

El IMMUNEPOTENT-CRP activa a las células NK humanas y mejora su respuesta citotóxica

Alan B. Martínez-Loria^{a,b}, Ana C. Martínez-Torres^{a*}, Helen Y. Lorenzo-Anota^a, Daniel Scott-Algara^b, Cristina Rodríguez-Padilla^a

^a Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México.

^b Laboratorio de Biología Celular de Linfocitos, Instituto Pasteur, París, Francia.

* ana.martinezto@uanl.edu.mx.

Palabras clave: células NK, activación de linfocitos, receptores de células NK, I-CRP, Inmunoterapia.

Introducción

Las células *Natural Killer* (NK) son células linfoides innatas, definidas comúnmente en humanos como CD56+CD16+CD3-, que reconocen y matan tanto células cancerosas, como células infectadas por patógenos intracelulares¹. Dependiendo del subtipo, expresan diferentes combinaciones de receptores inhibidores o activadores, que dan la capacidad de responder en diferentes condiciones patológicas². Sin embargo, durante una enfermedad viral y en los tumores humanos establecidos, a menudo hay cambios en la expresión de estos receptores y en sus ligandos en las células infectadas o tumorales, favoreciendo a la progresión de la enfermedad³. La administración de citocinas generalmente se usa para expandir a las células NK, siendo la IL-2 la más utilizada en la clínica, no obstante, en dosis altas genera hepatotoxicidad, además de activar también a las células Treg, las cuales dificultan la actividad de las células NK⁴. Debido a la problemática que representan aún los tratamientos actuales, se siguen buscando nuevas alternativas inmunoestimulantes. El IMMUNEPOTENT-CRP (I-CRP) es un extracto dializable de leucocitos de bazo bovino con moléculas menores a 12 kDa que actualmente se utiliza como adyuvante y es capaz de modificar la respuesta inmune de pacientes con cáncer de mama y cáncer de pulmón, observando un aumento de los leucocitos totales y en las subpoblaciones CD4+, CD8+, CD16+ y CD56+^{5,6}. Debido a lo observado en la clínica, definir los efectos del I-CRP sobre las células NK ayudará a su empleo como alternativa terapéutica.

Metodología

Después de firmar el consentimiento informado se colectó la sangre de donantes sanos (sin signos clínicos de enfermedad) para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante gradiente de densidad estándar con Ficoll-Paque, y las células NK se aislaron en columnas magnéticas mediante selección negativa. Las PBMC y las células NK aisladas se expusieron al I-CRP (1.5 U/mL) y se evaluó la viabilidad (Calceína-AM). Después se determinó la activación mediante el marcador CD69, comparándolo contra IL-2 (100 U/mL) e IL-15 (15 ng/mL) como controles positivos. Posteriormente, se analizó la expresión de un panel de receptores de células NK mediante citometría de flujo (CytoFlex S, Beckman Coulter) utilizando anticuerpos: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD56, anti-CD160, anti-CD161, anti-CD85j, anti-NKp44, anti-NKp30, anti-NKp46, anti-CD158e, anti-CD158i, anti-CD158b, anti-CD158d, anti-CD158a, anti-CD226, anti-NKG2C, anti-NKG2D. Finalmente, se realizaron co-cultivos con la línea celular K562, la cual es susceptible al reconocimiento de las células NK, para comparar al I-CRP contra la IL-2 como estimulantes, evaluando la desgranulación (CD107a+) como indicador de la actividad citotóxica de las células NK.

Resultados y discusión

El tratamiento con I-CRP durante 24 y 48 h no reduce la viabilidad de las PBMC al no presentarse pérdida significativa de Calceína comparada al control sin tratamiento. A partir de las poblaciones viables (Calceína +) se analizó la expresión de CD69 en PBMC totales y en las células NK aisladas, observándose una diferencia significativa contra el control negativo y la estimulación con IL-2 e IL-15. Una vez determinada la activación, se realizó un análisis multicromático, el cual indicó que el I-CRP, a diferencia del control negativo y el tratamiento con IL-2, aumenta de manera significativa la expresión de los principales receptores activadores analizados, como NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D y NKG2C, observándose también un incremento en los receptores KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*), como CD158a, CD158d, CD158e, CD158b y CD158i, pero sin encontrar diferencias significativas en los receptores CD160, CD226 y CD85j. No se han encontrado reportes que indiquen una modulación similar de estos receptores por parte de otro estimulante. Finalmente, se evaluó si el I-CRP incrementa la actividad efectora de las células NK contra la línea celular K562, encontrándose un incremento en la desgranulación de forma significativa al ser comparado con el control sin tratamiento y a la estimulación con IL-2.

Conclusiones

El I-CRP activa a las células NK, aumentando la expresión de los receptores activadores, mejorando así su respuesta citotóxica. Este trabajo ayuda a comprender el mecanismo del I-CRP como inmunoestimulante, contribuyendo a su futuro empleo como alternativa terapéutica para enfermedades donde el agotamiento de las células NK juega un rol determinante en la progresión.

Agradecimientos

A Marta Mastrogianni por su apoyo y ayuda técnica. Al Laboratorio de Inmunología y Virología y al Instituto Pasteur por el soporte económico y la infraestructura brindados. ABML y HYL A agradecen al CONACYT por la beca de manutención.

Referencias

1. Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. *Immunology*. **2009**, 126(4), 458–465.
2. De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C., & Moretta, L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2011**, 108(2), 728–732.
3. Höglund, P., & Ljunggren, H. G. *In Natural Killer Cells*. **2010**, 55–64.
4. Burns, L. J., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Vesole, D. H., ... Miller, J. S. *Bone Marrow Transplantation*. **2003**, 32(2), 177–186.
5. Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Miranda-Hernández, D., ... Rodríguez-Padilla, C. *Cytotherapy*. **2006**, 8(4), 408–414.
6. Lara, H. H., Ixtapan-Turrent, L., Garza-Treviño, E. N., Tamez-Guerra, R., & Rodríguez-Padilla, C. *Experimental and Therapeutic Medicine*. **2010**, 1(3), 425–431.