas (Yong et al., 2011). En lo referente a las células NK, se han observado niveles reducidos en circulación de éstas células (Aspalter, Sewell, Dolman, Farrant, & Webster, 2000), sin embargo, a la fecha se desconoce la ocurrencia de defectos funcionales en estas células en los pacientes con CVID.

En la CVID, los procesos autoinmunes están presentes en el 25-50% de los pacientes, los más frecuentes son las citopenias autoinmunes como trombocitopenia, anemia hemolítica y con menos frecuencia, neutropenia. Además, el riesgo de desarrollar neoplasias es significativamente superior que en las personas sanas. Las neoplasias constituyen la causa más importante de mortalidad temprana en los individuos, ya que se estima que 20% de los pacientes adultos con CVID desarrollaran alguna neoplasia. Las enfermedades más comunes en estos pacientes son los linfomas de no-hodkin de origen B y el

carcinoma gástrico (O’Farrill-Romanillos, Herrera-Sánchez, Hernández-Fernández, & López-Rocha, 2017; Park M. A., 2008). Finalmente, las infecciones virales en esta población son de gran interés debido a que los virus contribuyen con una mortalidad significativa, pues los pacientes que cursan con defectos en la inmunidad celular pueden presentar infecciones por citomegalovirus, herpes zoster, hepatitis C, enterovirus y norovirus (Jones, Buckland, Breuer, & Lowe, 2019).

Clasificación de la inmunodeficiencia común variable

Como ya se ha mencionado, un defecto común en los pacientes con CVID es la formación anómala de anticuerpos, pero con los actuales conocimientos sobre maduración y diferenciación de las células B se han definido otras alteraciones en las subpoblaciones de estas células, por ejemplo en las células B de memoria. Por lo anterior, a partir del 2012, en Freiburg se clasificó a los pacientes con CVID de acuerdo al porcentaje de células B de memoria con cambio de isotipo en tipo I, II y III (tabla 1), utilizando marcadores específicos para esta población (CD19, CD27 e IgM/IgD) (Berrón-Ruiz, 2017).

Tabla 1. Clasificación de Freiburg

<p>Grupo I: incluye pacientes con < 0.4 % células B CD27+ IgD- (células B de memoria con cambio de isotipo) de los linfocitos totales.</p> <ul style="list-style-type: none">• Tipo Ia: > 20 % de las células B CD19+, CD21 bajo. (Se asocia con esplenomegalia y procesos autoinmunes).• Tipo Ib: < 20 % de las células B CD19+, CD21 bajo. <p>Grupo II: Incluye pacientes con > 0.4 % de células B CD27+ IgD- (células B de memoria con cambio de isotipo) de los linfocitos totales.</p> <p>Grupo III: incluye pacientes con < 1 % de células B.</p>

Tomada de Berrón-Ruiz, 2017

De acuerdo a la clasificación de Freiburg se ha correlacionado al tipo de CVID con ciertas características clínicas. En el grupo Ia se presenta esplenomegalia en el 100% de los pacientes y 60% de ellos presentan citopenias autoinmunes. Mientras que en el grupo Ib y el grupo II es más común otros fenómenos autoinmunes como el vitíligo y la anemia perniciosa. Por otra parte los pacientes con CVID tipo II pueden presentar un incremento en la proliferación o decremento en la apoptosis de células B (Warnatz et al., 2002).

Defectos genéticos asociados a CVID

La mayoría de los casos de CVID ocurren esporádicamente, solo cerca del 5% al 25% de los pacientes tienen antecedentes familiares positivos, de los cuales la mayoría demuestra una herencia autosómica dominante. La heterogeneidad clínica, combinada con la edad variable de aparición sugiere que la CVID es una colección de entidades clínicas causadas por una serie de defectos genéticos distintos. Con la secuenciación del genoma de los pacientes con un fenotipo CVID se han identificado diversos defectos genéticos, como *CTLA4*, *LRBA* o *PIK3CD*, entre otros (Fig. 6) (Bogaert et al., 2016).

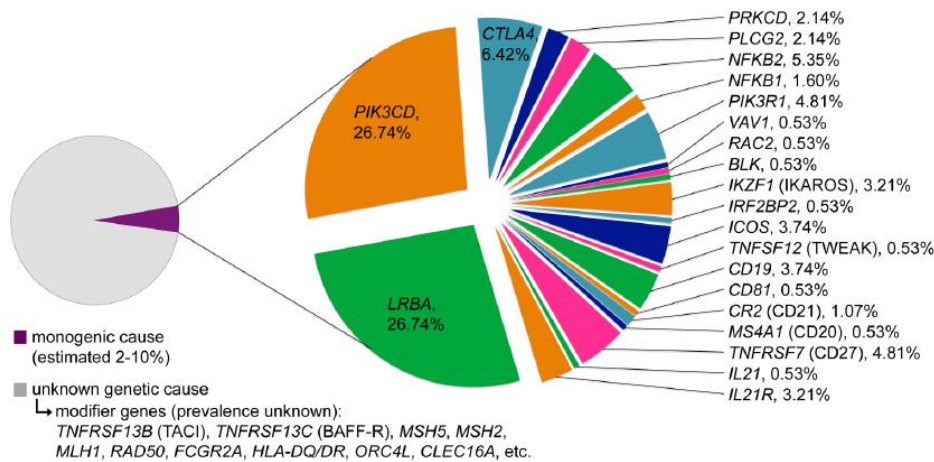


Figura 6. Defectos genéticos en CVID
 Proporción estimada de los defectos genéticos involucrados dentro de la población de CVID de acuerdo a los casos publicados. (Tomado de Bogaert et al., 2016)

Por otra parte, muchos de los genes asociados con CVID no se expresan en células NK, sin embargo, algunos de estos se expresan de manera positiva en NK y se ha descrito que algunos defectos en ellos afectan el funcionamiento,

desarrollo y porcentaje de estas células. Por ejemplo López-Herrera en 2012, reportó que la mayoría de los pacientes con mutaciones en *LRBA* presentan una disminución en el porcentaje de NK. De manera adicional se ha visto que en células de ratón, LRBA está implicado en la eficiente señalización del receptor activador NKG2D y NKp46 de las células NK (Mi Young Park et al, 2016). Algunos genes que se han asociado con alteraciones en el número de NK son *TNFRSF7* y *PLCG2*, entre otros (Bogaert et al., 2016; Caraux et al., 2006). En la tabla 2 se resume la función de cada gen en las células NK.

Tabla 2. Relación de los genes asociados a CVID con la funcionalidad en células NK

Gen asociado con CVID	Función en células NK	Referencia
<i>ICOS</i>	La interacción con la célula NK a través de su ligando (ICOSL) incrementa su capacidad citotóxica.	(Cairo et al., 2015)
<i>TNFRSF13B (TACI)</i>	Expresado en células B, reconoce citocinas que promueven la supervivencia de linfocitos B. No se expresa en NK.	Revisado por (López-Herrera, 2016)
<i>TNFRSF13C (BAFFR)</i>	Se expresa en células B, importante en la interacción con BAFF, un factor de supervivencia de los linfocitos B. No se expresa en células NK.	(Smulski & Eibel, 2018)
<i>CD19</i>	Forma parte del correceptor del linfocito B, exacerba las señales mediadas por el receptor de antígeno. No se expresa en NK.	Revisado por (López-Herrera, 2016)
<i>CD81</i>	Molécula involucrada en la regulación del reclutamiento de células NK.	(Krämer et al., 2009)
<i>CR2 (CD21)</i>	Forma parte del correceptor del linfocito B. No se expresa en NK.	(Masilamani, Kassahn, Mikkat, Glocker, & Illges, 2003)
<i>MS4A1 (CD20)</i>	No se ha relacionado con las células NK, se expresa básicamente en linfocitos B, su función es desconocida.	Revisado por (Yong et al., 2011)
<i>TNFRSF7 (CD27)</i>	Deficiencia disminución de células NK, disminución de la citotoxicidad de las NK.	Revisado por (Bogaert et al., 2016)
<i>LRBA</i>	No se sabe su función en NKs pero se ha determinado que los pacientes con esta deficiencia presentan números reducidos de éstas células y un modelo mudo deficiente de LRBA muestra que la activación vía NKG2 es ineficiente para	(Lopez-Herrera et al., 2012; Park et al., 2016)

	la producción de IFN γ .	
PRKCD (PKC δ)	Deficiencia: Disminución o normal número de células NK, disminución o normal citotoxicidad en NK.	Revisado por (Bogaert et al., 2016)
RAC2	Adhesión homotípica de células NK	(Meng, Krokhin, Cheng, Ens, & Wilkins, 2007)
TNFSF12 (TWEAK)	Previene la citotoxicidad mediada por células NK uterinas	(Qi et al., 2016)
CTLA4	Deficiencia provoca una disminución en el número NK	Revisado por (Bogaert et al., 2016)
PLCG2	Si existe una deficiencia las células NK no segregan gránulos citotóxicos debido a la movilización defectuosa de calcio. Disminución o normal número de NK.	(Caraux et al., 2006)
NFKB2	Mutaciones en este gen afectan la actividad citotóxica de las células NK.	(Lougaris et al., 2017)
NFKB1	Mutaciones en este gen afectan la maduración y la funcionalidad de las células NK.	(Lougaris et al., 2017)
PIK3CD (PI3K p110 δ)	Inactivación disminuye la citotoxicidad de las células NK.	(Kim et al., 2007)
PIK3R1 (PI3K p85 α)	La falta de esta proteína, en ratones reduce severamente la citotoxicidad de las células NK.	(Awasthi et al., 2008)
VAV1	Se ha relacionado con una disminución la citotoxicidad de las células NK.	(Caraux et al., 2006)
BLK	Involucrado en la señalización del receptor de antígeno del linfocito B. No se expresa en células NK.	(Wang & Clark, 2003)
IKZF1 (IKAROS)	Disminución en la expresión de la proteína provoca una disminución o aumento en células NK.	Revisado por (Bogaert et al., 2016)
IRF2BP2 (IRF2)	La deficiencia genera una disminución en el número de células NK.	(Lohoff et al., 2000)

JUSTIFICACIÓN

Las inmunodeficiencias primarias no son muy estudiadas en México y aunque en la actualidad existen diversos estudios sobre la inmunodeficiencia común variable, aún quedan campos por estudiar. De hecho, no se ha terminado de definir los defectos moleculares que la causan, ni los defectos funcionales que ocurren en las células del sistema inmunológico, puesto que solo se conocen del 2 al 10% de los genes que están relacionados a esta patología y del resto se desconoce la causa. Uno de los campos que no ha sido investigado en esta enfermedad es en las células del sistema inmune innato. Debido a que esta enfermedad es una deficiencia humoral, la correcta respuesta innata es crucial para la protección contra enfermedades que pueden presentar los pacientes, sobre todo porque presentan infecciones recurrentes de las vías respiratorias y el 20% de los pacientes desarrollan neoplasias. Las células NK representan uno de los componentes celulares especializados más relevantes en nuestro sistema inmune innato pues están implicadas en la primera línea de defensa frente a infecciones víricas y células neoplásicas. Por lo tanto es importante conocer si las células NK se encuentran afectadas en la inmunodeficiencia común variable puesto que existen diversos defectos genéticos que podrían estar afectando su función, desarrollo y/o porcentaje.

HIPÓTESIS

Los pacientes diagnosticados previamente con inmunodeficiencia común variable presentaran una disminución en el porcentaje y/o una disminución en la actividad citotóxica de las células Natural killer

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la frecuencia y citotoxicidad de células NK en pacientes diagnosticados con Inmunodeficiencia común variable.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el porcentaje de células NK en sangre periférica de pacientes y controles.
- Evaluar la actividad citotóxica de las células NK mediante citometría de flujo a través de la expresión de CD107a.
- Mediante un ensayo funcional demostrar la muerte de las células diana inducida por las células NK.
- Determinar el porcentaje de perforina en las células NK de los pacientes y los controles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Participantes

Se estudiaron 17 pacientes divididos en dos grupos (8 pacientes con CVID tipo I y 7 con CVID tipo II) además de 15 individuos sanos para el grupo control.

Criterios de inclusión

A) Pacientes

Sexo femenino o masculino. Contar con diagnóstico clínico previo de CVID bajo los siguientes criterios:

- -Deficiencia de al menos dos isotipos de inmunoglobulinas en suero (IgM, IgG y/o IgA)
- -Determinación del tipo de CVID mediante la clasificación de Freiburg.

B) Controles

Sujetos sanos sin curso de enfermedad. Sexo femenino o masculino.

Criterios de exclusión

A) Pacientes

Pacientes con causas secundarias de hipogammaglobulinemia.

B) Controles

Sujetos con curso de enfermedad.

Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

A partir de aproximadamente 10mL de sangre periférica obtenida por punción venosa en un tubo con ácido-cítrico dextrosa como anticoagulante (Vacutainer), se realizó un gradiente con ficol (Lymphoprep), 1 parte de ficol más dos partes de sangre total (1:3) en un tubo falcón. Centrifugo a 1500rpm por 30min, se obtuvo las PBMCs y se realizaron dos lavados con 10mL de PBS estéril. Posteriormente se centrifugo a 1500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1mL de PBS. Finalmente se contaron las células viables utilizando la cámara de Neubauer, mediante una dilución 1:10 de las células con azul de tripano (SIGMA).

Cultivo de la línea celular K562

La línea celular K562 proviene de un paciente con leucemia mielógena crónica, en crisis blástica, que no expresa moléculas MHC clase I y tiene un bajo nivel de diferenciación. Esta línea se cultivó a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM (Gibco®) suplementado 10% con SFB, 1% L-glutamina y 1% antibiótico/antimicótico,

Ensayo de la expresión de la molécula CD107a en células NK

Para evaluar la translocación de CD107 a la superficie de las células NK, se mezclaron PBMCs con células K562 en una proporción 5:1 (40,000 células K562), 10:1 (20,000 células K562) 50:1 (15,000 células K562) ó 75:1 (15,000 células K562) en un volumen final de 200µl de medio RPMI (Gibco®) suplementado (10% con SFB, 1% L-glutamina y 1% antibiótico/antimicótico) y se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂ empleando una estufa de cultivo celular (NUAIRE). Después se adicionó 2µl de las siguientes mezclas de anticuerpos: anti-CD45PerCp/anti-CD3FitC, anti-CD16+56PE (BD Triest™), anti-CD107αAPC (Biolengd), se incubaron durante 15 minutos en oscuridad. Posterior a la incubación, se realiza un lavado con PBS estéril. Al final del lavado se agregaron 300µl de solución fijadora y se adquirieron 50,000 eventos en el citómetro de flujo (FACs Aria, Becton-Dickinson). Para el control positivo se

estimularon las células mononucleares con Ionomicina (3.75µg/mL) y PMA (200ng/mL), ambas obtenidas de Sigma-Aldrich. Mediante la utilización de Flowjo, se realizó el análisis en la región de los linfocitos. Posteriormente se seleccionaron las células CD45+ a partir de la cual se obtuvo a las células NK para finalmente obtener la expresión de CD107a.

Ensayo de la citotoxicidad de las NK mediante la muerte de las células K562

Se co-cultivaron las PBMCs con la línea celular K562 en una proporción 5:1 y 10:1 en medio DMEM (Gibco®) suplementado (10% con SFB, 1% L-glutamina y 1% antibiótico/antimicótico) en un volumen final de 200µl, se incubaron por 2 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se adiciono 1.5µl de anticuerpo CD71-FitC (Beckman Coulter). Se realizó un lavado con 2mL de PBS, se centrifugo 5 minutos a 1500rpm y se resuspendieron las células en 300µl de PBS. Finalmente se adiciono 0.5µl de yoduro de propidio (IP, eBioscience) y se analizaron en el citómetro de flujo adquiriendo 2,000 eventos de la región de células K562.

Tinción intracelular de perforina en células NK

Para este ensayo se utilizaron 500,000 PBMCs. Primero se realizó una tinción superficial, utilizando 1.0µl de los siguientes anticuerpos CD45-ECD (Beckman Coulter), CD3-PC5 (Beckman Coulter) y CD21-FitC (Beckman Coulter). Se incubo por 15min a 4°C en oscuridad, posteriormente se lavaron las células con 2mL de PBS y se adicionaron 300 µl de solución fijadora durante 10min. Después se centrifugaron las células por 5min a 1500rpm; se dejaron por 10 min en 500µl de saponina al 0.1% (SIGMA-ALDRICH®). A continuación, se centrifugaron a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se adiciono 4.0µl del anticuerpo anti-perforina-PE (BD Pharmingen™) y 3.0 µl de un control negativo en el que se empleó un control de isotipo-PE (Mouse IgG2b, BD Pharmingen™). Finalmente se realizó un lavado con 3mL de saponina al 0.01%,

se adiciono con 300µl de solución fijadora y se adquirieron 50,000 eventos en el citómetro de flujo (BD FACSAria™ Cell Sorter).

Análisis de datos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante pruebas T no pareadas (U- Mann-Whitney) para evaluar las diferencias entre la expresión de CD107a, la muerte de las células blanco K562 y el % de perforina en las células NK. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.

RESULTADOS

Porcentaje de células NK

El análisis de la población de células NK por citometría de flujo, se realizó mediante la selección de la región de los linfocitos en el gráfico de tamaño contra granularidad. posteriormente a partir de la población CD45⁺ se identificó a las NK (CD16+56⁺, CD3⁻), a partir de dicha región se obtuvo el gráfico de puntos de CD107-APC vs CD16+56-PE obteniendo así el porcentaje de expresión de la molécula CD107a tanto gráficamente como en un histograma. (Fig. 7)

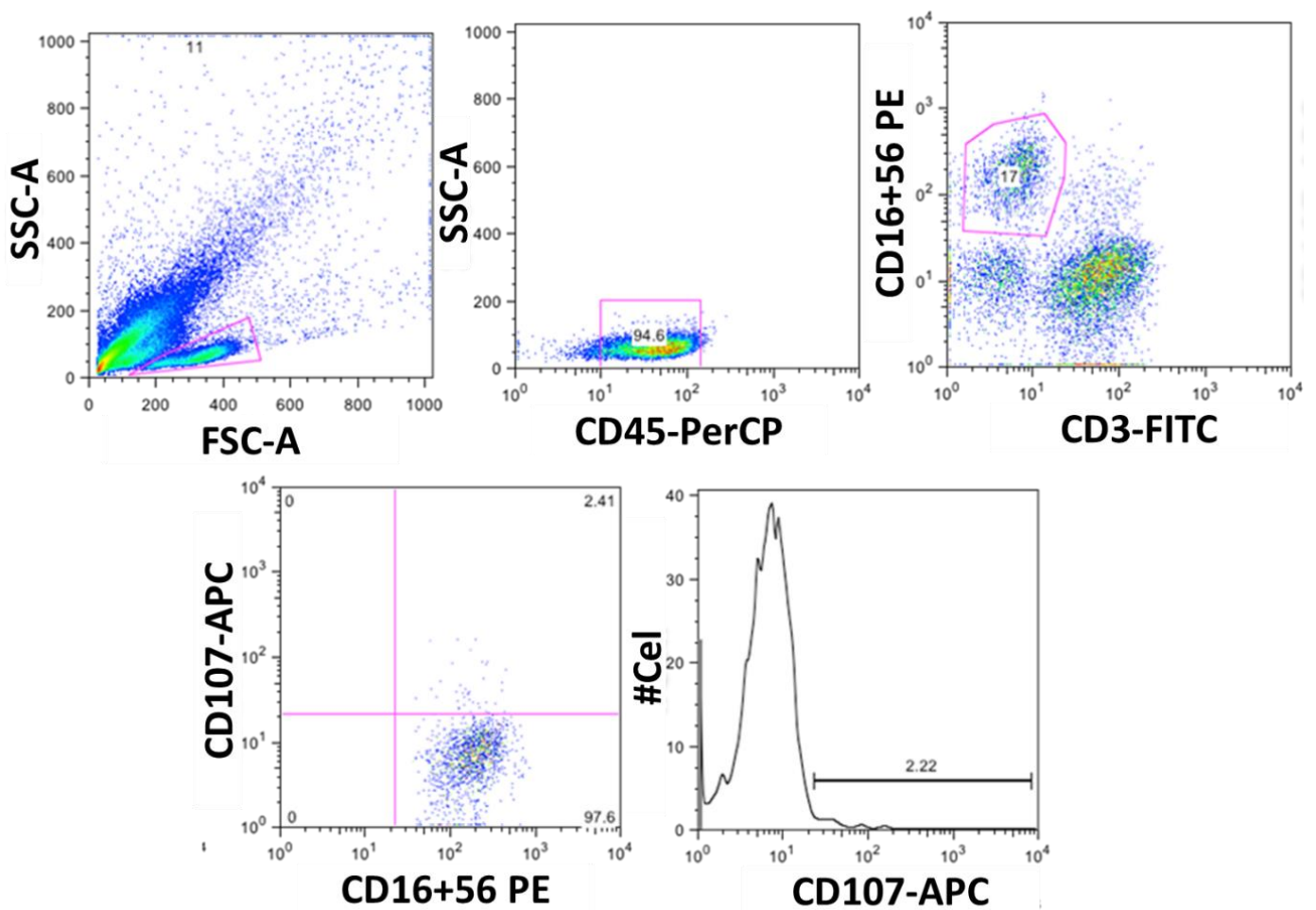


Figura 7. Análisis de la población de células NK y la expresión de CD107a. El análisis se realizó en la región de los linfocitos. Posteriormente se seleccionaron las células CD45⁺ a partir de la cual se obtuvo a las células NK. Finalmente se analizó la expresión de CD107a.

Del análisis anterior, se obtuvieron los porcentajes de células NK tanto en pacientes como en controles. Se realizó un análisis estadístico, utilizando la prueba U de Mann-Whitney ya que se tenían datos no pareados, con la finalidad de conocer si existía una diferencia en el % de células entre ambos grupos. En la figura 8 se muestra el porcentaje de NK en pacientes y controles. Se observa que el porcentaje de estas células es menor en los pacientes en comparación con los controles, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0093$).

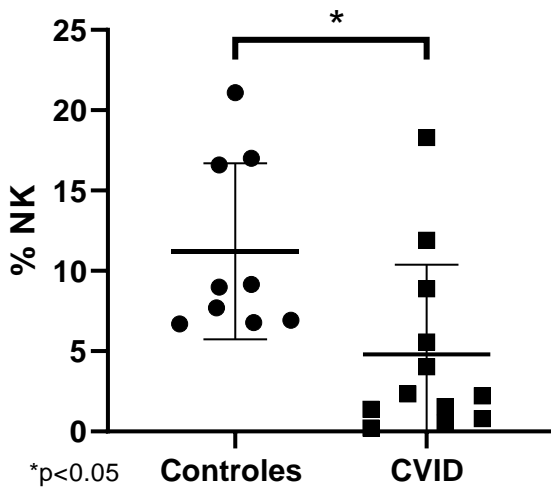


Figura 8. Porcentaje de células Natural Killer en controles y pacientes. Se observa una diferencia significativa entre ambos grupos. ($p=0.0093$)

Evaluación de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediante la expresión de la molécula CD107a en la superficie celular.

Al encontrar una diferencia significativa en el porcentaje de células NK, se prosiguió con la estandarización del ensayo de la expresión de la molécula CD107a utilizando las muestras de controles sanos (Fig. 9). Para ello, se esperaba que las células NK, que se consideran funcionales en estos individuos, expresaran mayor cantidad de CD107a en la membrana, cuando se enfrentaban a PMA + ionomicina y a las células K562. Para esto, se utilizaron las PBMCs de controles en 6 condiciones de cultivo: células sin estímulo, células estimuladas con PMA (200ng/mL) + Ionomicina (3.75 μ g/mL), y en proporciones de 5:1, 10:1, 50:1 y 75:1 con la línea celular K562. La condición sin estímulo fue utilizada como control negativo, mientras que las células estimuladas con

PMA+Ionomicina fueron utilizadas como control positivo. Finalmente, con las distintas proporciones (5:1, 10:1, 50:1 y 75:1) de PBMCs con la línea celular, se determinó mediante un análisis estadístico con cuál de estas proporciones las células de los controles eran capaz de activarse y por lo tanto expresar un mayor porcentaje de CD107a que en las células sin estímulo.

Como se puede observar en la fig. 9, las proporciones seleccionadas para realizar el ensayo en pacientes fueron 5:1 y 10:1 (recuadro rojo) debido a que en ambas condiciones el porcentaje de CD107a es mayor que el basal. Se observó una diferencia significativa para la condición 10:1 ($p=0.0033$) y para la condición 5:1, el resultado es cercano a ser significativo ($p=0.0788$). Por el contrario en 50:1, la expresión de CD107a no incrementó ($p=0.4820$) y en 75:1 se obtuvo una menor expresión de CD107a ($p=0.3171$).

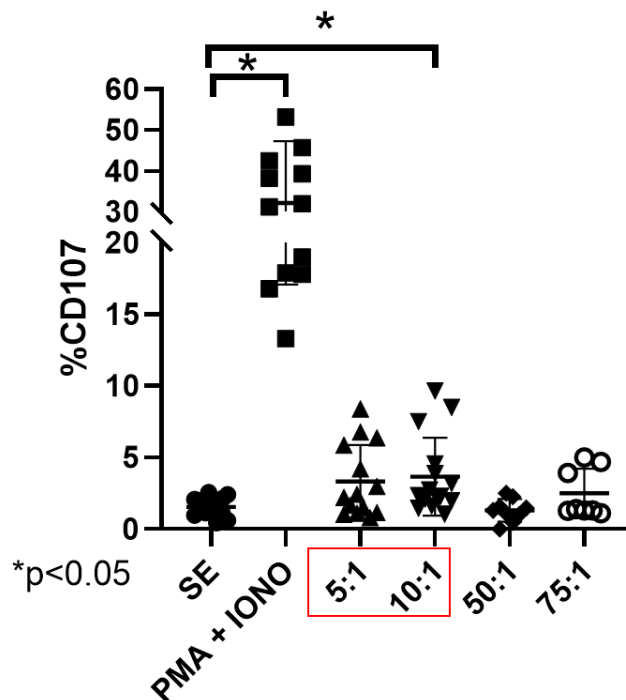


Figura 9. Estandarización de la expresión de CD107a en PBMCs de controles. Se muestra el %CD107 expresando en las distintas condiciones: SE, PMA + Ionomicina, 5:1, 10:1, 50:1 y 75:1. Existe una diferencia significativa entre las células sin estímulo (SE) y estimuladas con PMA+Ionomicina ($p<0.0001$); y entre las células SE y el cultivo con la línea celular K562 en la proporción 10:1 ($p=0.0033$). Las condiciones elegidas se muestran en un recuadro de color rojo.

Expresión de CD107a en pacientes con COVID.

A partir de las dos condiciones seleccionadas, se procedió a realizar la detección de la expresión de CD107a en 17 pacientes con COVID y 15 controles. Para esto, se emplearon las siguientes condiciones: PBMCs no estimuladas, células estimuladas con PMA y ionomicina y PBMCs en co-cultivo con la línea celular K562 en proporciones 5:1 y 10:1. Se incubaron por dos horas a 37°C y 5%CO₂, para finalmente adquirirlas en el citómetro de flujo y obtener el porcentaje de expresión de CD107a.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de U de Mann-Whitney de dos formas. En la primera, se comparó el porcentaje de expresión de CD107a en las células NK de los pacientes y controles (Fig.10). No se observó una diferencia significativa entre los grupos. En el segundo análisis se comparó la intensidad media de fluorescencia (IMF), con la finalidad de conocer la cantidad de CD107a que se expresa en una célula NK. Para lo anterior, se realizó un factor, entre la IMF de CD107a en células estimuladas y la IMF de CD107a basal. Mediante este análisis, se observó una tendencia similar a la observada con los resultados del porcentaje de expresión, en donde no se observaron diferencias significativas entre los pacientes y los controles (Fig. 11).

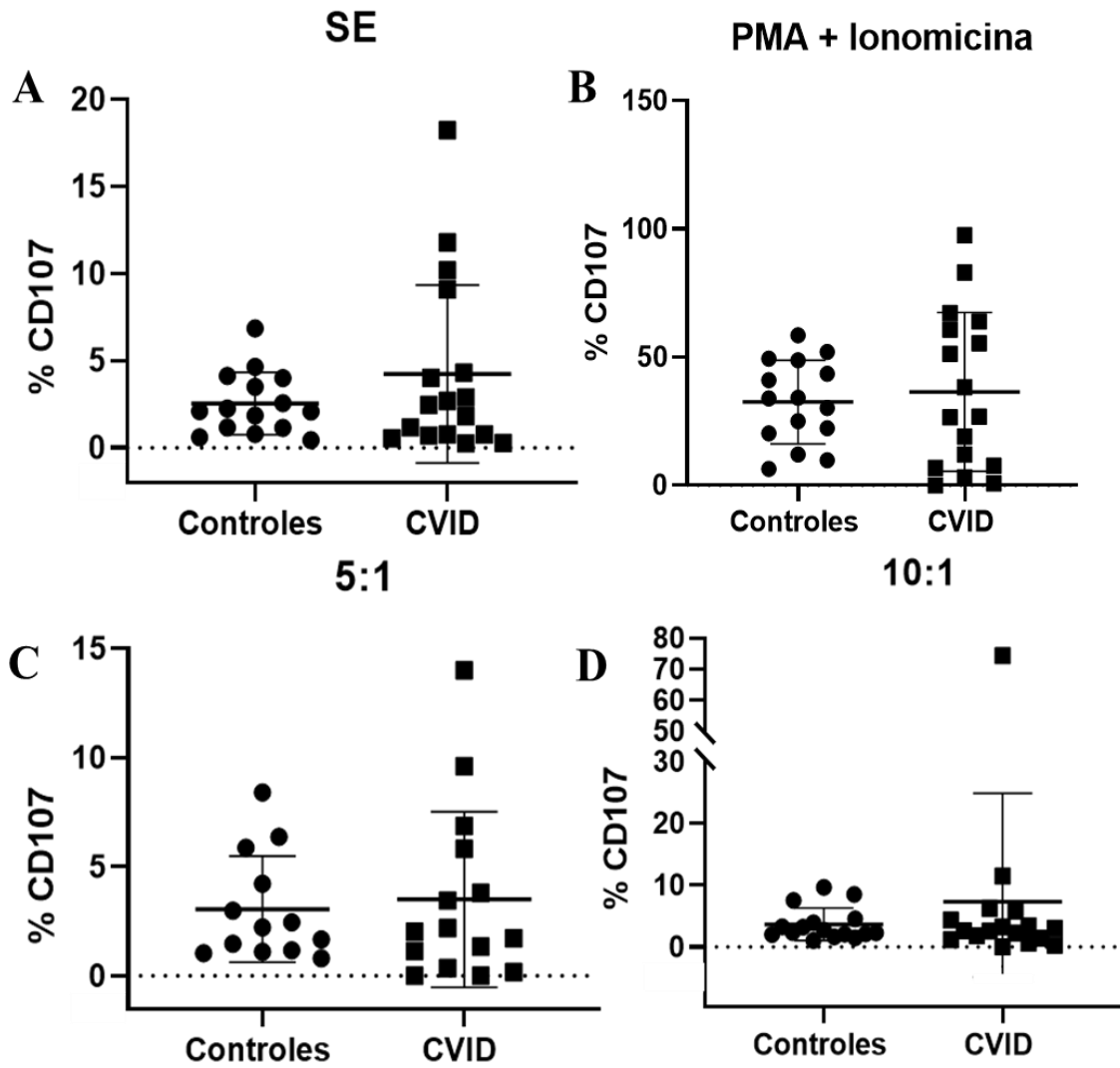


Figura 10. Análisis estadístico de la expresión de CD107a en células NK. Los gráficos representan el %CD107a en las condiciones: (A) SE (B) PMA + Ionomicina (C) 5:1 y (D) 10:1. n controles= 13; n CVID= 15

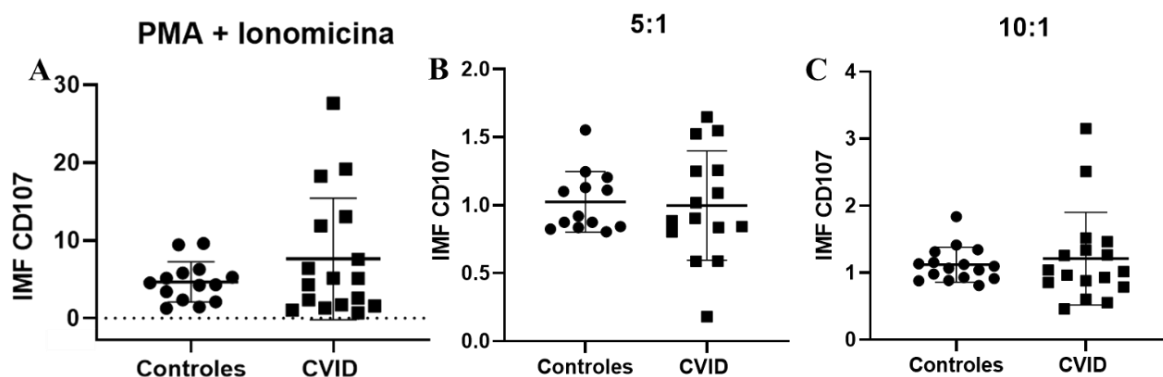


Figura 11. Análisis estadístico de la IMF de CD107a en la superficie de las células NK (A) PMA + Ionomicina (B) 5:1 y (C) 10:1. n controles=13; n CVID= 15

Por otro lado, se realizó el análisis de los datos dividiendo a los pacientes de acuerdo a la clasificación de Freiburg. Lo anterior debido a que, los pacientes presentan diferencias en las características clínicas dependiendo del tipo de CVID (I ó II) y por lo tanto, podría existir una diferencia en el funcionamiento de las células NK. Los datos obtenidos provienen de 8 pacientes con CVID tipo I y 7 pacientes con CVID tipo II. Los resultados obtenidos se compararon con el mismo análisis estadístico (U de Mann-Whitney). Como se observa en la Figura 12, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de CD107a entre el CVID tipo I o II y los controles, ya sea en condiciones basales o estimulado con PMA y ionomicina ó el coestimulo con las células K562 en la proporción 5:1 o 10:1. De manera similar, al comparar la IMF de CD107a bajo todas estas condiciones, tampoco se observaron diferencias, (Fig. 13).

A pesar de lo anterior, observamos que las células NK de ambos grupos de pacientes son capaces de activarse adecuadamente (Fig. 12B) puesto que expresan un porcentaje de CD107a similar a los controles. De manera interesante, al realizar la separación de pacientes por CVID tipo I y tipo II, fue posible apreciar que algunos de ellos presentan niveles de expresión marcadamente altos o bajos de CD107a.

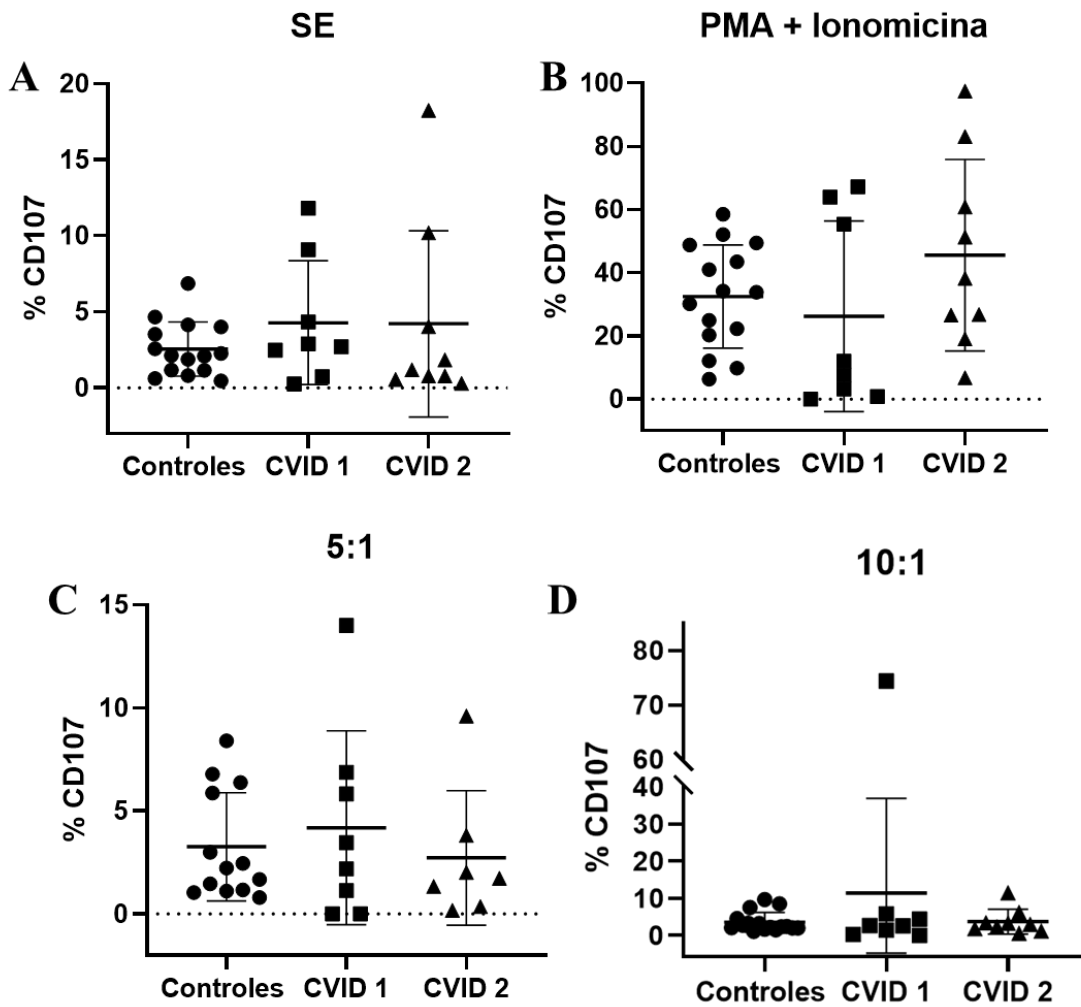


Figura 12. Análisis estadístico de la expresión de CD107a en la superficie de las células NK. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo al tipo de CVID diagnosticado (tipo I o II). Se muestra el %CD107a en las condiciones: (A) SE (B) PMA + Ionomicina (C) 5:1 y (D) 10:1. n controles=13; n CVID 1=8; n CVID 2=7

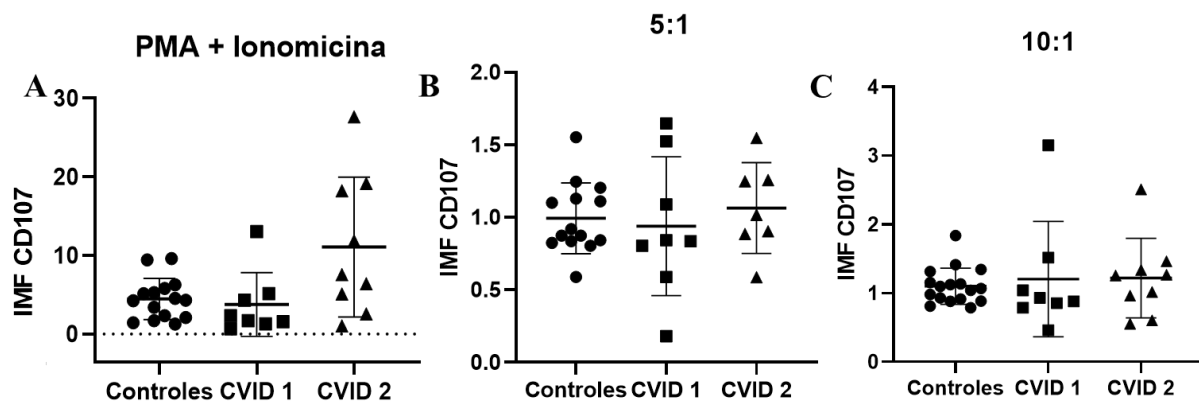


Figura 13. Análisis estadístico de la IMF de CD107a en tipo de CVID. Los pacientes se clasificaron en CVID tipo I y tipo II. Los gráficos representan la IMF en las condiciones: (A) PMA + Ionomicina (B) 5:1 y (C) 10:1. n controles=13; n CVID 1=8; n CVID 2= 7

Muerte de la línea celular K562 inducida por las células NK

La translocación de CD107a a la superficie celular no garantiza la muerte de las células diana, sino sólo proporciona información respecto a una movilización de vesículas hacia la membrana plasmática. Por este hecho, se realizó un ensayo funcional para demostrar la muerte de las células diana K562 inducida por las células NK y con ello confirmar la funcionalidad de estas células. En la figura 14 se esquematiza el contacto entre las células NK y las células K562, así como los posibles receptores involucrados en la inducción de la muerte de las células diana, como el receptor Nkp30 o el NKG2D, aunque principalmente la muerte de K562 puede deberse a la ausencia de la molécula del MHC-I en éstas células.

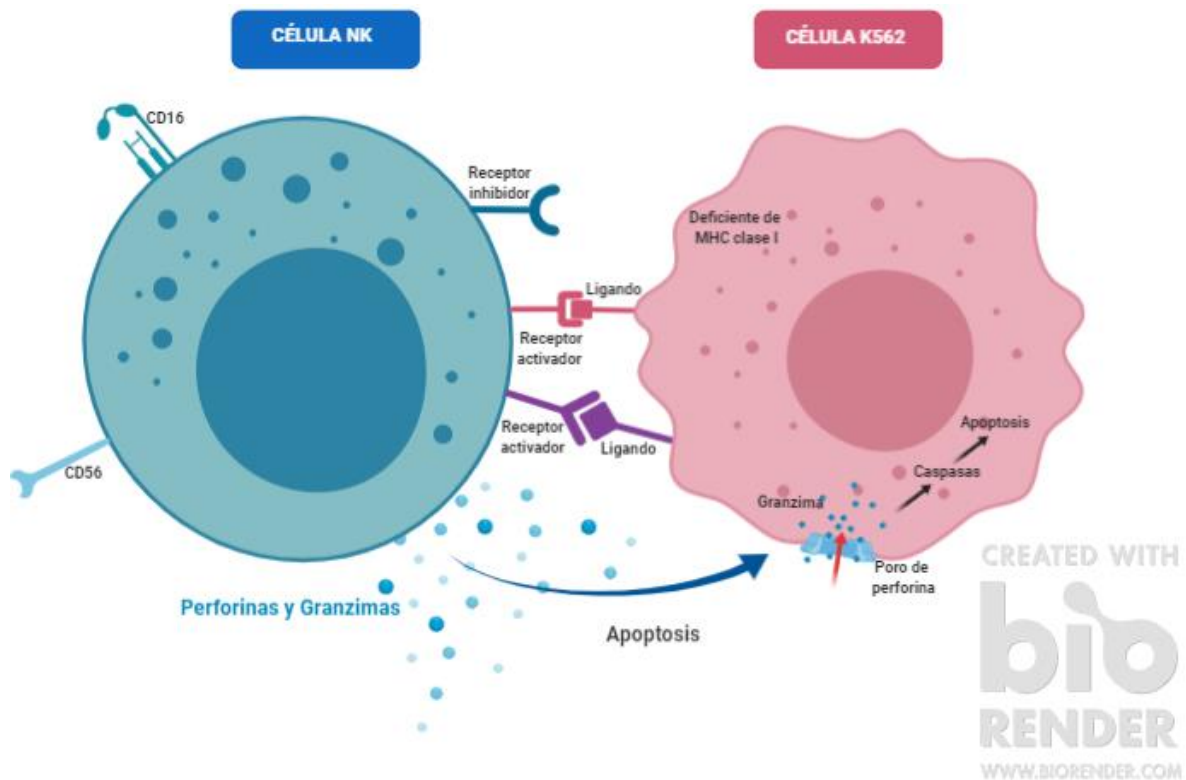


Figura 14. Esquematación del contacto entre las células NK y las células K562. A través de la interacción de los receptores activadores o la ausencia de la molécula MHC-I. Al llevarse a cabo la degranulación de la célula NK se induce la muerte de las células diana.

La estrategia de análisis para el porcentaje de muerte de la línea células K562 mediado por las células NK se realizó mediante citometría de flujo a través del gráfico de singuletes, en el cual se seleccionó la región perteneciente a las K562, posteriormente de las células positivas para CD71+ (marcador para células K562) se seleccionaron las células positivas al yoduro de propidio, obteniendo así el porcentaje de muerte de las células blanco K562 (Fig. 15).

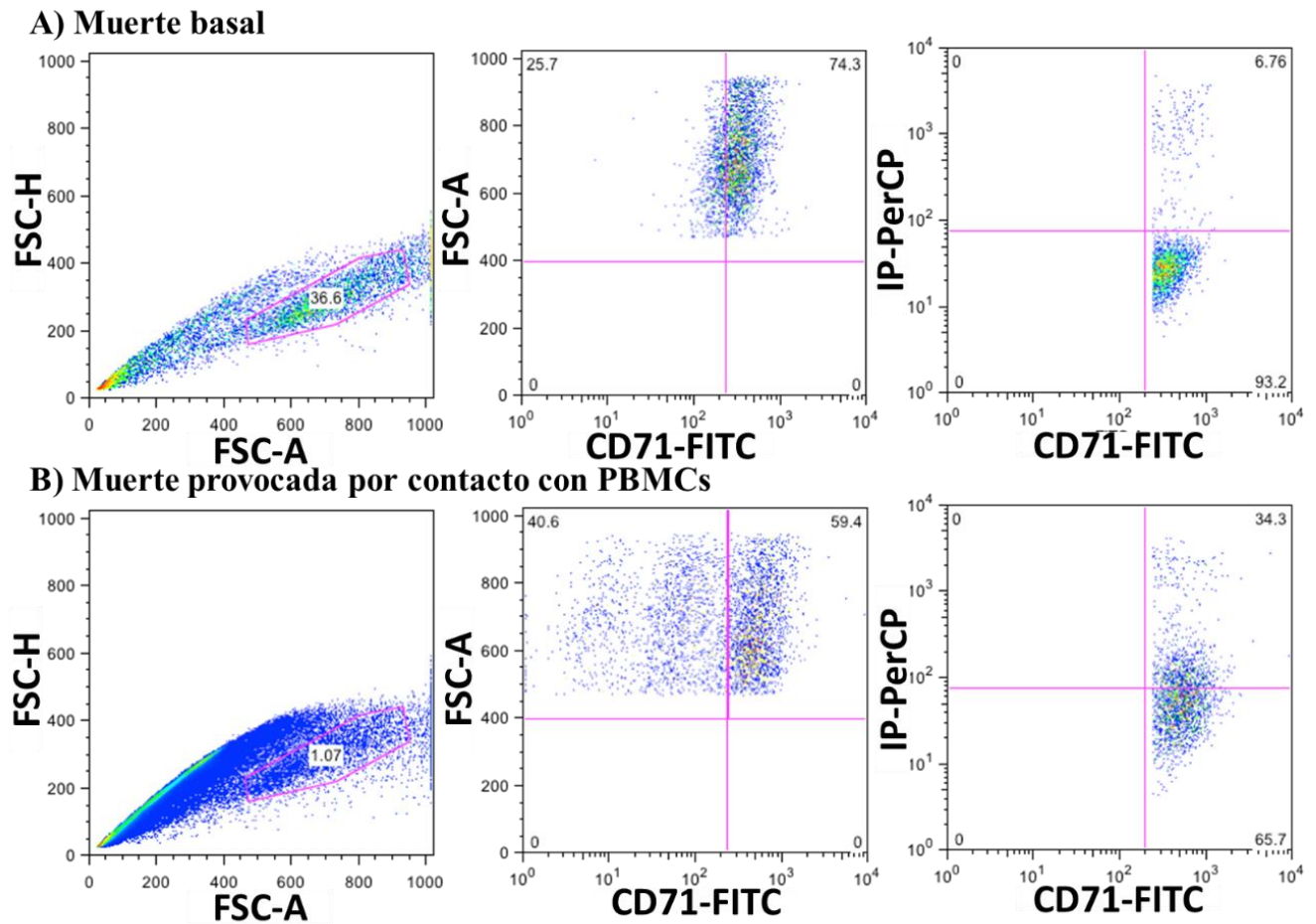


Figura 15. Análisis del porcentaje de muerte de las células K562. El análisis se realizó en la región perteneciente a las células K562 en los eventos sencillos, para posteriormente seleccionar a las K562 mediante el marcador CD71 y finalmente seleccionar a las células positivas para yoduro de propidio (IP). A) Se muestra el porcentaje basal de las células K562 positivas a IP. B) Porcentaje de muerte de las células K562 provocada por el contacto con PBMCs de pacientes o controles.

En la fig. 16 se muestran los resultados del análisis estadístico (U de Mann-Whitney) entre los pacientes y los controles con respecto al porcentaje de células positivas al Ioduro de Propidio, molécula que se sabe que ingresa al interior de la célula cuando existe una pérdida de la permeabilidad membranal, y es capaz de unirse a los ácidos nucleicos dando una señal fluorescente

El análisis estadístico se realizó tanto con los pacientes en conjunto como clasificados por el tipo de CVID. Como se aprecia en la Fig. 16, en las condiciones de cultivo de PBMCs:K562, tanto en proporción 5:1 como en 10:1, no se obtuvo un dato estadísticamente significativo entre ellos. Lo que podemos observar es que en la condición 10:1, en ambos análisis (Fig. 16 B y D), existe una tendencia. En la cual, la muerte celular de las K562 es menor en comparación con el grupo control, apreciándose una mayor tendencia en el grupo con CVID tipo I.

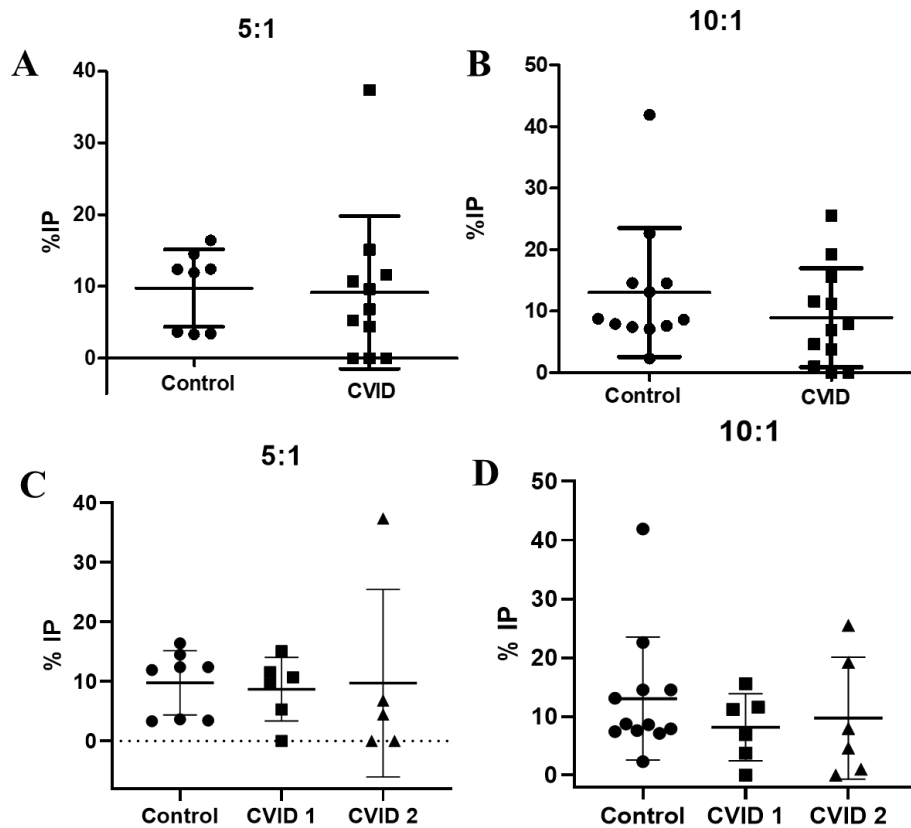


Figura 16. Análisis estadístico del porcentaje de muerte de células K562. Los gráficos representan el porcentaje de yoduro de propidio (IP) en las condiciones: 5:1 y 10:1. A y B análisis de todos los pacientes. C y D, análisis clasificando a los pacientes en CVID I y II. n controles= 8; n CVID=11

Porcentaje de perforina en células NK

Al observarse una tendencia en la disminución de la muerte de las células K562, se prosiguió a analizar el contenido de perforina en células NK por citometría de flujo. Esto se realizó mediante la selección de la región de los linfocitos en el gráfico de tamaño contra granularidad. Posteriormente a partir de la población CD21⁺/CD3⁻ (se descartan linfocitos B y T) se identificó a las células NK. Por último, este se conectó con el histograma de anti-perforina/isotipo-PE para así adquirir el porcentaje de perforina (Fig.17).

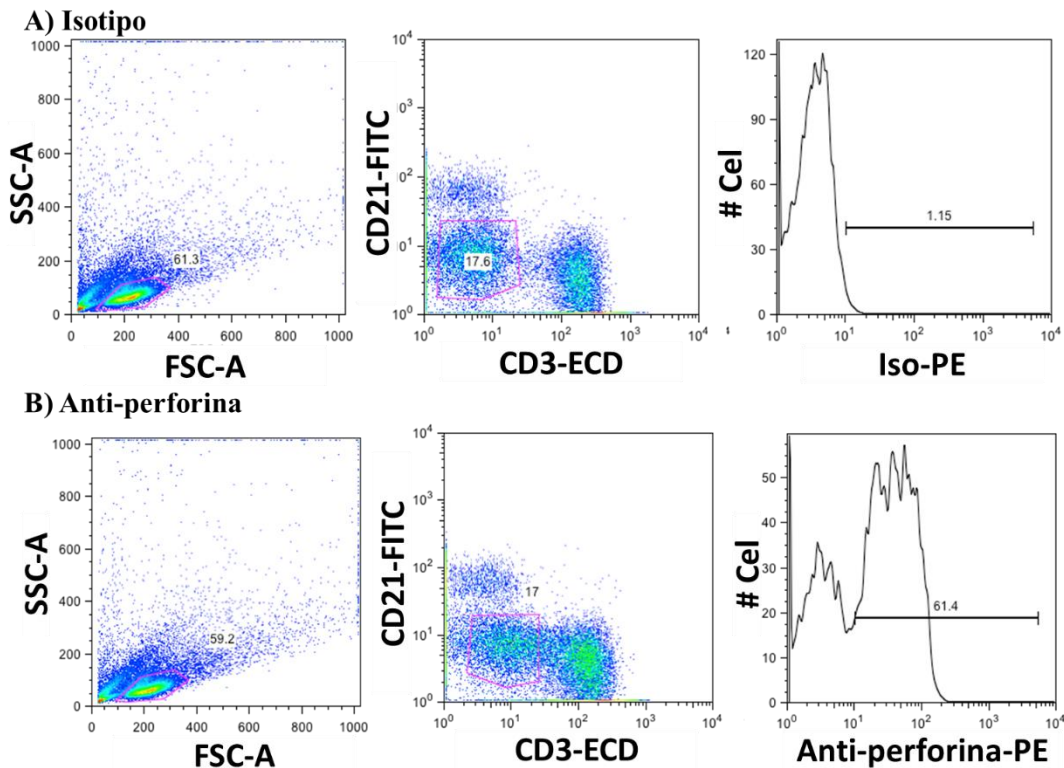


Figura 17. Análisis del porcentaje de perforina en células NK. El análisis se realizó en la región de los linfocitos. Posteriormente se seleccionaron las células CD21⁺/CD3⁻ a partir de la cual se obtuvo el porcentaje de perforina.

Por último, se realizó un análisis del porcentaje de perforina en las células NK de los pacientes (n=6) y los controles (n=4). En este caso no fue posible clasificar a los pacientes por el tipo de CVID diagnosticado, debido a que no se realizó el ensayo en suficientes pacientes, por lo tanto, se trabajó con ellos en conjunto para el análisis. Nuevamente no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, pero gráficamente se visualiza una disminución de perforina en los pacientes tanto en porcentaje como en IMF. Sin embargo, aunque no se apreciaron diferencias en la intensidad de expresión de perforina, fue posible observar como algunos de los pacientes analizados expresan porcentajes muy bajos de perforina (Fig. 18A).

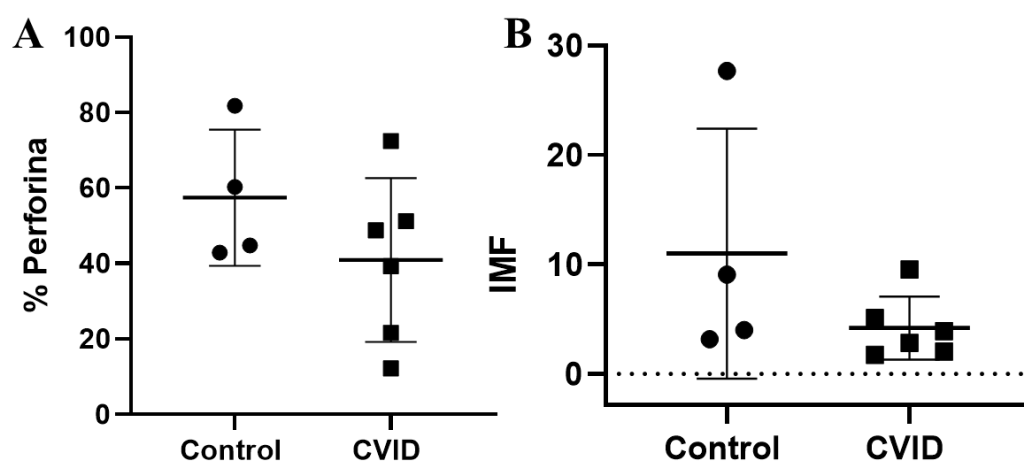


Figura 18. Expresión de perforina en las células Natural Killer. A) Porcentaje de perforina, B) IMF de perforina. n de pacientes=6 y n de controles=4

Los procesos autoinmunes, están presentes en el 25-50% de los pacientes diagnosticados con COVID; y a su vez se ha relacionado a las células NK con enfermedades autoinmunes. Por este hecho, se analizó de manera individual a aquellos pacientes con resultados que consideramos están o muy elevados o muy disminuidos respecto a la expresión de CD107a y la muerte de las células K562. Se observó que 5 pacientes presentaban un aumento o una disminución ya sea en la expresión de CD107a o en la muerte de la línea celular K562, con respecto a los controles (Tabla 3). Los pacientes 1 y 2 presentan un incremento tanto en el porcentaje de CD107a así como en el porcentaje de muerte de las células blanco, mientras que en el paciente 3 solo existe un incremento en el porcentaje de muerte de las células diana. En contraste en los pacientes 4 y 5 se observa una disminución en la expresión de CD107a y de la muerte de las K562. Por tal motivo, se recurrió a la historia clínica de los pacientes, con la finalidad de conocer si existe algún dato clínico en común entre ellos que este ocasionando que se presente dicha característica. De acuerdo a la comparación de la historia clínica de cada paciente se encontró que son menores de 20 años. Además los pacientes con incremento del %CD107a y/o %IP (muerte de cel. K562) presentan autoinmunidad, mientras que en los pacientes con una disminución no se presenta esa característica clínica.

Tabla 3. Pacientes con valores alterados en el porcentaje de CD107a y/o muerte de las células blanco.

Paciente	Edad	%CD107 (3.52±2.65)	Muerte K562 (13.03±10.47)	Autoinmunidad	IgM (42.4-197 mg/dL)	IgG (344-958 mg/dL)	IgA (36.4-305 mg/dL)	CD3 (800-3500 cel/mm ³)	CD4 (400-2100 cel/mm ³)	CD8 (200-1200 cel/mm ³)	CD19 (200-600 cel/mm ³)	%NK (6-27%)
1	17 años	11.47	25.4	Tiroiditis autoinmune	ND	ND	ND	965	473	367	274	13.8
2	14 años	74.4	15.59	Trombocitopenia autoinmune	400	270	40	289	92	139	34	12.9
3	21 años	1.81	0	Ausente	63	429	80	1643	1068	558	79	16.1
4	7 años	0.59	0	Ausente	<18.5	458	11	1027	587	440	40	24.5
5	7 Años	0	0	Ausente	224	240	25.5	1022	616	407	48	10.0

ND: No determinado

Valores de referencia: Inmunoglobulinas (Bayram et al. 2019) y poblaciones celulares (Comans et al. 1997)

DISCUSIÓN

La inmunodeficiencia común variable es el trastorno más frecuente dentro de las inmunodeficiencias humorales y afecta tanto a niños como a adultos. Debido a que es una enfermedad muy heterogénea no se han logrado caracterizar todos los defectos genéticos y funcionales asociados con esta enfermedad. Por lo que además del estudio genético, es importante el estudio de células que tienen un papel importante en la respuesta inmunológica y que además participan en el control de enfermedades (cáncer o autoinmunidad) normalmente asociadas a los pacientes con CVID, como es el caso de las células NK.

Las células NK representan uno de los componentes celulares especializados más relevantes de nuestro sistema inmune innato, jugando un papel importante en los pacientes que han sido diagnosticados con CVID. Las neoplasias constituyen la causa más importante de mortalidad temprana en esta inmunodeficiencia. Cerca del 20% de los pacientes adultos con CVID desarrollarán alguna neoplasia, y estas células están implicadas en la primera línea de defensa frente a infecciones víricas y células neoplásicas (Montserrat Sanz et al., 2013; O’Farrill-Romanillos et al., 2017). Como existen pocos estudios sobre estos linfocitos innatos en pacientes con CVID, en este trabajo se evaluó la actividad citotóxica de las células NK con la finalidad de conocer si en la CVID existen defectos funcionales en éstas células.

En este estudio se encontró una disminución de las células NK estadísticamente significativa ($p=0.0093$) entre el grupo control y los pacientes. Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Aspalter et al. 2000 (Fig. 7). Existen diversos defectos genéticos que se han asociado con la disminución en el porcentaje de células NK, como lo son CD27, PRKCD, IKZF1, (Bogaert, et al., 2016) entre otros. A su vez, estos mismos genes están relacionados con CVID, por lo que si alguno de ellos es la causa de la patología también podría ser la causa de la disminución en el porcentaje de las NK.

En este estudio, se realizó el análisis de la expresión de CD107a, a partir del cual se obtuvieron que las condiciones 5:1 y 10:1 (PBMCs:K562), mostraron una mayor expresión de CD107a, por lo que se realizó el ensayo en pacientes con CVID en estas condiciones.

La molécula CD107a se utilizó a como marcador de degranulación de las células NK, ya que su expresión en membrana se asocia con el proceso de secreción de lisosomas para inducir la liberación de perforina y granzima para inducir apoptosis en las células blanco (Cohnen et al., 2013).

Al analizar la expresión de CD107a, tanto en porcentaje como en intensidad de expresión (IMF) en pacientes con CVID, se obtuvo que estos son capaces de translocar la molécula CD107a a la membrana plasmática de manera similar a los controles sanos. En otras palabras, las células NK de los pacientes con CVID tienen la facultad de secretar los lisosomas, provocando así, la liberación de perforina y granzima, las cuales actúan sobre las células diana induciendo la muerte.

Por otra parte, la separación de los pacientes en CVID 1 y CVID 2, permitió ver un diferente comportamiento de los pacientes. Así fue posible identificar algunos individuos con alteraciones notables; aumento ó disminución en la expresión de CD107a ó en la muerte de las células K562

Sin embargo, con la detección de la expresión de CD107a no se puede asegurar que las células NK de los pacientes funcionen adecuadamente, ya que también sería necesario demostrar el funcionamiento correcto de las moléculas responsables de inducir la muerte del blanco. Es decir si la perforina y la granzima funcionan adecuadamente.

Del ensayo funcional para evidenciar la muerte de las células diana inducida por las NK, no se obtuvo una diferencia significativa. No obstante en la gráfica se observa que, a pesar de llevarse a cabo la liberación de los gránulos citotóxicos, tanto en el CVID tipo I como en el tipo II (observado por la translocación de CD107a), las células de algunos pacientes no fueron capaces

de inducir la muerte de las K562 tan eficientemente como los controles, pues se observa una menor muerte en la condición 10:1. Lo anterior podría deberse a un defecto en las rutas de señalización intracelular que desencadenan las diferentes funciones efectoras de las células NK, por ejemplo, se ha demostrado que las células NK con mutaciones en NFKB1, presentan una maduración deficiente, citotoxicidad defectuosa y una producción reducida de IFN- γ tras la estimulación *in vitro* (Lougaris et al., 2017). Otro ejemplo es el defecto en los genes *VAV1* y/o *PLCG2*, puesto que, se ha encontrado que, tanto VAV-1 como PLC γ 2 regulan la citotoxicidad de las células NK y pueden controlar diferentes pasos a lo largo de las vías que conducen a la citotoxicidad. VAV-1 regula la movilización de los gránulos hacia la célula blanco, mientras que PLC γ 2 es necesario para transmitir la señalización temprana de elevación en la concentración de calcio intracelular hasta la secreción de gránulos citotóxicos (Caraux et al., 2006). Sin embargo no son los únicos defectos genéticos que afectan la funcionalidad de las células NK, por lo que sería necesario realizar un estudio genético de diversos genes, algunos de ellos listados en la tabla 2.

Cabe mencionar que, el método utilizado para determinar la muerte de las células blanco representa un riesgo mucho menor para el profesionalista que realiza el ensayo. Pues al ser comparado con métodos que se han utilizado en diversos trabajos de investigación, estos emplean materiales radioactivos. Tal es el caso del ^{51}Cr , en donde se utiliza este isótopo para marcar a las células diana y después, mediante un contador de radiación gamma, se evalúa la radiación emitida por dichas células tras ponerlas en contacto con las células efectoras (Kane, Ashton, Schmitz, & Folds, 1996)

La actividad citotóxica de las células NK permite destruir células infectadas o células cancerosas por medio de mecanismos de secreción de gránulos citotóxicos que en su interior contienen granzimas y perforinas capaces de inducir la muerte celular. Con base en los resultados de la expresión de CD107a y la inducción de la muerte de la línea celular K562, se efectuó el último análisis; la expresión de perforina en las células NK. Los resultados obtenidos

del ensayo de perforina, no mostraron una diferencia significativa entre los controles y los pacientes con CVID, pero nuevamente gráficamente nos indica una tendencia en la disminución del porcentaje de células NK que expresan perforina en estos pacientes (Figura 18). Esta disminución en la expresión de perforina podría estar relacionado con capacidad disminuida de inducir la muerte de las células diana K562, ya que la perforina es una molécula que se polimeriza y forma poros en la membrana de la célula diana, facilitando la acción de la granzima (necesaria para la citotoxicidad) en el citosol, generando la muerte celular (Abul K. ABBAS, 2015).

Debido a que no existen diferencias significativas, excepto en el % de células NK, el ensayo se podría mejorar si éste se realizara con NK purificadas, ya que los ensayos aquí presentados se realizaron con mononucleares de sangre periférica totales, de manera que la menor citotoxicidad observada en algunos pacientes podría aludirse a una deficiencia numérica y no necesariamente a una deficiencia en la inducción de la muerte de las células blanco. Sin embargo, tanto la expresión de CD107a como de perforina se realizaron directamente en una región de células NK, por lo que dichos datos reflejan una inadecuada respuesta en las células NK en algunos de los pacientes analizados.

Finalmente se realizó un análisis adicional en aquellos pacientes que presentaron alteraciones tanto en la expresión de CD107a y/o en la inducción de muerte de las células K562, en comparación a los controles, (Tabla 3). Se observó que aquellos pacientes con una alta expresión de CD107a presentaron tiroiditis ó trombocitopenia autoinmune, mientras que los pacientes en donde la expresión de CD107a fue baja, no se presentó ningún tipo de autoinmunidad. Todos estos pacientes con alteraciones en la expresión de CD107a y/o en su actividad citotóxica, presentaron niveles normales de células NK (dentro del rango establecido, Comans-Bitter et al. 1997), lo que apoya que la función de estas células está afectada en dichos pacientes.

Recientemente se ha observado que en varios trastornos autoinmunes hay una alteración de la función de las células NK como una actividad citotóxica defectuosa o incrementada. Por lo tanto, sería interesante determinar si la producción de citocinas proinflamatorias por parte de las células NK está alterada en pacientes con COVID y si además, éste se correlaciona ó no con la aparición de enfermedades autoinmunes. Además se ha relacionado a las NK con la regulación de la intensidad del proceso inflamatorio que conduce al daño del tejido propio, ya que son capaces de influir en la respuesta inmune a través de su interacción con varios componentes inmunitarios (como los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas). Sin embargo, el papel exacto que desempeñan las NK en las enfermedades autoinmunes aún permanece inconcluso (Giancetti, Delfino, & Fierabracci, 2018; Mandal & Viswanathan, 2015).

CONCLUSIÓN

En la inmunodeficiencia común variable se ve afectado el porcentaje de células NK en pacientes. Observamos que no existe una deficiencia en la translocación de la molécula CD107a a la membrana plasmática de las células NK. Además hay una tendencia en la disminución de la muerte de las células K562, así como de perforina, en las células NK de los pacientes diagnosticados con COVID.

PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de pacientes y controles.
- Realizar el ensayo con células NK purificadas.
- Establecer valores de referencia para estimar cual es la capacidad citotóxica normal de las células NK.

REFERENCIAS

- Abbas, Abul K. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Barcelona, España: Elsevier .
- Aspalter, R. M., Sewell, W. A. C., Dolman, K., Farrant, J., & Webster, A. D. B. (2000). Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clinical and Experimental Immunology*, 121(3), 506–514. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01317.x>
- Awasthi, A., Samarakoon, A., Dai, X., Wen, R., Wang, D., & Malarkannan, S. (2008). Deletion of PI3K-p85 α gene impairs lineage commitment, terminal maturation, cytokine generation and cytotoxicity of NK cells. *Genes and Immunity*, 9(6), 522–535. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.45>
- Bayram, R. O., Özdemir, H., Emsen, A., Türk Dağı, H., & Artaç, H. (2019). Reference ranges for serum immunoglobulin (Igg, iga, and igm) and igg subclass levels in healthy children. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(2), 497–505. <https://doi.org/10.3906/sag-1807-282>
- Berrón-Ruiz, L. (2017). Alteraciones inmunológicas en la inmunodeficiencia común variable. *Revista Alergia México*, 64(1), 87. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i1.227>
- Bogaert, D. J. A., Dullaers, M., Lambrecht, B. N., Vermaelen, K. Y., De Baere, E., & Haerynck, F. (2016). Genes associated with common variable immunodeficiency: One diagnosis to rule them all? *Journal of Medical Genetics*, 53(9), 575–590. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103690>
- Cairo, C., Surendran, N., Harris, K. M., Mazan-Mamczarz, K., Sakoda, Y., Diaz-Mendez, F., ... Pauza, C. D. (2015). V γ 2V δ 2 T-cell co-stimulation increases natural killer cell killing of monocyte-derived dendritic cells . *Immunology*, 144(3), 422–430. <https://doi.org/10.1111/imm.12386>
- Caraux, A., Kim, N., Bell, S. E., Zompi, S., Ranson, T., Lesjean-Pottier, S., ... Colucci, F. (2006). Phospholipase C- γ 2 is essential for NK cell cytotoxicity and innate immunity to malignant and virally infected cells. *Blood*, 107(3), 994–1002. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2428>

- Chen, Y., Mo, J., Jia, X., & He, Y. (2018). The B7 Family Member B7-H6: a New Bane of Tumor. *Pathology and Oncology Research*, 24(4), 717–721.
<https://doi.org/10.1007/s12253-017-0357-5>
- Chiesa, S., Tomasello, E., Vivier, E., & Vély, F. (2005). Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Molecular Immunology*, 42(4 SPEC. ISS.), 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.030>
- Cohnen, A., Chiang, S. C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., ... Watzl, C. (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*, 122(8), 1411–1418.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441832>
- Comans, M., Groot, R., Beemd, R., Neijens, J., Hop, W., Groeneveld, K., Hooijkaas, H. & Van Dongen, J. (1997) *Reference values for lymphocyte subpopulations*. *The Journal of Pediatrics*, 130(3)
- Giancchetti, E., Delfino, D. V., & Fierabracci, A. (2018). NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmunity Reviews*, 17(2), 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.11.018>
- Jones, T. P. W., Buckland, M., Breuer, J., & Lowe, D. M. (2019). Viral infection in primary antibody deficiency syndromes. *Reviews in Medical Virology*, 29(4), 1–13. <https://doi.org/10.1002/rmv.2049>
- Jost, S., & Altfeld, M. (2013). Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 163–194.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100001>
- Kane, K. L., Ashton, F. A., Schmitz, J. L., & Folds, J. D. (1996). Determination of natural killer cell function by flow cytometry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3(3), 295–300.
- Kawamoto, H., & Minato, N. (2004). Myeloid cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(8), 1374–1379.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.020>
- Kim, N., Saudemont, A., Webb, L., Camps, M., Ruckle, T., Hirsch, E., ... Colucci, F. (2007). The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood*, 110(9), 3202–3208.

- <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-075366>
- Krämer, B., Schulte, D., Körner, C., Zwank, C., Hartmann, A., Michalk, M., ... Nattermann, J. (2009). Regulation of NK cell trafficking by CD81. *European Journal of Immunology*, 39(12), 3447–3458.
<https://doi.org/10.1002/eji.200939234>
- Lohoff, M., Duncan, G. S., Ferrick, D., Mittrücker, H. W., Bischof, S., Pechtl, S., ... Mak, T. W. (2000). Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 192(3), 325–335.
<https://doi.org/10.1084/jem.192.3.325>
- López-Herrera, G. (2016). Lymphocytes B and primary immunodeficiencies. *Revista Alergia Mexico*, 63(1), 58–70. <https://doi.org/10.29262/ram.v63i1.139>
- Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarström, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C. M., Phadwal, K., ... Grimbacher, B. (2012). Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *American Journal of Human Genetics*, 90(6), 986–1001.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.015>
- Lougaris, V., Patrizi, O., Baronio, M., Tabellini, G., Tampella, G., Damiati, E., ... Plebani, A. (2017). NFKB1 regulates human NK cell maturation and effector functions. *Clinical Immunology*, 175, 99–108.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.11.012>
- Luevano, M., Madrigal, A., & Saudemont, A. (2012). Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: An update. *Frontiers in Immunology*, 3(OCT), 1–6.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00319>
- Mandal, A., & Viswanathan, C. (2015). Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy*, 8(2), 47–55.
<https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.11.006>
- Masilamani, M., Kassahn, D., Mikkat, S., Glocker, M. O., & Illges, H. (2003). B cell activation leads to shedding of complement receptor type II (CR2/CD21). *European Journal of Immunology*, 33(9), 2391–2397.

<https://doi.org/10.1002/eji.200323843>

- Meng, X., Krokhin, O., Cheng, K., Ens, W., & Wilkins, J. A. (2007). Characterization of IQGAP1-containing complexes in NK-like cells: Evidence for Rac 2 and RACK1 association during homotypic adhesion. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 744–750. <https://doi.org/10.1021/pr060382t>
- Montserrat Sanz, J., García Torrijos, C., Díaz Martín, D., & Prieto Martín, A. (2013). Linfocitos natural killer. *Medicine (Spain)*, 11(28), 1728–1736. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70549-3](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70549-3)
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Murphy, Kenneth P. (2012). *Janeway's immunobiology*. New York, New York : Garland Science
- O'Farrill-Romanillos, P. M., Herrera-Sánchez, D. A., Hernández-Fernández, C., & López-Rocha, E. G. (2017). Inmunodeficiencia común variable en adultos. *Revista Alergia México*, 64(4), 452. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i4.323>
- Orange, J. S. (2014). Natural Killer Cell Deficiency. *Stiehm's Immune Deficiencies*, 132(3), 765–774. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405546-9.00039-X>
- Owen, Judith A. (2014). *Kuby inmunología*. México : McGraw-Hill Interamericana.
- Park, M. A., Li, J. T., Hagan, J. B., Maddox, D. E., & Abraham, R. S. (2008). Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *The Lancet*, 372(9637), 489–502. doi:10.1016/s0140-6736(08)61199-x
- Park, M. Y., Sudan, R., Srivastava, N., Neelam, S., Youngs, C., Wang, J. W., ... Kerr, W. G. (2016). LRBA is Essential for Allogeneic Responses in Bone Marrow Transplantation. *Scientific Reports*, 6(November), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep36568>
- Paul, S., & Lal, G. (2017). The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
- Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology*

- and Cell Biology*, 89(2), 216–224. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.78>
- Picard, C., Bobby Gaspar, H., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J. L., Chatila, T., ... Sullivan, K. E. (2018). International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *Journal of Clinical Immunology*, 38(1), 96–128. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0464-9>
- Qi, X., Lei, M., Qin, L., Xie, M., Zhao, D., & Wang, J. (2016). Endogenous TWEAK is critical for regulating the function of mouse uterine natural killer cells in an immunological model of pregnancy loss. *Immunology*, 148(1), 70–82. <https://doi.org/10.1111/imm.12588>
- Quintin, J., Cheng, S. C., van der Meer, J. W. M., & Netea, M. G. (2014). Innate immune memory: Towards a better understanding of host defense mechanisms. *Current Opinion in Immunology*, 29(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.02.006>
- Serafini, N., Vosshenrich, C. A. J., & Di Santo, J. P. (2015). Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nature Reviews Immunology*, 15(7), 415–428. <https://doi.org/10.1038/nri3855>
- Smulski, C. R., & Eibel, H. (2018). BAFF and BAFF-receptor in B cell selection and survival. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02285>
- Taborda, N. A., Hernández, J. C., Montoya, C. J., & Rugeles, M. T. (2014). Natural killer cells and their role in the immune response during Human immunodeficiency virus type-1 infection. *Inmunologia*, 33(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2013.11.002>
- Van Dyke, K. (2007). Primary immunodeficiencies. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 125(2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60762-7>
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., ... Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174(5), 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- Vivier, E., & Ugolini, S. (2011). Natural killer cells: From basic research to

- treatments. *Frontiers in Immunology*, 2(JUN), 2–5.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00018>
- Wang, L. D., & Clark, M. R. (2003). B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology*, 110(4), 411–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2003.01756.x>
- Warnatz, K., Denz, A., Dräger, R., Braun, M., Groth, C., Wolff-Vorbeck, G., ... Peter, H. H. (2002). Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: A new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*, 99(5), 1544–1551. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.5.1544>
- Yong, P. F. K., Thaventhiran, J. E. D., & Grimbacher, B. (2011). “A Rose is a Rose is a Rose,” but CVID is Not CVID. Common Variable Immune Deficiency (CVID), What do we Know in 2011? In *Advances in Immunology* (Vol. 111). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00002-7>