

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**



**“EXPRESION DE LIGANDOS DEL RECEPTOR DE
ACTIVACIÓN NKG2D EN LÍNEAS CELULARES
DERIVADAS DE LEUCEMIAS”**

TESIS DE LICENCIATURA

PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. SUSANA DEL TORO ARREOLA

ASESORES
DR. LUÍS FELIPE JAVE SUÁREZ
DR. EDGARDO FLORES TORALES

PRESENTA:
MIRIAM IRENE JIMÉNEZ PÉREZ

LAS AGUJAS. ZAPOPAN, JALISCO. DICIEMBRE DE 2007



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1220/ C. C.BIOLOGÍA

C. Miriam Irene Jiménez Pérez

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: Tesis e Informes opción Tesis con el título: **“Expresión de ligandos del receptor de activación NKG2D en líneas celulares derivadas de leucemias”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **Dra. Susana del Toro Arreola** y como asesores a los/las **Dr. Luis Felipe Jave Suarez, Dra. Adriana del C. Aguilar Lemarroy, QFB Naela Alejandra Arreygue García y Dr. Edgardo Flores Torales**

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Aguas, Zapopan., 27 de septiembre del 2007.


DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA


M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

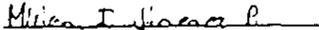
Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

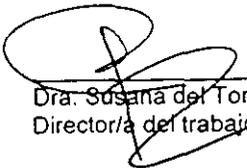
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad, TESIS E INFORMES opción TESIS con el título: "Expresión de ligandos del receptor de activación NKG2D en líneas celulares derivadas de leucemias" que realizó el/la pasante Miriam Irene Jiménez Pérez con número de código B02007908 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 4 de Diciembre de 2007

VoBo

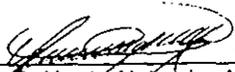


Miriam I. Jiménez Pérez


Dra. Susana del Toro Arreola
Directora del trabajo


Dr. Luis Felipe Jave Suárez
Asesor

Aguilar Lemarroy
Dra. Adriana del Carmen Aguilar Lemarroy
Asesora


Dr. Edgardo Flores Torales
Asesor


Q. F. B. Naela Alejandra Arreygue García
Asesora

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		4/Dic/07
Dra. Galina Petrovna Zaitseva		03/12/07
Dr. Jorge Peregrina Sandoval		3/Dic/07
Supl. Dr. Edgardo Flores Torales		4/Dic/07

TESIS/CUCBA

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 UCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad, **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**Expresión de ligandos del receptor de activación NKG2D en líneas celulares derivadas de leucemias**" que realizó el/la pasante **Miriam Irene Jiménez Pérez** con número de código **B02007908** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 4 de Diciembre de 2007

Miriam I. Jiménez P
 Miriam I. Jiménez Pérez

Luis P. Jave S.
 Dr. Luis Felipe Jave Suárez
 Asesor

Susana del Toro Arreola
 Dra. Susana del Toro Arreola
 Director/a del trabajo

Adriana del Carmen Aguilar Lemarroy
 Dra. Adriana del Carmen Aguilar Lemarroy
 Asesora

Edgardo Flores Torales
 Dr. Edgardo Flores Torales
 Asesor

Q. F. B. Naela Alejandra Arreygue García
 Q. F. B. Naela Alejandra Arreygue García
 Asesora

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobación	Fecha de aprobación
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		4 Dic/07
Dra. Galina Petrovna Zaitseva		05/12/07
Dr. Jorge Peregrina Sandoval		3/Dic/07
Supl. Dr. Edgardo Flores Torates		4/dic/07.

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	4
2.1. La respuesta inmune.....	4
2.2. Inmunidad innata	5
2.2.1. Células NK.....	9
2.2.1.1. Receptor NKG2D.....	11
2.2.1.1.1. Ligandos de NKG2D.....	12
2.2.1.1.2. Familia de ligandos ULBP/RAET1.....	15
2.3. La respuesta inmune adaptativa.....	18
3. Planteamiento del Problema.....	22
4. Objetivos.....	23
4.1. General.....	23
4.2. Metodológico.....	23
4.3. Particulares.....	24
5. Hipótesis.....	24
6. Metodología.....	24
6.1. Universo de Estudio.....	24
6.2. Análisis Estadístico.....	25
6.3. Metodología para desarrollar la etapa #1.....	25
6.3.1. Descongelamiento de las líneas celulares.....	25
6.3.2. Establecimiento de los cultivos celulares.....	26
6.4. Metodología para desarrollar la etapa #2.....	27

6.4.1. Extracción de Proteínas.....	27
6.4.2. Cuantificación de Proteínas.....	27
6.4.3. Electroforesis en Geles SDS- PAGE.....	28
6.4.4. Western Blot.....	28
7. Resultados.....	30
7.1. Resultados de la etapa #1.....	30
7.2. Resultados de la etapa #2.....	30
8. Discusión.....	37
9. Conclusiones.....	42
10. Referencias.....	43

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la vida en la tierra los organismos desde el más simple al más complejo, han tenido la necesidad de defenderse y al mismo tiempo de reconocer a los de su misma especie, para lo cual han desarrollado una gran variedad de mecanismos. La aparición de la inmunidad es el resultado de esa capacidad de los organismos de discriminar lo propio de lo no propio, así como de su capacidad de detectar señales de daño o estrés celular en los tejidos y que activarán los mecanismos inmunitarios conformados por: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (Beck, 1996; Litman; 1996, Matzinger, 2002).

La respuesta inmune innata es llevada a cabo por efectores solubles como son los péptidos antimicrobianos y el complemento, también por efectores celulares como macrófagos, células dendríticas, granulocitos y de manera importante las células *natural killer* (NK), las cuales son responsables de la eliminación de células infectadas por virus y bacterias intracelulares, así como de células tumorales. La regulación de las células NK está mediada por un balance entre receptores de inhibición (KIR y algunos miembros de la familia NKG2/CD94) y de activación, tales como NKp46, NKp44, NKp30 y NKG2D (Moretta, 2002).

El NKG2D (del inglés *Natural- Killer Group 2, member D*) es un receptor que detecta señales de estrés inducidas por un daño genotóxico; estas señales incluyen a las moléculas MICA/B y ULBP, las cuales son proteínas relacionadas al MHC clase I. De manera normal, éstas no se expresan en la superficie de tejidos sanos; sin embargo, se ha visto que estas moléculas se expresan durante el desarrollo tumoral ó en algunas infecciones por virus (Groh, 1996; Cosman, 2001).

Por su parte, La respuesta inmune adaptativa es mediada por dos tipos principales de células: linfocitos T y linfocitos B éstos últimos producen anticuerpos

que son mediadores de la respuesta inmune humoral y junto con otros efectores de la inmunidad innata eliminan al antígeno (Klein, 2005). Por otro lado, los linfocitos T son activados mediante sus receptores que reconocen péptidos antigénicos mostrados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*), provocando una respuesta citotóxica (mediada por linfocitos T citotóxicos), o bien, la secreción de citoquinas por linfocitos T cooperadores.

ANTECEDENTES

La respuesta inmune

Los organismos primigenios, como las amibas, poseen la capacidad de reconocer a otras amibas de su misma especie mediante el desarrollo de un receptor de superficie, el cual reconoce una proteína de membrana específica de su especie, lo que evita que éstas se fagociten entre sí (Ortutay, 2007).

El sistema inmune es una maquinaria muy compleja que ha evolucionado y se ha diversificado a lo largo del tiempo. Numerosos procesos son necesarios para aumentar la respuesta que protege al individuo de la invasión de organismos y moléculas extrañas. Para aumentar la respuesta del organismo, es necesario distinguir lo propio de lo extraño, como virus, bacterias, parásitos o injertos eliminándolos del organismo, pero ¿Cómo se lleva a cabo este reconocimiento? (Ortutay, 2007; Litman, 2007).

Al respecto, de acuerdo al enfoque de este trabajo veremos que la respuesta inmune se divide en dos ramas principales:

- 1) La respuesta inmune innata.
- 2) La respuesta inmune adaptativa

Inmunidad innata

La respuesta inmune innata está conformada por un grupo de células y factores solubles que responden de forma inmediata ante la invasión de un patógeno. Los primeros descubrimientos de la existencia de una respuesta inmune innata fueron realizados por el zoólogo Elie Metchnikoff en 1882. Él perforó la larva de una estrella de mar con una espina de rosal y observó un grupo de células que se aglomeraban alrededor de la espina como tratando de engullirla, por lo que las llamó macrófagos (Figura 1) (Beck, 1996).

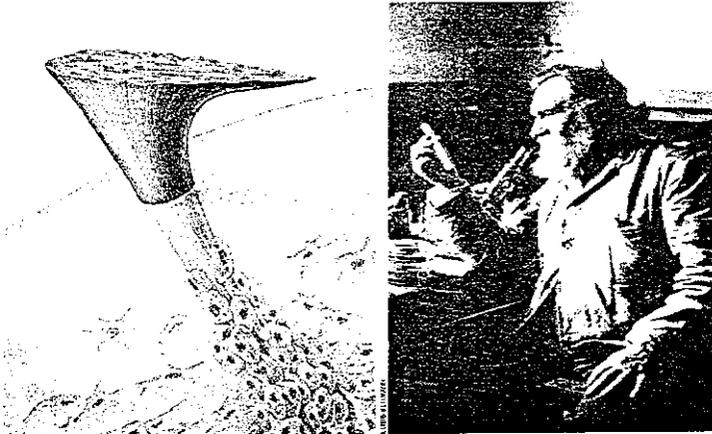


Figura 1. Derecha: Elie Metchnikoff. Izquierda: larva de estrella de mar con la espina clavada rodeada de macrófagos.

Parte importante de la respuesta innata son los mediadores solubles tales como el complemento, que es un conjunto de proteínas solubles y de unión a la membrana, que sirven de sensores y activadores inmunes. Está constituido por moléculas implicadas en la defensa frente a infecciones. Son más de 30 proteínas circulantes en sangre; estas proteínas trabajan en forma sucesiva, como una cascada, cada una con una función (Cuadro 1).

Función	Proteína del complemento
Opsonización	C4b, C3b
Eliminación de inmunocomplejos circulantes	C3b
Mediadores de inflamación	C3a, C4a, C5a
Quimiotaxis	C5a
Perforación de la membrana y citólisis	C5b, C6, C7, C8, C9, MAC

Cuadro 1. Acciones ejercidas por fragmentos del complemento

Para la activación del complemento existen tres vías: la vía clásica, vía de la lectina que une a la manosa y la vía alternativa. La vía clásica es activada por anticuerpos liberados en la respuesta inmune humoral ó por anticuerpos naturales. La vía de la lectina que une a la manosa es activada después del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como MBL, Ficolin H y Ficolin L. La vía alternativa es activada por polisacáridos como son los presentes en las membranas bacterianas. Independientemente de la vía de activación, todas culminan en la activación de C3; la cual lleva a la generación de dos anafilotoxinas proinflamatorias, C3a y C5a, y a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) (Figura 2) (Berrón- Pérez, 2003; Hills- Karp, 2007).

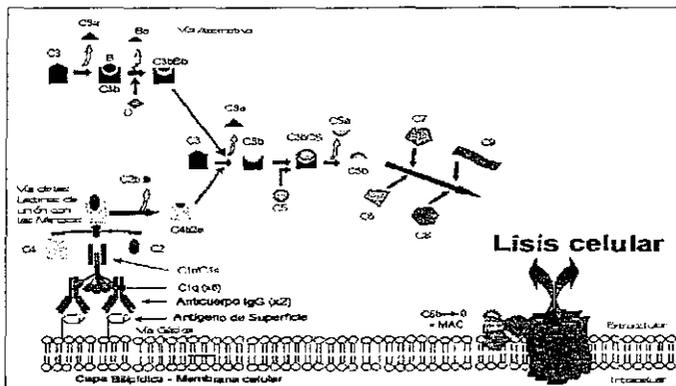


Figura 2. Vías de activación del complemento. El complemento es activado por tres vías: la vía clásica que es activada por anticuerpos. La vía alternativa que es activada por componentes de la pared celular bacteriana como LPS y finalmente la vía de unión a la manosa que es activada por patrones moleculares asociados a patógenos.

Así como existe el complemento, existen también los péptidos antimicrobianos (PAM) que juegan un papel muy importante en los procesos inflamatorios, en la liberación de citoquinas, en la inducción inmune, cicatrización y en la patogénesis de diversas enfermedades. En la actualidad se han descrito más de 700 PAM que son producidos por organismos de todo tipo. Los PAM son oligo o polipéptidos relativamente cortos (12 a 100 aminoácidos), son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas y están ampliamente distribuidos en el reino animal y vegetal; cada péptido antimicrobiano es codificado por un gen específico. Los PAM son almacenados en las células como propéptidos o péptidos maduros y se expresan en los tejidos que están adscritos a reacciones de defensa, como son los tejidos epiteliales. Algunos son producidos de manera constitutiva y otros sintetizados al contacto con productos microbianos o mediadores proinflamatorios. Los PAM se depositan en forma de barril, canal o tapete, formando un poro en la membrana celular (Figura 3).

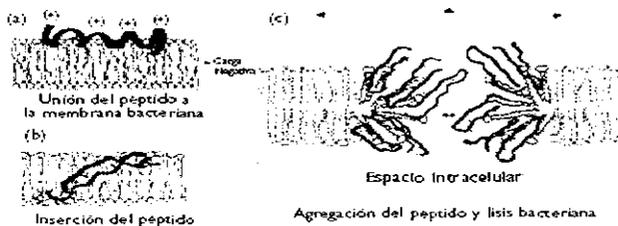


Figura 3. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. El PAM se une a la membrana bacteriana debido a su carga positiva, se inserta y forma un poro que lleva a la lisis celular.

Los PAM se clasifican según sus propiedades bioquímicas y químicas, principalmente debido a su estructura tridimensional: péptidos lineales helicoidales sin Cis (v. g. cecropinas), péptidos lineales sin Cis con alta proporción de ciertos aminoácidos (v. g. defensinas), péptidos antimicrobianos con un puente disulfuro (v. g.

ranalexina), péptidos con dos o más puentes disulfuro principalmente con lámina beta (v. g. defensinas alfa y beta, NK lisinas) y péptidos antimicrobianos derivados de polipéptidos grandes con otras funciones (v. g. polipéptido inhibitorio gástrico). Algunos PAM, al unirse a sus receptores, activan señales intracelulares que estimulan diferentes funciones; por ejemplo, la catelicidina LL-37 se une al receptor FPRL-, activa a la proteína G unida al receptor y produce una acción quimioatrayente de neutrófilos, monocitos y linfocitos e induce la liberación de IFN, IL-6 e IL-10 desde células T. (Escovar, 2004; Villarruel, 2004; Niyonsaba, 2007)

En cuanto a los mediadores celulares, se encuentran los neutrófilos, que son las primeras células que responden a un daño y no sólo fagocitan al patógeno, sino que también inducen la activación de otros componentes de la inmunidad adaptativa, como son células T cooperadoras y células T citotóxicas y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Otro tipo celular importante lo constituyen los macrófagos, los cuales fagocitan cuerpos extraños y migran al sitio de lesión y además tienen una función de células presentadoras de antígeno a linfocitos T cooperadores. También existen otras células de la inmunidad innata como son los granulocitos, los cuales fagocitan y lisan a los patógenos. Otro tipo de células que pertenecen a la respuesta inmune innata, son las células dendríticas, especializadas en el procesamiento y presentación de antígenos a células T, se localizan en la zona de lesión y migran a ganglios linfáticos para iniciar la respuesta inmune adaptativa. (Litman, 2005; Shortman, 2007)

Hay un tipo especial de linfocitos involucrados de forma muy importante en la respuesta inmune innata contra patógenos intracelulares como virus, así como contra células tumorales; estos linfocitos son conocidos como células asesinas naturales o *natural killer* (NK), pero ¿Cuál es la importancia de las células NK en la inmunidad?

Células NK

Son células linfocitarias que, sin una inmunización o preactivación, pueden reconocer y destruir células aberrantes y producir rápidamente factores solubles, tales como citoquinas proinflamatorias (IFN γ y TNF α), tienen efectos antivirales y antitumorales o actúan como reguladores del sistema inmune adaptativo (Colucci, 2003; Backström, 2004).

Las células NK son importantes efectores en la respuesta contra ciertos virus, parásitos y bacterias intracelulares. Las células NK representan aproximadamente 10-20% de los linfocitos sanguíneos que no expresan receptores típicos de células B o células T. Estas células se caracterizan por el fenotipo de superficie CD3-, CD56+ y CD16+. Están estrictamente restringidas a sangre periférica, medula ósea, bazo e hígado. Bajo condiciones normales no están presentes en ganglios linfáticos o linfa (Moretta, 2002). El desarrollo de las células NK ocurre primariamente en la medula ósea donde la IL-15, producida por células del estroma, es crítica para su desarrollo funcional. (Colucci, 2002; Backström, 2004).

En los últimos años se ha retomado el interés por entender la regulación de las células NK, particularmente de los receptores que discriminan entre las células normales y las células infectadas o tumorales. Estos receptores son llamados, de manera genérica, NKR, que son divididos en dos grupos principales: los receptores de inhibición y los de activación (Natarajan, 2002).

Las células NK reconocen a las moléculas MHC clase I vía NKR (Cuadro 2) de superficie de tipo inhibidor que dan señales que suprimen la función de las células NK. En consecuencia, las células NK lisan aquellas células que han perdido o que expresan un nivel insuficiente de moléculas de MHC-I, un evento frecuente en la

transformación tumoral o en algunas infecciones por virus. Se ha observado que la activación de las células NK está correlacionada con la pérdida de la expresión del MHC-I en células tumorales, las cuales al perder la expresión de MHC-I son más susceptibles a la lisis mediada por células NK; a este fenómeno se le denominó "teoría del *missing self*", refiriéndose a que la célula propia pierde la expresión de MHC-I y por decirlo de alguna forma, pierde su identidad (Ljungger, 1990; Moretta, 2002).

Receptor	Especies	Clase	Ligando
<i>Receptores de Adhesión</i>			
CD2	H, M	IgSF	CD48, CD58 (LFA-3)
CD11a (LFA-1)	H, M	IgSF	CD54, CD102
CD11b (Mac- 1)	H, M	IgSF	CD54
CD44	H, M	IgSF	Ácido hialurónico
Lag 3	H	IgSF	HLA clase II
<i>Receptores de activación</i>			
CD16	H, M	IgSF	Complejos inmunes
CD25	H	CytoR	IL-12
CD27	H, M	TNFRSF	CD70
CD28	H, M	IgSF	CD80, CD86
CD94/NKG2C, E	H, M	C-lectina	HLA- E (H), Qa- 1b (M)
CD122	H, M	CytoR	IL-2, IL-15
CD161	H, M	C- lectina	Clr-g (NKR-P1F)
CD226	H	IgSF	CD112, CD155
CD244 (2B4)	H, M	SLAM	CD48
NKG2D	H, M	C-lectina	MICA, B, ULBP, (H), Rae1s (H, M), H60 (M)
KIR2S, KIR3S	H	IgSF	HLA clase I
Ly49D, H, P	M	C-lectina	H-2 Clase I, MCMV m157 (Ly49H)
NCR (NKp30, 44, 46)	H, M (NKp46)	IgSF	Hemaglutininas virales?
ILT- 1	H	IgSF	?
IFN- α/β R	H, M	CytoR	Interferones tipo I
<i>Receptores de inhibición</i>			
CD85	H	IgSF	HLA- A, - B, -G
CD94/NKG2A	H, M	C-lectina	HLA- E (H), Qa-1b (M)
CD161	M	C-lectina	Clr- b (NKR- PID)
CD244 (2B4)	H, M	SLAM	CD48
KIR2DL, KIR3DL	H	IgSF	HLA clase I
Ly49 A- C, E-G, I-O	M	C- lectina	H- 2 clase I
TGF- β R	H, M	CytoR	Familia TGF- β

Cuadro 2. Receptores de las células Natural Killer.

Existe un grupo de receptores inhibidores denominados KIR (por sus siglas en inglés *Killer immunoglobulin like receptors*), que son expresados tanto en células NK como en células T y son los principales NKR de inhibición. La interacción entre los KIR y los diferentes alotipos del MHC clase I son determinantes en la comunicación

que se establece entre las células NK y su célula blanco (Natarajan, 2002; Bashirova, 2006).

Otro tipo de NKR con función inhibidora descrito es el CD94/NKG2 que es expresado tanto en humanos como en ratones y que reconoce moléculas del MHC-I no clásico, como son las moléculas HLA- E; este reconocimiento está dado por las isoformas NKG2A y NKG2B (Backström, 2004).

Por otro lado, existen otros receptores de activación llamados “receptores de citotoxicidad natural” o NCR (por sus siglas en inglés: *natural cytotoxic receptors*), entre los que se encuentran NKp30, NKp46 y NKp44. Los dos primeros son expresados en células NK activadas o en estado de reposo, mientras que NKp44 sólo se ha identificado en células activadas. En cuanto a sus ligandos aun no se conocen con precisión, aunque se han identificado algunas hemaglutininas de origen viral (Pessino, 1998; Vitale, 1998; Pende, 1999; Biassoni, 2003).

Otros receptores importantes de activación son los que reconocen moléculas del MHC, como son CD94/NKG2 en sus isoformas C y E que reconocen moléculas no clásicas del MHC como son HLA- E y HLA- H. Además de los receptores de activación mencionados con anterioridad, existe también otro receptor denominado NKG2D, el cual participa en la activación de las células NK, pero ¿Cuál es la importancia de este receptor?

Receptor NKG2D

NKG2D, como ya se mencionó es un receptor de activación de células NK. Pertenece a la familia de receptores de tipo lectina y está codificado en el cromosoma 12 en humanos. NKG2D está altamente conservado en primates y roedores y en estudios con cristalografía han corroborado que el receptor NKG2D tiene una estructura

homodimérica, que al unirse a las moléculas adaptadoras DAP10 (en ratón y humano) y DAP12 (en ratón), forma una estructura de hexámero (Figura 4) (Li, 2001; Garrity, 2005).

El receptor NKG2D interactúa con moléculas relacionadas al MHC-I, denominadas genéricamente MIC (por sus siglas en inglés *MHC class I chain-related gene*). Estas moléculas fueron descritas casualmente mientras se buscaban alelos nuevos en la región del MHC que pudieran estar involucrados en procesos autoinmunes (Groh, 1996; Cosman, 2001; Suemizu, 2002; Gonzáles, 2006).

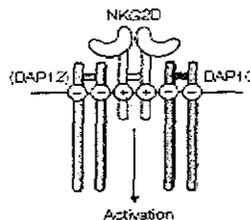


Figura 4. Estructura de NKG2D. El receptor NKG2D está formado por homodímeros que interactúan con las moléculas estimuladoras DAP10 en humano y ratón y DAP12 en ratón, formando un hexámero.

Ligandos de NKG2D

El MHC son una serie de genes localizados en el cromosoma 6 en la región p21.3. Está compuesto por tres regiones: MHC clase III, MHC clase II y MHC clase I. La región del MHC clase III es llamada también región inflamatoria y no tiene función presentadora de antígeno, aunque producen proteínas del complemento, de choque térmico-70 y el factor de necrosis tumoral α , involucrados en procesos inflamatorios. Las moléculas del MHC clase II son expresadas por células presentadoras de antígeno especializadas (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) y posee una función presentadora de antígeno a células T CD4+.

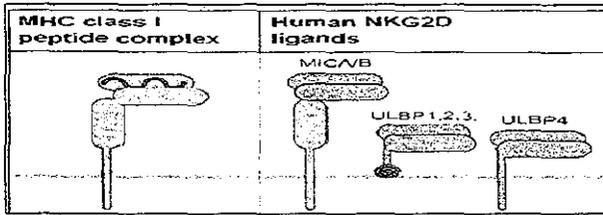


Figura 6. Estructura de los Ligandos del receptor NKG2D en comparación con el MHC. MICA/B se conforman de 3 dominios estructurales ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), pero, a diferencia del MHC, no está asociada a β -2 microglobulina. ULBP/RAET1 poseen 2 dominios estructurales ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) y no están asociados a β -2 microglobulina.

La expresión y distribución tisular de las moléculas MIC están normalmente restringidas a epitelio intestinal, con una limitada evidencia de expresión en superficie (Groh, 1996). Sin embargo, se ha visto que MICA/B son expresadas en diversos tumores tales como carcinoma de colon, cáncer de pulmón, mama, próstata y melanomas. (Bauer, 1999; Groh, 1999; Girardi, 2001)

En estudios hechos con líneas celulares derivadas de tumores, como son leucemias, linfomas, gliomas y cáncer cervico-uterino, se ha observado que la expresión de MICA/B en superficie y de forma soluble es heterogénea dependiendo de la línea estudiada, así como del fenotipo de la misma (Pende, 2002). También se ha observado que la forma soluble de esta proteína provoca la interiorización del receptor NKG2D, lo cual puede ser considerado como un mecanismo adicional de evasión tumoral (Groh, 2002).

Con respecto a leucemias, los estudios realizados a la fecha, han demostrado la presencia de MICA/B, ya sea de forma soluble, expresada en superficie celular, así como a nivel de RNA mensajero. Estos estudios se realizaron en pacientes con linfomas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloblástica crónica, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfoblástica crónica (Salih, 2003; Skov, 2005).

Recientemente se ha demostrado que el detenimiento de la maduración de los blastos en leucemia mieloide crónica, está asociado con la poca e inadecuada expresión de los ligandos de NKG2D, por lo que se compromete la actividad antitumoral de las células NK, dando una nueva forma de escape a las células malignas (Nowbakht, 2005). Así mismo, se ha reportado que existe un control directo de la expresión de MICA por el oncogen BCR/ABL en leucemia mieloide crónica que indica que hay una regulación post- transcripcional de la expresión de MICA (Boissel, 2006). Por otro lado, se ha mostrado que las interacciones entre NKG2D y sus ligandos juegan un papel importante en los efectos citolíticos de las células NK contra los blastos de leucemia mieloide crónica (Sconocchia, 2005).

Además de las moléculas MICA/B también se ha descrito otra familia de ligandos del receptor NKG2D, la cual ha sido denominada ULBP/RAET1.

Familia de ligandos ULBP/RAET1

ULBP/RAET1, al igual que MICA/MICB, se localizan en el cromosoma 6, pero en la región q24.2- q25.3 (Figura 7) y también están relacionadas al MHC. Similar a MICA/B, ULBP/RAET1 se expresan en la superficie de células infectadas con algún tipo de virus, bacterias intracelulares o en células transformadas como en el caso de cáncer. Estas moléculas fueron identificadas por su capacidad de unirse a la proteína UL16 del citomegalovirus humano. Precisamente, su nombre deriva de las siglas en inglés *UL16 binding protein* (ULBP) ó *Retinoic Acid Early Transcript 1* (RAET1) (Cosman, 2001; Cornejo- García, 2003). La familia de genes ULBP/RAET1 consta de diez miembros, de los cuales 6 codifican para proteínas funcionales y los cuatro restantes son pseudogenes (González, 2006).

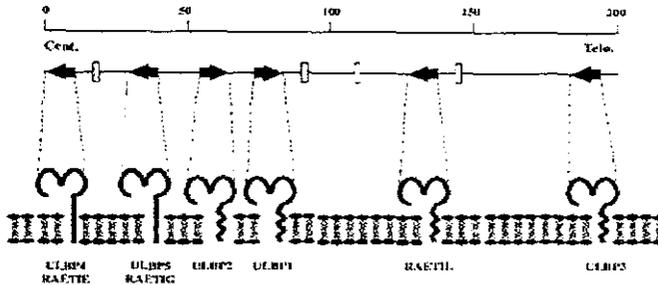


Figura 7. Localización y estructura de los genes de la familia ULBP/RAET1. Los genes de la familia ULBP/RAET1 se localizan en el brazo largo del cromosoma 6 (humanos) en región más cercana al telómero. Esta formado por 6 genes, todos ellos codifican para proteínas funcionales.

El porcentaje de homología entre los miembros de esta familia es de 50- 60% y con respecto a MICA/B, es de un 25%. ULBP 1-3 y RAET1L (ULBP6) están ancladas a la membrana celular por un residuo de glicosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que ULBP4 (RAET1E) y RAET1G (ULBP5) poseen una región transmembranal y dominios citoplasmáticos como las moléculas MIC. (Wei, et al. 2004; Wiemann, et al. 2005)

La familia ULBP/RAET1 es expresada en muchas líneas tumorales, tanto de origen epitelial como de origen hematopoyético; también se expresan en infecciones virales, tales como la infección por citomegalovirus humano (CMVH). El análisis del RNA mensajero revela la expresión de ULBP/RAET1 en diversos tejidos como corazón, hígado, pulmón y cerebro, entre otros (Cosman, et al. 2001; Pende, et al. 2002; Salih, et al. 2003).

Estudios recientes muestran que existen formas solubles de ULBP/RAET1 que son capaces de estimular la producción de citocinas como $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ y $\text{MIP-1}\beta$ y de incrementar la respuesta citotóxica de células NK sobre células blanco. En contraste, otros estudios recientes muestran que la producción de la forma soluble de ULBP/RAET1 en líneas celulares derivadas de tumores gástricos suprime la actividad

de las células NK reduciendo la expresión del receptor NKG2D al igual que como ha sido demostrado con formas solubles de MICA y MICB (Wei, et al. 2004; Wiemann, et al. 2005, Song, 2006). Sin embargo, formas solubles ULBP/RAET1 no han sido todavía estudiadas en pacientes con cáncer.

Se ha descubierto que existe una expresión diferencial de los ligandos del receptor NKG2D, ya que no todos son expresados al mismo tiempo, ni por las mismas células; por ejemplo, ULBP 1-3 y RAET1G se expresan por inducción del citomegalovirus humano, mientras que ULBP4/RAET1E no son inducidas por infección con citomegalovirus humano. Los factores de transcripción involucrados en la regulación de ULBP/RAET1 incluyen los de respuesta a choque térmico y de inducción por ácido retinoico (Eagle, et al. 2006; López- soto, et al. 2006).

Debido a que existe una variedad relativamente abundante de ligandos del receptor NKG2D, los virus han desarrollado formas de evadir a la respuesta mediada por células NK. El citomegalovirus humano desarrolló una estrategia peculiar de evasión; éste produce una proteína llamada UL16, capaz de unirse específicamente a ciertos ligandos del receptor NKG2D como son ULBP1, ULBP2 y MICB, esto se debe a que UL16 reconoce una secuencia de aminoácidos localizada en el dominio $\alpha 2$ de ULBP1 y MICB que no es compartida por MICA y ULBP3 (Figura 8) (Rölle, et al. 2003; Wiemann, et al. 2005; Spreu, et al. 2006).

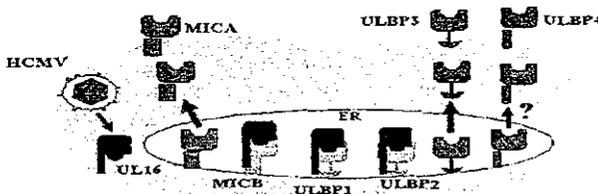


Figura 8. Mecanismo de evasión viral del HCMV. La proteína vírica UL16 se une a las proteínas MICB, ULBP1 y ULBP2 evitando que estas sean transportadas a la superficie celular.

Últimamente, se han realizado diversas investigaciones acerca de la expresión de ULBP/RAET1 en leucemias. Los resultados que se han observado muestran que la expresión en superficie de ULBP/RAET1 en blastos leucémicos está restringida a sólo algunos casos clínicos y en algunas líneas celulares derivadas de leucemias, aunque se ha observado la presencia de RNA mensajero en líneas celulares derivadas de leucemias, controles sanos y pacientes con leucemias de diferentes tipos. Estos estudios también mostraron que el RNAm de los pacientes con leucemias está elevado en comparación con los controles sanos (Pende, et al. 2002; Salih, et al. 2003).

En estudios recientes, se ha relacionado la detención de la maduración de los blastos leucémicos con la falta de expresión de ligandos de NKG2D. En leucemia mieloblástica aguda (AML), se ha visto que la expresión de ligandos de NKG2D aumenta en los blastos de pacientes que son tratados con IFN γ y factor de crecimiento mieloblástico (Nowbakht, et al. 2005).

No sólo en la respuesta inmune innata se puede apreciar la importancia del mecanismo efector NKG2D/ ligandos del NKG2D como respuesta ante una infección o transformación celular, sino que también en la otra rama tan importante del sistema inmune que es la inmunidad adaptativa tiene un rol como receptor de activación en células $T\gamma\delta$ y como coestimulador en células $CD8^+$ (Groh, 1998) por lo anterior, es importante hablar de la inmunidad adaptativa y conocer las funciones de las células que la conforman.

La respuesta inmune adaptativa

La necesidad de autodefenderse y sobrevivir llevó al inevitable refinamiento evolutivo del sistema inmune, llegando así a la respuesta inmune adaptativa. Este tipo

de respuesta aparece hace aproximadamente 500 millones de años en organismos vertebrados como los elasmobranquios (tiburones o rayas), por lo que es fácil suponer el porqué de su éxito evolutivo (Litman, 1996).

La respuesta inmune adaptativa con sus dos brazos importantes incluye a la respuesta humoral y la respuesta celular. Las células encargadas de la inmunidad humoral son llamadas linfocitos B, los cuales producen anticuerpos (inmunoglobulinas) que se unen a antígenos foráneos de manera específica; esta unión permite que otras entidades lleven a cabo la eliminación del antígeno, el cual puede ser un virus, una bacteria o bien células transformadas como en el caso de cáncer. La diversidad de anticuerpos necesarios para reconocer un casi ilimitado universo de patógenos potenciales es creado por un proceso de rearrreglos específico del DNA denominado recombinación V(D)J. La recombinación V(D)J está dada por unos genes localizados en el cromosoma 14 humano. Están distribuidos en tres grupos: genes de variabilidad (V), de los cuales son 50; de diversidad (D), que le corresponden 30 y los de unión (J), que son 6. Esta recombinación reconoce secuencias de DNA llamadas señales de secuencia de recombinación (RSS por sus siglas en inglés *Recombination Signal Sequences*) adyacentes a cada segmento de genes. Cada RSS consiste de heptámeros conservados y dominios nonaméricos separados por 12 -23 nucleótidos (Figura 9). La recombinasa está formada por dos proteínas, RAG1 y RAG2, las cuales en conjunto con las proteínas de flexión de DNA no específicas, HGM1 ó HGM2, reorganizan los RSS y catalizan sitios específicos de hendidura de DNA. Para la hendidura se requiere tanto de RAG1 como de RAG2. La coexpresión de estas proteínas está limitada por el desarrollo de los linfocitos (Beck, 1996; Roth, 2000; Sadofsky, 2001).

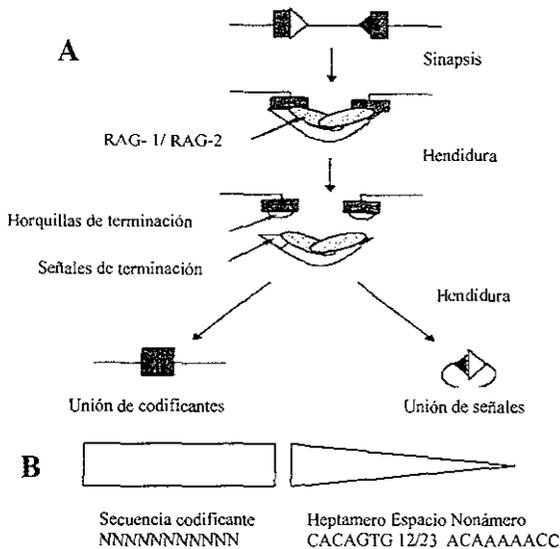


Figura 9. Sistema de recombinación V(D)J. (A). Las proteínas RAG se unen a los RSS (triángulos) y los unen a un complejo sináptico. La hendidura sobreviene, generando un par de franjas señales de terminación y un par de horquillas de terminación. El ensamblaje de esas terminales genera la unión de las señales y la unión de los codificantes. Las cajas representan los codificantes V, D o J. (B). Composición de la secuencia RSS.

Por su parte, la respuesta inmune celular está mediada por los linfocitos T; a pesar que estas células no producen anticuerpos, sí utilizan unas moléculas en su superficie, llamadas receptores de células T (TCR) (Figura 10), que reconocen péptidos antigénicos que son presentados por las moléculas del MHC; una vez que las células T reconozcan al antígeno, se activarán y llevarán a cabo sus mecanismos efectores. El proceso de generación y diversificación de células T es llevado a cabo en el timo. De los sitios primarios de la hematopoyesis (saco embrionario durante la etapa embrional, el hígado fetal en el desarrollo fetal y médula ósea en la infancia), los progenitores de células T migran al timo y proliferan intensamente en la corteza. Después, hacen contacto con el epitelio tímico y las células nodrizas promueven la síntesis de

interleuquina 7 y activa ambos genes de recombinación (RAG1 y RAG2). La generación de la diversidad de células T ocurre a través de la recombinación aleatoria de los segmentos de genes que codifican para la parte variable del TCR en las cadenas α y β . La recombinación de los TCR en las células precursoras de linfocitos T, constituye un evento crucial porque, entre la gran cantidad de posibles combinaciones, muchos de ellos son capaces de reconocer antígenos propios presentados por las moléculas del MHC en las células del timo. Esta selección negativa representa la eliminación masiva de clones de células T con TCR autorreactivos (Sadofsky, 2001; Geenen, 2003; Allam, 2006).

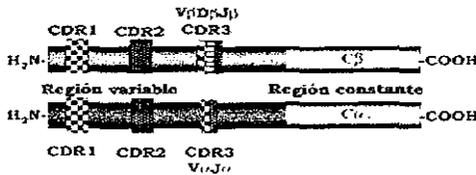


Figura 10. Estructura y función del receptor del linfocito T (TCR). A. Esquema de la estructura del TCR: es una proteína heterodimérica y se compone de una cadena α y una β . Cada cadena tiene una región constante (transmembranal) y una variable.

Existen dos tipos principales de células T, las células T citotóxicas $CD8^+$ (T_c) y las células T cooperadoras $CD4^+$ (T_h). Las primeras, son activadas mediante su receptor TCR y en poblaciones que carecen del coestimulador CD28, el receptor NKG2D realiza esta función, potenciando así la respuesta celular citotóxica (si hay presencia de ligandos del NKG2D) (Figura 11), conducen a la lisis celular de sus células blanco. Por su parte, las células T cooperadoras liberan citoquinas que estimulan la producción de anticuerpos en los linfocitos B o la activación de macrófagos (Klein, 2005; Litman 2007). Adquirir inmunidad también deja una marca (memoria inmunológica), lo cual acelera las subsecuentes respuestas al mismo antígeno.

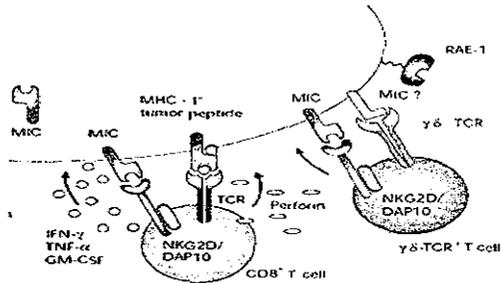


Figura 11. Expresión del receptor NKG2D en células de la inmunidad adaptativa. El receptor NKG2D tiene funciones coestimuladoras en algunas poblaciones de células $\alpha\beta$ T CD8⁺ y funciones de activación en células $\delta\gamma$ T.

En virtud de que el receptor NKG2D juega un rol importante, tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa, como mecanismo de activación para la eliminación de células transformadas por virus o cáncer, el estudio de los ligandos del receptor NKG2D en leucemias se ha restringido a tan sólo algunos tipos de leucemias y no se ha profundizado en los diferentes patrones de expresión que pudieran estar involucrados entre sí (por las mismas diferencias entre los tipos de leucemia), es importante tomar un modelo de estudio primario como lo son diferentes líneas celulares derivadas de leucemias, tanto linfocíticas como mieloblásticas, para poder establecer si existe un patrón diferencial de la expresión de los distintos ligandos de NKG2D entre estas variantes de leucemias, en cuanto a detección de los ligandos a un nivel de proteína total. Además, es importante conocer si predomina un tipo de ligando sobre otro y si éste se encuentra en un tipo específico de leucemia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tumores malignos son la tercera causa de muerte en México, las leucemias representan cerca del 10% de los tumores tanto en hombres como en mujeres. Las células NK juegan un papel relevante en el reconocimiento temprano de las células

malignas; estas células detectan y lisan a las células tumorales sin una previa sensibilización. La actividad de estas células está regida por un balance entre receptores de inhibición y de activación; entre estos últimos se encuentra el receptor NKG2D, el cual detecta ligandos de estrés como MICA/B y ULBP/RAET1.

Estudios recientes han revelado la expresión de MICA/B ó ULBP/RAET1 en células leucémicas tanto de pacientes como en líneas celulares. Sin embargo, no existe un estudio que analice de manera sistemática la expresión en conjunto de todos los ligandos de NKG2D, como MICA/B y ULBP/RAET1 en diferentes líneas celulares derivadas de leucemia.

Conocer que ligandos del receptor NKG2D son expresados por diferentes líneas de leucemias proporcionará bases para entender de forma indirecta, que mecanismos pueden estar involucrados en el reconocimiento de las células leucémicas por las células NK durante la fase inicial de reconocimiento y eliminación tumoral.

OBJETIVOS

General

- Determinar la expresión de los ligandos del receptor NKG2D en diferentes líneas celulares derivadas de leucemias.

Metodológico

- Establecer los cultivos celulares, en diferentes líneas derivadas de leucemias (K-562, HL-60, JurKaT y CEM).

Particulares

1. Determinar la expresión de la familia MIC (MICA/B) a nivel de proteína total en lisados celulares de las diferentes líneas derivadas de leucemias (K-562, HL-60, JurKaT y CEM).
2. Determinar la expresión de la familia ULBP/RAET1 (ULBP1, ULBP2 y ULBP3) a nivel de proteína total en lisados celulares de las diferentes líneas derivadas de leucemias (K-562, HL-60, JurKaT y CEM).

HIPÓTESIS

Las líneas celulares leucémicas muestran una expresión predominante de los miembros de la familia ULBP/RAET1 con respecto a los miembros de la familia MIC

METODOLOGÍA

En este estudio descriptivo se determinó la expresión de los ligandos del receptor NKG2D (MICA/B y ULBP1-3) en diferentes líneas celulares, todas ellas derivadas de leucemias. Para esto, se establecieron cultivos con las líneas celulares K-562, HL-60, JurKaT y CEM (las características de cada una de ellas se muestran en el Cuadro 3) (etapa 1). Una vez establecidos los cultivos, se procedió a realizar la extracción de proteínas de las diferentes líneas celulares para realizar Western blot, previa separación de las proteínas por electroforesis en geles SDS- PAGE (etapa 2).

Universo de estudio

Diferentes líneas celulares derivadas de leucemias como son: K-562, HL-60, JurKaT y CEM.

Línea celular	Tipo celular	Enfermedad	Antígenos expresado	Condiciones de cultivo	Origen	Comentarios generales
JurKaT	Linfocito T	Leucemia aguda de células T	CD3+	RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 37°C, 95% de oxígeno y 5% de CO ₂	Paciente masculino de 14 años	Produce grandes cantidades de IL-2 a la estimulación con algunos ésteres de forbol y lectinas. Numero cromosomal diploide
HL-60	Promieloblasto	Leucemia aguda promielocítica		Medio Dulbecco; con 20% de suero fetal bovino, 37°C, 95% de oxígeno y 5% de CO ₂	Paciente femenina (caucásica) de 36 años	Diferenciación estimulada por butirato, hipoxantina, forbol, ácido mirístico, dimetilsulfóxido, actinomicina D y ácido retinoico. Exhiben actividad fagocítica y responden a estímulo quimiotáctico. Línea positiva al oncogen myc.
K-562	Eritroblasto	Leucemia mielógena crónica	CD7+ (25%)	Medio Dulbecco con 4 mM L-glutamina, con 10% de suero fetal, 37°C 95% de oxígeno y 5% de CO ₂	Paciente femenina de 53 años	Altamente sensible a lisis mediada por células NK. Puede ser diferenciada a progenitores reconocibles de series eritrocíticas, granulocíticas y monocíticas. Número cromosomal triploide
CEM	Linfoblasto T	Leucemia linfoblástica aguda	CD3+, CD5+, CD4+, CD7+	Medio RPMI 1640 con 2 mM L-glutamina; suero fetal bovino 10% 37°C	Paciente femenina (caucásica) de 4 años	Su numero de cromosomas modal es 47, pero se ha visto cariotipos con pérdidas o ganancias de cromosomas en un rango de 41 a 95

Cuadro 3. Características de las líneas tumorales usadas en el presente estudio

Análisis estadístico

Debido a que esta investigación fue de carácter descriptivo, no se procedió a realizar análisis estadístico.

METODOLOGÍA PARA DESARROLLAR LA ETAPA #1

Descongelamiento de las líneas celulares

Se utilizaron diferentes líneas celulares derivadas de leucemias todas ellas de uso comercial proporcionadas por ATCC (del ingles: *American Type Culture Collection*) al

banco de células ubicado en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, tanto mieloblásticas como linfocíticas (descritas en el Cuadro 3). Las diferentes líneas se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Al momento de realizar el cultivo, éstas se descongelaron de forma inmediata. Después de ser extraídas del tanque de nitrógeno, se llevaron al baño María a 37°C para su completo descongelamiento. Una vez descongeladas, las células se pasaron directamente a las botellas de cultivo de 45mm². Para eliminar el exceso de dimetil- sulfóxido (DMSO), las células fueron lavadas con medio de cultivo RPMI 1640 centrifugando a 2000 r. p. m. durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se agregaron 15 mL de medio RPMI 1640 enriquecido con suero fetal bovino al 10% y penicilina (100 unidades/mL)-estreptomicina (100 µg/mL). Una vez que se confirmó una viabilidad superior del 90%, se procedió a cultivar las diferentes líneas celulares usadas en este estudio.

Establecimiento de los cultivos celulares

El cultivo se estableció en frascos de 45mm² agregando 15 mL de medio RPMI 1640 enriquecido con suero fetal bovino al 10% y penicilina (100 unidades/mL) + estreptomicina (100 µg/mL). Las diferentes líneas celulares se colocaron en los frascos de cultivo y después se incubaron a 37° C en una atmósfera con 90% de humedad y una concentración de CO₂ al 5%. Pasadas 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo y los frascos se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo. Se estuvo observando el crecimiento de las líneas celulares hasta obtener una confluencia cercana al 100%.

METODOLOGÍA PARA DESARROLLAR LA ETAPA #2

Extracción de proteínas

Una vez obtenidas las células, se centrifugaron a 1000 r. p. m. por 10 minutos. Después, se descartó el sobrenadante y se agregó 10 mL de PBS y nuevamente se centrifugó a 1000 r. p. m. por 10 minutos. Ya centrifugado, se eliminó todo el PBS y se agregó 600 μ L de buffer RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay) con inhibidores de proteasas. La suspensión se sonicó a 15 pulsos en intervalos de 3 segundos, con una amplitud de 50%. Una vez obtenido el extracto, se incubó 40 minutos en hielo; finalizada la incubación, se centrifugó a 13,000 r. p. m. por diez minutos. Terminada la centrifugación, se tomó el sobrenadante y se hicieron alícuotas de 50 μ L en tubos eppendorf y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el kit D_C Protein Assay de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Para esto, se colocó 5 μ L de la proteína estándar en una placa de 96 pozos; después se colocó 5 μ L de proteína problema. Se agregó 25 μ L de la solución A' (500 μ L de solución A más 10 μ L de solución S) y finalmente se agregó 200 μ L de solución B y se llevó al lector de microplacas Synergy™ HT Multi-Mode (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA) para su lectura a 750nm. Una vez obtenida la lectura, se realizaron los cálculos para la curva estándar y las muestras. Posteriormente, se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de proteína/ μ L.

Electroforesis en geles SDS- PAGE

Previo al corrimiento electroforético, se limpiaron los cristales en los cuales se prepara el gel de poliacrilamida (10 x 10 cm). Primero se preparó el gel separador (resolving gel) al 12.5% de acrilamida como se muestra en el Cuadro 4 y se dejó polimerizar.

Gel de separación al 12.5%
Acrilamida/bisacrilamida 40%
Agua destilada
Tris HCl pH 8.8 1.5 M
SDS (Dodecil sulfato de Sodio) al 10%
APS (Persulfato de Amonio) al 10%
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametilendiamina)

Cuadro 4. Preparación del gel separador

Después, se preparó el gel concentrador (stacking gel) al 4.5%, como se muestra en el Cuadro 5 y se dejó polimerizar sobre el gel separador (ya polimerizado). Enseguida, se procedió a montarlo en la cámara de electroforesis vertical (Owl Separation System Inc, Portsmouth, NH USA) y se agregó el buffer de corrimiento 1X (Tris, glicina y SDS al 10%). Se cargó 40µg de proteína en cada carril. El corrimiento se realizó a 85 V constantes por 2 horas.

Gel concentrador al 4.5%
Acrilamida/ bisacrilamida 40%
Agua destilada
Tris HCl pH 6.8 0.5 M
SDS (Dodecil sulfato de Sodio) al 10%
APS (Persulfato de Amonio) al 10%
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametilnediamina)

Cuadro 5. Preparación del gel concentrador

Western Blot

Terminado el corrimiento, las proteínas contenidas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) humedecida con metanol. El primer paso fue colocar papel filtro humedecido en Towbin Buffer 1X (Tris base,

glicina, agua, metanol y SDS 10%) sobre la cámara de transferencia semi-húmeda (Biometra, Goettingen, Alemania); enseguida, se colocó la membrana de PVDF e inmediatamente después el gel y sobre éste, se colocó nuevamente más papel filtro humedecido en buffer. La transferencia se realizó durante 2 horas a 0.8 mA/cm^2 . Una vez terminada la transferencia, se bloqueó la membrana (como se indica en el Cuadro 6) por 1 hora. Pasado el tiempo de bloqueo, se procedió a incubar con el anticuerpo primario correspondiente como se muestra también en el Cuadro 6

Bloqueo	Anticuerpo primario (concentración)	Anticuerpo secundario (concentración)
Leche descremada 5%	ULBP1 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:400) en leche descremada 1%	Donkey anti- goat (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:4000) en leche descremada 1%
Leche descremada 5%	ULBP2 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:400) en leche descremada 1%	Donkey anti- goat (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:4000) en leche descremada 1%
Leche descremada 5%	ULBP3 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:400) en leche descremada 1%	Donkey anti- goat (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:4000) en leche descremada 1%
Blocking reagent 1%	MICA/B (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:100) en Blocking reagent 0.5%	Goat anti- Mouse (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) (1:4000) Blocking reagent 1%

Cuadro 6. Distribución y preparación de las diluciones de los anticuerpos.

Se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se eliminó el exceso de anticuerpo lavando la membrana con Tween 20-PBS 1X durante 5 minutos (3 veces). Se agregó el anticuerpo secundario según se muestra en el Cuadro 6 y se incubó una hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario se removió lavando la membrana 5 veces con Tween 20- PBS 1X al 0.5% por 5 minutos. Una vez terminado los lavados, inmediatamente se procedió a agregar la solución del kit de revelado Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA) agregando volúmenes iguales de solución A (1.5 mL) y solución B (1.5 mL) sobre la membrana y se expuso por 1 minuto. Pasado este tiempo, se eliminó el exceso de luminol y se procedió a colocar la membrana en un cassette de revelado que se llevó al cuarto de rayos X, donde se expuso una placa

fotográfica sobre la membrana durante un minuto aproximadamente y se procedió a revelar.

RESULTADOS

Resultados de la etapa #1

Después del descongelamiento, las células se encontraban un poco dañadas, por lo que el establecimiento de los cultivos tardó aproximadamente dos semanas, en lo que se alcanzó la confluencia deseada (90%). El crecimiento de cada línea promedio en un tiempo de 24 horas se muestra en el Cuadro 7

Línea celular	K-562	HL-60	JurKaT	CEM
Crecimiento a las 24 horas	2.17×10^6	1.43×10^6	2.035×10^6	2.105×10^6

Cuadro 7. Crecimiento promedio cada 24 horas de las líneas celulares. Las células crecieron en medio RPMI 1640 enriquecido con suero fetal bovino al 10% y penicilina/ estreptomicina

Con los datos anteriores pudimos determinar el momento en el que cada línea celular alcanzó la confluencia. Como se puede observar en el Cuadro 7, K-562 fue la línea que primero alcanzó su confluencia, (debido a su alta tasa de división). Por otro lado, la línea que tardó más en alcanzar la confluencia fue HL-60, (con la tasa de división más baja). Por ultimo, no observamos cambios morfológicos ni contaminación alguna en las líneas celulares.

Resultados de la etapa #2

El estudio de los ligandos del receptor NKG2D ha abarcado diversos tipos de tumores, entre ellos las leucemias, pero muchos de ellos se limitan a estudios de caracterización del ligando en superficie. En este trabajo se pretendió contribuir a la ampliación del conocimiento de estas moléculas que son de suma importancia en la respuesta inmune antitumoral mediada por células NK. El uso de las líneas celulares

empleadas en este estudio es debido a que pueden ser una buena herramienta de trabajo para en un futuro ampliar la investigación en pacientes con diversos tipos de leucemias.

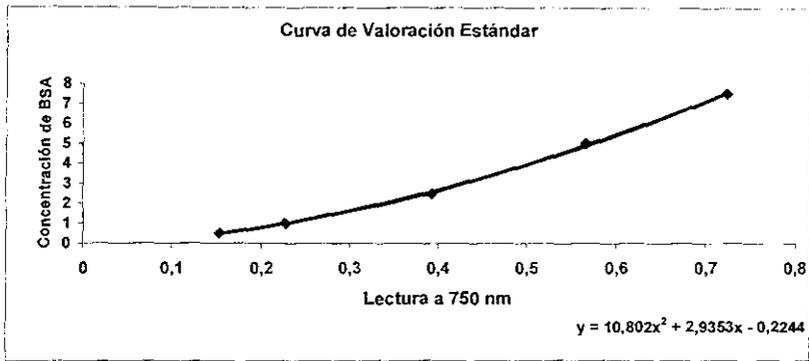
Las líneas celulares utilizadas en este estudio son, todas ellas, derivadas de leucemias de diferentes características (como se muestra en el Cuadro 3) que puedan ofrecernos una variedad de resultados. La línea celular K-562 es de origen mielógeno al igual que HL-60 (Cuadro 3), las otras dos líneas (CEM y JurKaT) son de origen linfocítico. El objetivo por el cual usamos líneas de diferente origen, fue para poder apreciar si hay un cambio evidente en la expresión de los diversos ligandos del receptor NKG2D.

La expresión total de los ligandos del receptor NKG2D se evaluó mediante western blot (como se describió en la metodología); para esto, fue necesario hacer una extracción de proteínas celulares. Para obtener una concentración adecuada de proteínas fue necesario tener una cantidad celular de aproximadamente 15 a 20 millones de células (por cada tipo celular a trabajar), por lo que las células se cultivaron partiendo de un concentrado de 1×10^6 células. De acuerdo a su tasa de división (mostrada en el Cuadro 7), la línea celular K-562 fue la que alcanzó la confluencia deseada para este procedimiento (aproximadamente 72 horas después de iniciado el cultivo). La línea celular HL-60 alcanzó la confluencia a las 96 horas; la línea JurKaT a las 72 horas y, por último, la línea CEM alcanzó la confluencia a las 72 horas.

Una vez que se obtuvieron las células, se procedió con la extracción de proteínas como ya se mencionó en la metodología. Al final de este procedimiento se obtuvo una cantidad importante de alícuotas de proteína de cada línea. Para la línea K-562, se obtuvieron alrededor de 15 alícuotas de 50 μ L (9.7 μ g/ μ L); para la línea HL-60, se obtuvieron 8 alícuotas de 50 μ L c/u (7.4 μ g/ μ L); para la línea JurKaT se

obtuvieron 5 alícuotas de 50 μ L (2.3 μ g/ μ L) y para la línea CEM se obtuvieron 11 alícuotas de 50 μ L (7.6 μ g/ μ L) .

Una vez que se obtuvieron las alícuotas, se realizó la cuantificación de proteína total mediante el método colorimétrico mencionado también en la metodología. Los resultados obtenidos de la cuantificación son los siguientes:



G

ráfica 1. Curva estándar para cuantificación. La curva estándar se realizó con albúmina bovina sérica (BSA) de concentración conocida. Se muestra la línea de tendencia (línea negra) y en la esquina inferior derecha se muestra la ecuación de la recta. Las concentraciones de BSA utilizadas fueron 0.5-7.5 μ g/ μ L.

Utilizando la ecuación de la recta, se obtuvieron los datos de la cantidad de proteína de cada línea celular, como se muestra en el Cuadro 8.

Línea celular	K-562	HL-60	JurKaT	CEM
Proteína total	9.7 μ g/ μ L	7.4 μ g/ μ L	2.3 μ g/ μ L	7.6 μ g/ μ L

Cuadro 8. Cantidad de proteína extraída por línea celular. Los valores de lectura del espectrofotómetro correspondiente a cada línea celular se sustituyeron en la ecuación de la curva. Los valores están expresados en μ g de proteína total por μ L de Buffer RIPA

Como podemos observar, la línea celular en la que se obtuvo una mayor cantidad de proteína fue K-562, y de la que menos cantidad se obtuvo fue JurKaT; coincidentemente, esto también se observa en cuanto al número de alícuotas obtenidas, ya que de la línea que menos se obtuvieron fue de JurKaT y de la que más alícuotas hubo fue de K-562.

Para la realización de la electroforesis se calculó la cantidad de proteína extraída necesaria para obtener una concentración de 40 μg en cada pozo. Como un control de carga, se procedió a realizar una electroforesis y, posteriormente una tinción con azul de Coomassie al 0.5% para verificar que se cargara la misma cantidad de proteína en los pozos (Figura 11).

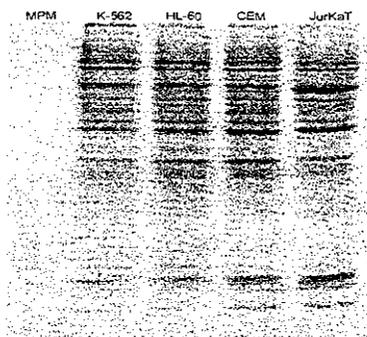


Figura 11. Imagen fotográfica del gel obtenido de la electroforesis de control de carga. Los pozos fueron cargados con extractos de proteínas de las líneas leucémicas K-562, HL-60, CEM y JurKaT en concentraciones de 40 μg por pozo.

La imagen anterior muestra que efectivamente se cargó una cantidad de proteína igual en cada pozo, esto significa que las posibles diferencias observadas en los resultados del western blot no son ocasionadas por un error al momento de cargar las muestras en el gel si no por las características propias de cada línea celular. También podemos observar que hay una expresión diferencial en algunas proteínas según la línea celular; sin embargo, esto no es relevante para este estudio, por lo que no se profundiza en este hecho.

Una vez que se corroboró que no hay error al momento de cargar, se procedió a realizar el western blot como ya previamente se mencionó en la metodología. El proceso de estandarización de la técnica fue un trabajo arduo de varios meses, en los cuales se

tuvo que estandarizar las diluciones de los anticuerpos y la solución bloqueadora, entre otros.

Una vez estandarizada la técnica se obtuvieron las placas finales. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de ULBP1 en todas las líneas es muy baja, casi nula. En la Figura 12 A podemos observar el western blot obtenido para ULBP1 en la que se observa un patrón de bandas dobles con pesos moleculares de entre 30-40 kDa y otra entre los 40-50 kDa. El primer patrón de bandas corresponde a los pesos moleculares conocidos para ULBP1. En cuanto a las bandas que se observan con un peso alrededor de los 20 kDa, estas pudieran ser productos de degradación. La Figura 12 B corresponde a la proteína actina (constitutiva) utilizada como control de carga. La banda correspondiente a actina no muestra un grosor similar en todas las muestras, pero debido a que se tiene un gel teñido como control adicional de carga en donde se observa que la cantidad de proteína en cada pozo es igual y el hecho de que este patrón de actina es repetitivo, se especula que aunque actina sea una proteína constitutiva, no necesariamente debe haber la misma cantidad en todos los tipos celulares utilizados.

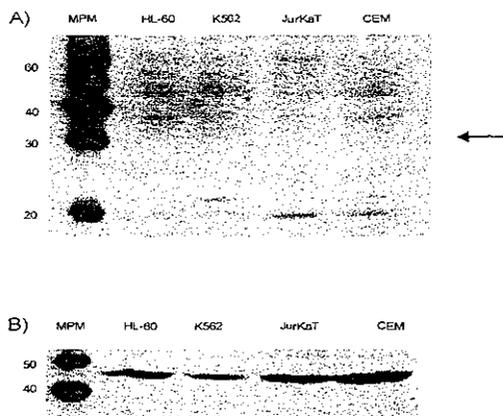


Figura 12. Detección de ULBP1 en las líneas celulares leucémicas mediante western blot. A) Detección de ULBP1 en las líneas celulares leucémicas HL-60, K-562, Jurkat y CEM, en concentraciones de 40µg de proteína total en preparaciones de 25µL. La flecha indica la banda de peso molecular esperado (~31kDa). B) Western blot de la proteína constitutiva actina detectada en las mismas condiciones de carga de la fig. 12 A (control).

La presencia de ULBP2 en las diferentes líneas también estuvo muy limitada. La Figura 13 A, donde al igual que ULBP1, se observa un patrón de bandas entre los 30-40 kDa y otro entre los 40-50 kDa. El peso correspondiente a ULBP2 es de aproximadamente 31kDa, por lo que la banda esperada para ULBP2 es la que se encuentra entre los 30-40 kDa. En la Figura 13 B se observa actina como control: de la misma forma, las variaciones entre las cantidades de actina en cada línea celular son debidas a la propia biología de las células.

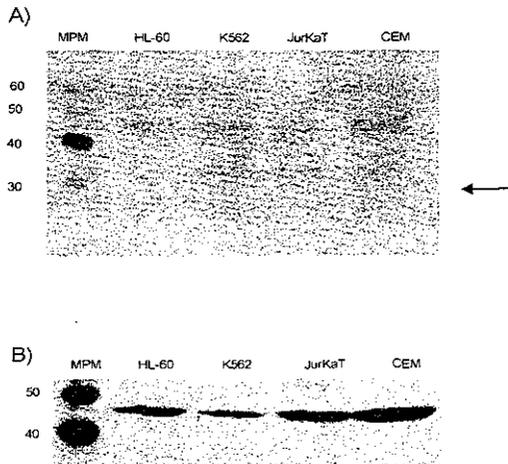


Figura 13. Detección de ULBP2 en las líneas celulares leucémicas mediante western blot. A) Detección de ULBP2 en las líneas celulares leucémicas HL-60, K-562, JurKaT y CEM en concentraciones de 40µg de proteína total en preparaciones de 25µL. La flecha indica la banda del peso molecular esperado (~31 kDa). B) Western blot de la proteína constitutiva actina detectada en las mismas condiciones de carga de la Fig. 12 A (control).

Por el contrario, se observó una alta expresión de ULBP3 en todas las líneas celulares (Cuadro9), tal como se aprecia en la Figura 14 A, donde además de la banda que corresponde al peso molecular esperado (~31 kDa), se observa otra banda de alrededor de 50kDa y que además está presente en todas las líneas celulares. Es interesante notar que hay una fuerte expresión de la banda de 31 kDa en la línea linfocítica JurKaT con

respecto a las demás líneas celulares, en las cuales la expresión de esta banda se encuentra disminuida, principalmente en la línea linfoblástica CEM. En la Figura 14 B se observa el control actina, como ya se ha mencionado antes, las variaciones observadas en la cantidad de proteína presente en cada línea pueden ser producto de la propia biología de la célula.

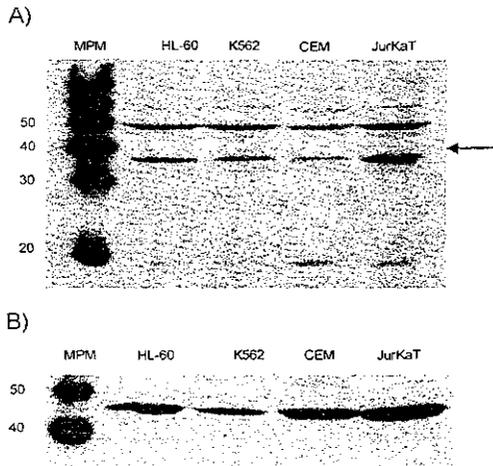


Figura 14. Detección de ULBP3 en las líneas celulares leucémicas mediante western blot. A) Detección de ULBP3 en las líneas celulares leucémicas HL-60, K-562, JurKaT y CEM en concentraciones de 40µg de proteína total cada una en preparaciones de 25µL c/u. La línea muestra la banda correspondiente al peso molecular esperado (~31 kDa). B) Western blot de la proteína constitutiva actina detectada en las mismas condiciones de carga de la fig. 12.A (control).

En cuanto a la detección de MICA/B por western blot observamos un único patrón de bandas entre los pesos moleculares de 40kDa y 50kDa en las líneas celulares K-562, CEM y JurKaT; interesantemente MICA/B no está presente en la línea promieloblástica HL- 60 (Figura 15 A). También se observa que la expresión de MICA/B es más fuerte en la línea celular eritroblástica K-562 que en las líneas celulares linfocitárias CEM y JurKaT. Otro aspecto que salta a la luz, es la visualización de una banda muy pesada de aproximadamente 100 kDa en la línea linfocítica JurKaT, que puede considerarse una banda específica, ya que se observa muy fuerte y sólo se

observa en esta línea celular. La Figura 15 B muestra la proteína actina como control. De igual forma se considera que las variaciones de la cantidad de actina por línea celular depende de su biología.

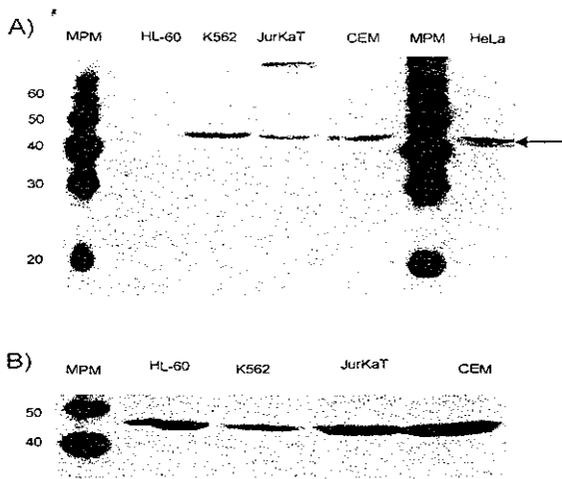


Figura 15. Detección de MICA/B en las líneas celulares leucémicas mediante western blot. A) Detección de MICA/B en las líneas celulares leucémicas HL-60, K-562, JurKaT y CEM en concentraciones de 40µg de proteína total cada una en preparaciones de 25µL c/u. Se utilizó la línea celular derivada de cáncer cervico-uterino positiva a VPH HcLa como control positivo para MICA/B. La flecha indica la banda correspondiente al peso molecular esperado (~45 kDa) observado previamente. B) Western blot de la proteína constitutiva actina detectada en las mismas condiciones de carga de la fig. 12.A (control).

DISCUSIÓN

El sistema inmune ha evolucionado a lo largo de la historia de la vida para poder realizar una eficaz eliminación de los “agentes foráneos” que pueden llegar a ingresar a nuestro organismo. Desde que el primer organismo fue capaz de eliminar estos “agentes foráneos”, se fue perfeccionando este sistema de reconocimiento y eliminación mediado por el sistema inmune. La aparición de la respuesta inmune innata fue el primer mecanismo de eliminación con cierto grado de especialización. En este trabajo se aborda de forma específica uno de estos mecanismos innatos de la inmunidad: aquel mediado por células NK las cuales reconocen células infectadas por virus, así como células tumorales.

Dado que el reconocimiento de células blanco por parte de las células NK está mediado en parte, por el receptor NKG2D, la capacidad de reconocimiento de una gran diversidad de ligandos que presenta este receptor podría ser considerado una forma de adaptación ante los mecanismos evasivos usados por las células transformadas por virus o células tumorales, por lo que esta “promiscuidad” provee una mayor protección al sistema inmune (Eagle, 2007).

Este estudio muestra el patrón de expresión de los principales ligandos de activación del receptor NKG2 en diferentes líneas celulares leucémicas. Entre los ligandos estudiados se incluyen los principales miembros de las dos familias, tanto de la familia MIC (MICA/B) como la familia ULBP/RAET1 (ULBP1, ULBP2 y ULBP3) cuya expresión se ha observado en infecciones virales y células tumorales (Groh, 1996; Cosman, 2001; Pende, 2002). Dado que la principal respuesta inmune innata a células tumorales es llevada a cabo por células NK, de ahí el motivo por el cual fue importante evaluar la expresión de estas dos familias de ligandos del receptor NKG2D en células leucémicas.

En estudios previos se ha observado que la expresión de los ligandos del receptor NKG2D en pacientes con diversos tipos de leucemias es muy variable y poco predecible, ya que los valores reportados para mRNA son muy heterogéneos, pero a nivel de superficie, MICA/B fue el que reportó mayor expresión mediante citometría de flujo (Salih, 2003). También se ha observado que en líneas celulares leucémicas hay poca expresión en superficie de MICA/B y de ULBP1, ULBP2 y ULBP3, siendo MICA/B el de menor expresión, y siendo ULBP2 el que más se expresa (Pende, 2002). En cuanto a lo observado por nosotros mediante western blot, las líneas celulares derivadas de leucemias muestran expresión de tres miembros de la familia ULBP/RAET1, siendo ULBP3 el que mayormente se expresó en todas las líneas

celulares. La expresión de la familia MICA/B fue consistente en las líneas celulares K-562, CEM y JurKaT, pero no en HL-60. Dado que observamos una aparente expresión diferencial de los ligandos de NKG2D, podemos hacer varias especulaciones.

Primero, los resultados de la familia ULBP/RAET1 que muestran una expresión mayor para ULBP3 con respecto a ULBP1 y ULBP2, sugieren que ULBP3 sea el principal mecanismo de reconocimiento por parte de las células NK; sin embargo, para corroborarlo será importante realizar estudios de expresión en superficie mediante citometría de flujo para ver si la expresión en superficie de este ligando corresponde con lo observado por western blot. En dado caso de que sí exista la expresión en superficie celular de ULBP3, correspondería realizar un estudio funcional de interacción NKG2D/ULBP3 y corroborar que efectivamente, éste sea un mecanismo de activación de las células NK en respuesta a células leucémicas.

Otro aspecto importante a considerar sobre esta parte de los resultados, es que se observa otro patrón de bandas de mayor peso molecular, el cual nosotros especulamos que pueda tratarse de la forma madura de la proteína, ya que estudios en nuestro laboratorio, se ha observado la presencia de una banda de mayor peso molecular de MICA/B en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino y se sabe que la molécula MICA/B es una proteína altamente glucosilada (Bauer, 1999), por lo cual, estos resultados sugieren que esta banda de mayor peso molecular sea la forma glucosilada de la proteína. De forma similar esto podría ocurrir con las moléculas ULBP/RAET1 pero, debido a que no hay estudios en donde se demuestre esto, se necesitaría diseñar un conjunto de experimentos donde se demuestre realmente que las ULBP son proteínas altamente glucosiladas, al igual que MICA/B. Otra respuesta a esto es que como ULBP1, ULBP y ULBP3 son moléculas que se unen a la membrana

mediante un anca de GPI (Cosman, 2001), la banda observada podría ser ULBP3 unida al GPI y es lo que se detecta como una banda de mayor peso molecular.

Otro dato importante es el hecho de las variaciones en la expresión de ULBP3 en las diferentes líneas. La línea celular en la que se observa menor expresión es la línea linfoblástica CEM. En cambio, la línea celular linfocítica JurKaT muestra una mayor expresión de ULBP3 con respecto al resto de las líneas celulares. Este dato resultó ser muy interesante ya que se han realizado estudios donde se indujo la diferenciación de blastos de pacientes con leucemia mieloblástica aguda y se observó que hay un incremento en la expresión de ciertos ligandos del receptor NKG2D como es el caso de ULBP1 (Nowbakht, 2005). Sin embargo, para hacer esta aseveración será necesario realizar ensayos de diferenciación en la línea celular CEM (linfoblasto) mediante factores de crecimiento e interleucinas o, en su caso, drogas de uso médico en el tratamiento de leucemias linfoblásticas agudas y hacer una medición en superficie celular antes y después de la inducción de la diferenciación y ver si se aumenta la expresión. Además, será interesante realizar ensayos de citotoxicidad, para ver si este ligando es el de mayor importancia biológica en el reconocimiento de células leucémicas residuales durante el tratamiento quimioterapéutico y/o, el trasplante de médula ósea. A pesar de la existencia de estas diferencias, no se puede considerar una expresión diferencial de ULBP1, ULBP2 y ULBP3 en estas líneas, ya que todas tienen un comportamiento similar, aunque algunas tuvieron mayor cantidad de alguno de estos ligandos.

En cuanto a la familia MIC, se ha observado una expresión más generalizada en diversos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, mama, próstata y melanomas. (Bauer, 1999; Groh, 1999; Girardi, 2001), por lo que especulábamos que de igual forma, la expresión de estas moléculas en leucemias sería generalizada en las diferentes líneas

celulares estudiadas; pero sorpresivamente, los resultados observados muestran que HL-60 no expresa MICA/B, a diferencia de las líneas K-562, JurKaT y CEM que tienen una adecuada expresión. Al igual que con ULBP, la falta de expresión de MICA/B en la línea celular HL-60, podría estar relacionada con la poca diferenciación, al menos como se ha mostrado en un trabajo realizado por Rohner *et al*, en el cual se induce la diferenciación de la línea celular HL-60 con fármacos utilizados en el tratamiento de leucemia promielocítica aguda y se observó un incremento en la expresión de ULBP1 en superficie. De igual forma esto lo podemos hacer y evaluar si se aumenta la expresión de MICA/B en proteína total y en superficie como fue en el caso de ULBP1 (Rohner, 2007). La línea celular que mostró una mayor expresión de MICA/B fue K-562 al respecto, se ha observado que en esta línea hay una alta expresión de MICA/B, ULBP1 y ULBP2 en superficie, pero al tratar esta línea celular con un inhibidor del oncogén BCR/ABL, se detectó una considerable disminución en la expresión de MICA en superficie, indicando que hay una relación directa entre el oncogén BCR/ABL y la expresión de MICA (Boissel, 2006). Con estos datos podemos sugerir que la diferenciación de esta línea celular disminuye la expresión de los ligandos de NKG2D, lo cual corroboraremos con estudios de diferenciación, similares a los mencionados anteriormente.

También es importante considerar la expresión de una banda en la línea celular JurKaT de peso molecular cercano a los 100 kDa que podría significar lo siguiente: que es que JurKaT tienen una proteína que comparte el mismo epítotope de MICA/B con el cual se realizó el anticuerpo utilizado en esta técnica. Por lo que se esperaría que sea una unión inespecífica del anticuerpo, pero en repeticiones posteriores con otro anticuerpo de otra casa comercial observamos el mismo comportamiento, por lo que descartamos esta posibilidad. Es importante considerar que el anticuerpo utilizado

reconoce ambas proteínas, tanto MICA como MICB, por lo que lo ideal sería realizar estas pruebas con anticuerpos específicos para cada una de ellas, lamentablemente la disponibilidad comercial de estos es poca al momento.

El comportamiento de los ligandos del receptor NKG2D observado es aparentemente constante en todas ellas, excepto MICA/B que es el ligando que no se expresa en una de ellas (HL-60), la cual es una línea celular mieloblástica indiferenciada. Por lo que podemos decir que existe una expresión constante de los ligandos del receptor NKG2D en las diversas líneas celulares. Aun así, será necesario ampliar el estudio a pacientes para poder entender mejor la biología del sistema NKG2D/Ligandos de NKG2D en el reconocimiento de células leucémicas por las células NK.

Conclusiones

1. Existe expresión de los ligandos de la familia ULBP/RAET1 en las diferentes líneas celulares derivadas de leucemias utilizadas en este estudio.
2. Existe expresión de MICA/B en 3 líneas celulares derivadas de leucemias (K-562, JurKaT, CEM), no así en la línea celular promieloblástica HL-60.
3. MICA/B es mayormente expresado en la línea celular eritroblástica K-562 que en el resto de las líneas celulares.
4. La expresión de ULBP3 es mayor en las líneas celulares con respecto a ULBP1 y ULBP2.
5. Existe mayor expresión de ULBP3 en la línea celular linfocitaria JurKaT con respecto a la expresión que se observa en el resto de las líneas celulares.

REFERENCIAS

- Beck G, Habicht G. "Immunity and the invertebrates". Scientific American. 1996. 275(5):60-3, 66.
- Littman G. "Sharks and the Origins of Vertebrate Immunity". Scientific American. 1996. 275(5):67-71
- Matzinger P. "The Danger Model: A Renewed Sense of Self". Science, 2002. 296(5566):301-5
- Klein J, Nikolaidis N. "the descent of the antibody- based immune system by gradual evolution." PNAS. 2005. 102(1): 169-174
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. "Natural Killer Cells: A mystery no more." Scandinavian Journal of Immunology. 2002. 55: 229-232.
- 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". PNAS. 1996. 93: 122445- 12450
- Cosman D, *et al.* "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." Immunity. 2001. 14(2):123-33
- Ortutay C, Siermala M, Vihinen M. "Immtree: database of evolutionary relationships of genes and proteins in the human immune system." Immune Research. 2007. 3:4
- Litman G, Cooper M. "Why study the evolution of immunity?" Nature Immunology. 2007 8(6): 5547- 553.
- Berrón- Pérez R, Penagos- Paniagua M, Zaragoza- Benítez J, *et al.* "sistema del complemento. Vías clásicas y de la lectina que se una a la Manosa". Alergia, Asma e inmunología pediátrica. 2003. 12(2): 46-52.
- Wills- Karp M. "Complement Activation Pathways A Bridge between Innate and Adaptive Immune Responses in Asthma." Proceedings of the American Thoracic Society. 2007. 4: 247-251
- Villarruel R, Guisar R, Corrales M, *et al.* "Peptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune" Investigación en Salud. 2004. 6 (3): 170-179.

- Escovar X, Cálela J. "Péptidos antimicrobianos cutáneos" *Dermatologia Peruana*. 2004 14(1).
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, *et al.* "Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines." *Journal of Investigative Dermatology*. 2007. 127: 594-604
- Shormant K, Naik S. "steady- state and inflammatory dendritic- cell development." *Nature Reviews*. 2007. 7: 19-30.
- Colucci F, Caligiuri M, Di Santo, J P. "What does it take to make a natural killer?" *Nature Reviews*. 2003. 3: 413- 425.
- Backström E, Kristenson K, Ljunggren H. G. "Activaction of Natural Killer Cells: underlying molecular mechanisms revealed" *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004. 60: 14-22.
- Natarajan K, Dimasi N, Wang J, Mariuzza RJ, Margulies DH. "Structure and function of natural killer cells receptors: Multiple Molecular Solutions to Self, Nonself Discrimination". *Annu. Rev. Immunol*. 2002. 20:853–85.
- Ljungger HG, Kärre K. "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." *Immunology today*. 1990 11(7):237-44
- Bashirova A, Martin MP, McVicar DM, Carrington M. "the killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: turning the genome for defense." *Annu. Rev. Genom. Human genet*. 2006. 7: 277- 300
- Vitale M, Bottino C, Sivori S, *et al.* "NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-Major Histocompatibility Complex-restricted Tumor Cell Lysis." *J. Exp. Med*. 1998. 187:2065-2072
- Pessino A, Sivori S, Bottino C, *et al.* "Molecular Cloning of NKp46: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity". *J. Exp. Med*. 1998. 188:953–960
- Pende D, Parolini S, Pessino A, *et al.* "Identification and Molecular Characterization of NKp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells." *Exp. Med*. 1999. 190:1505–1516

- Biassoni R, Cantoni C, Marras D, *et al.* "Human Natural Killer Cell receptors: insights into their molecular function and structure." *J. Cell. Mol. Med.* 2003. 7(4): 376- 387.
- Jamieson, A M. *et al.* "The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killer". *Immunity.* 2002 17: 19-29
- Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong R. "Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I- like ligands MICA." *Nature.* 2001. 2:443-451.
- Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig K. "The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure" *PNAS,* 2005. 102: 7641-7646
- Suemizu H, *et al.* "A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail." *PNAS.* 2002. 99:2971- 2976.
- González S, Groh V, Spies T. "Immunobiology of human NKG2D and its ligands" *CTMI.* 2006. 298:121-138.
- Raulet D. "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." *Nature Reviews.* 2003. 3:781-790
- Bauer S. "Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA." *Science,* 1999. 285:727
- Groh V, *et al.* "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MIC A and MICB." *PNAS,* 1999. 96(12):6879-84.
- Girardi M, Oppenheim D, *et al.* "Regulation of Cutaneous Malignancy by gd T Cells". *Science,* 2001. 294: 605- 608
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. "Tumor- derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T cell activation. *Nature.* 2002. 419: 734-738
- Salih, H. R.; Antropius, H; *et al.* « Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia ». *Blood.* 2003. 102: 1389-1396.
- Skov S, Penderson M, Andersen L, *et al.* "Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase- 3 – dependent expression of MHC class I- related chain A and B". *Cancer research.* 2005. 65: 11136- 11144.

-
- Nowbakht P, Mihai-Constantin SL, Rohner A, *et al.* "Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias". *Blood*. 2005. 9: 3615- 3622.
 - Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. "Recognition of Stress-Induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial $\gamma\delta$ T Cells". *Science*. 1998. 279 (5357):1737 – 1740.
 - Boissel N, Rea D, Tieng V, *et al.* "BCR/ABL oncogen directly controls MHC class I chain- related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia". *The journal of Immunology*. 2006. 176: 5108- 5116.
 - Sconocchia G, Lau M, Provenzano M, *et al.* "The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK- T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target- cell interaction". *Blood*. 2005; 106: 3666- 3672
 - Cornejo- Garcia JR, Tenencia F, Courreges MC, *et al.* LETAL, a tumor- associated NKG2D immunoreceptor ligand, induces activation and expansion of effector immune cells. *Cancer Biol Ther*, 2003. 2:446- 51
 - Wei C, Wei H. "UL16 Binding Protein." *Immunobiology*. 2004. 209(3): 283- 290
 - Wiemann K, Steinle A. "Danger- detector NKG2D: Immunosurveillance of induced self and modulation by cytokines and soluble ligands." *Curr. Med. Chem. Anti-inflammatory and anti- allergy agents*. 2005. 4(2) 1-12
 - Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. "Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down- regulating NKG2D expression." *Cellular immunology*. 2006. 239: 22- 30
 - Eagle R, Traherne J, Shiru O, *et al.* "Regulation of NKG2D ligand gene expression." *Human immunology*. 2006. 67: 159-169.
 - Lopez- Soto A, Quiñones- Lombraña A, López- Arbesú r, *et al.* "Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligando f the NKG2D receptor." *The journal of Biological Chemistry*. 2006 281(41): 30419- 30430.
 - Rölle A, Mousavi- Jazi M, Reiksson M. *et al.* "Effects of Human Cytomegalovirus Infection on Ligands for the Activating NKG2D Receptor of NK Cells: Up- Regulation of UL16-Binding Protein (ULBP)1 and ULBP2 Is Counteracted by the Viral UL16 Protein1." *The Journal of Immunology*. 2003. 171: 902- 908

- Spreu J, Steinle A. "Human cytomegalovirus- encoded UL16 discriminates MIC molecules by their $\alpha 2$ domains." *The journal of immunology*. 2006. 177: 3143-3149.
- Roth, D. "From lymphocytes to sharks: V(D)J recombinase moves to the germline." *Genome Biology*. 2000. 1(2): reviews 1014.1- 1014.4
- Sadosky, M. "The RAG proteins in V(D)J recombination: more just a nuclease." *Nucleid Acids Research*. 2001. 29(7): 1399- 1409
- Geenen V, Poulin J, Dion M, *et al.* "Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology." *Journal of Endocrinology*. 2003. 176: 305- 311
- Allam A, Kabelitz, D. "TCR *trans*-Rearrangements: Biological Significance in Antigen Recognition vs the Role as Lymphoma Biomarker." *Journal of Immunology*. 2006. 176: 5707-5712
- Nowbakht P, Ionescu M, Rohner A, *et al.* "Ligands for natural killer cell- activating receptor are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias" *Blod*, 2005. 105:3615- 3622
- Eagle R, Trowsdale J. "Promiscuity and the single receptor NKG2D". *Nature*, 2007. 7: 737- 7444.
- Rohner A, Langenkamp U, Siegler U, *et al.* "Differentiation- promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expresión and enhance the susceptibility of acute myeloid leukaemia cells to natural killer cell- mediated lysis". *Leukemia research*, 2007. 31(10): 1393-402.

TESIS/CUOBA

BIBLIOTECA CUOBA