



Universidad Autónoma Del Estado De Morelos

FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRIA EN MEDICINA MOLECULAR



SECRETARIA DE INVESTIGACION  
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO

---

---

**“Mecanismos de inhibición del receptor SLAMF7 en  
células NK”**

*Tesis*

*Para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular*

*Que presenta:*

*QBP. Elizabeth Ramirez Casarrubias*

Director de tesis:

*Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz*

Cuernavaca, Morelos, México mayo del 2024.

## **Facultad de Medicina UAEM**

**Tutor principal:** Dr. Mario Cruz Ernesto Muñoz (Facultad de Medicina-UAEM)

**Tutor personal:** Dra. Gabriela Rosas salgado (Facultad de Medicina-UAEM)

### **Miembros del comité tutorial:**

Dr. José Luis Montiel Hernández (Facultad de Farmacia-UAEM)

Dra. Delia Vanessa López Guerrero (Facultad de Medicina-UAEM)

Dr. Saúl Osvaldo Reyes Lugo (Instituto Nacional de Pediatría-INP)

### **Miembros del jurado de examen**

Presidente: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Secretario: Dra. Gabriela Rosas Salgado

Primer vocal: Dr. Iván Martínez Duncker

Segundo vocal: Dra. Delia Vanessa López Guerrero

Tercer vocal: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz Tutor Principal

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios por brindarme vida, salud y sabiduría para seguir adelante, hasta llegar a la meta.*

*Agradezco enormemente a mis padres por su apoyo incondicional, que me ha impulsado y permitido la formación profesional y personal que hoy en día tengo y por ello cada logro es dedicado con todo mi corazón a mi madre Nicolasa Casarrubias y a mi padre Florencio Ramirez Deciderio.*

*Agradezco a los laboratorios 1 y 11 de la facultad de medicina, en especial al laboratorio 4, que fue donde realice mis ensayos y todo lo académico, así como también al Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz por permitir ser mi asesor y guiarme en el transcurso de la maestría; al IBT UNAM por permitirnos trabajar en sus instalaciones y utilizar el citómetro de flujo.*

*Agradezco a todas las personas que tiempo atrás estuvieron en mi camino y decidieron permanecer en él, así como nuevas personas que durante esta aventura también me brindaron de distintas maneras su apoyo y que durante toda esta trayectoria compartieron gratas experiencias conmigo.*

*Este logro también se lo dedico a mis hermanos y hermanas que siempre confiaron que lograría todo lo que me proponga, esperando ser su orgullo y ejemplo.*

*Finalmente agradezco el apoyo que Conahcyt me dio por medio de la beca que se me otorgo.*

## INDICE GENERAL

1. RESUMEN .....	6
2. INTRODUCCION.....	8
2.1 Células NK.....	8
2.2 Mecanismos de activación de las células NK .....	9
2.3 Receptores de inhibición.....	10
2.4 Receptores de activación.....	12
2.5 Receptores de la Familia SLAM .....	14
2.6 SLAMF7 .....	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	22
5. HIPÓTESIS .....	22
6. OBJETIVOS .....	22
General .....	22
Específicos.....	22
7. METODOLOGÍA .....	23
7.1 Anticuerpos y citometría de flujo.....	23
7.2 PCR en punto final .....	23
7.3 Análisis de DNA por electroforesis .....	23
7.4 Construcción de la secuencia codificante de SLAMF7 .....	23
7.5 Digestión con Hind III .....	24
7.6 Cultivo de línea celular HeLa .....	24
7.7 Transfección directa con lipofectamina 2000 (Invitrogen™).....	24
7.8 Infección retroviral .....	25
8.1 Lisis Celular Especifica .....	26
8.2 Conjugados Celulares.....	27
8.3 Estadística de los resultados obtenidos .....	27
9. RESULTADOS .....	28
9.1 Clonación de mSLAMF7 en el vector pFB-GFP .....	28
9.2 Transformación de bacterias competentes .....	29
9.3 Infección Retroviral.....	31
9.4 Expresión de mSLAMF7 en células HeLa.....	32
9.5 Expresión de mSLAMF7 en células YT-S .....	34

9.6 Lisis celular especifica con células YT-S mSLAMF7 HeLa pFB-GFP Y HeLa pFB-GFP mSLAMF7. ....	35
9.7 Conjugados Celulares en células HeLa pFB-GFP Y HeLa pFB-GFP mSLAMF7.....	37
<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>11. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>12 .PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>44</b>
<b>14. ANEXOS.....</b>	<b>49</b>

## 1. RESUMEN

Las células Natural Killer (NK) juegan un papel esencial en la inmunidad contra tumores e infecciones virales a través de dos mecanismos fundamentales: secreción de citocinas y función citotóxica[1],[2]. Por lo tanto, una mejor caracterización de los mecanismos moleculares y celulares que regulan estos procesos es de gran importancia para evaluar la modulación de sus funciones efectoras en el ámbito clínico. Por su parte, la familia de proteínas SLAM es un grupo de receptores transmembranales que se expresan de forma diferencial en las células hematopoyéticas. Las células NK expresan varios miembros de la familia SLAM, dentro de los cuales, los receptores 2B4 y SLAMF7 son los mejor estudiados. En el modelo murino, la expresión del ligando de SLAMF7 en la célula diana, estimula la función citotóxica de las células NK a través de un mecanismo dependiente de la proteína adaptadora EAT-2, sin embargo, se desconoce si la función y modos de acción de SLAMF7 están conservados en células NK humanas. Estudios previos en células NK de origen humano mostraron que el entrecruzamiento de SLAMF7 en la superficie de las células NK, mediante el empleo de anticuerpos específicos, estimula la función citotóxica de las células NK. Así mismo, se observó que la expresión de SLAMF7 en células tumorales que carecen de moléculas del MHC-I son eliminadas más eficientemente por células NK en comparación de su contraparte, que no expresa SLAMF7. Estos resultados sugieren que SLAMF7 es un receptor que promueve la activación de células NK, sin embargo, no son claros los mecanismos subyacentes. Es por eso que en este trabajo nos enfocamos en evaluar el patrón de expresión de SLAMF7 en diferentes subpoblaciones y estadios de activación de células NK humanas, así como determinar su participación en eventos tales como citotoxicidad y adhesión celular. Finalmente, con el objetivo de iniciar la caracterización de los mecanismos intracelulares en células NK humanas, evaluamos la dependencia de las funciones mediadas por SLAMF7 por algunas proteínas de señalización. Para lograr estos objetivos, se expresó ectópicamente SLAMF7 en células HeLa, las cuales sirvieron como un modelo de células que son susceptibles a la función lítica de las células NK. Se realizaron varios ensayos funcionales basados en el

uso de citometría de flujo y. Nuestros resultados mostraron que la expresión basal de SLAMF7 está regulada en función del estadio de activación de las células NK. La influencia de SLAMF7 sobre la formación de conjugados celulares demostró que la presencia de este receptor en las células HeLa disminuyó significativamente el porcentaje de conjugados entre células NK y células blanco. Estos resultados sugieren que SLAMF7 puede estar impactar en el proceso de adhesión celular en células NK como uno de los principales mecanismos por los cuales se pueda estar modulando la respuesta citotóxica de las células NK. Sin embargo, aún falta evaluar si SLAMF7 participa en modular otros eventos discretos como son la polarización y desgranulación.

## 2. INTRODUCCION

### 2.1 Células NK

Las células Natural Killer (NK) son células citotóxicas que pertenecen a las células linfoides innatas (ILC). Debido a su capacidad de eliminar células infectadas por virus o células tumorales, las células NK juegan un papel central en la inmunidad. [1],[2]. Las NK se originan a partir de células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y se considera que la médula ósea es el sitio principal de su desarrollo, sin embargo estudios recientes sugieren que las células NK también pueden desarrollarse y madurar en los órganos linfoides secundarios, incluidos las amígdalas, el bazo y los ganglios linfáticos. Los progenitores de células NK progresan a través de distintas etapas de desarrollo y adquieren gradualmente la expresión de receptores de superficie que definen la identidad de las células NK[3]. En ratón este marcador se identifica como NK1.1 mientras que en humanos es CD56 [4].

Las NK representan 5 a 15% de los leucocitos en sangre periférica humana y por lo general se identifican mediante la expresión de CD56 y la ausencia de coexpresión de CD3, quien es un marcador de células T (TCR). En humanos, dependiendo de la expresión de CD56 y CD16, las células NK se pueden dividir en dos subpoblaciones, las cuales son CD56<sup>Bright</sup> CD16<sup>dim</sup> / - y CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>[5]. Se sugiere la primera corresponde a un estadio menos maduro que es principalmente productora de citocinas mientras que la segunda corresponde a un estadio más maduro y ejerce principalmente una función citotóxica [4],[5].

El desarrollo de las células NK humanas se da a través de una serie de estadios que parten de un progenitor de linfocitos común (CLP) en donde se aprecia una pérdida en la expresión CD34 mientras que comienza a adquirirse la expresión de CD56 [6],[7]. La adquisición de CD94 marca el compromiso con la etapa brillante CD56, y las células NK CD56<sup>brillantes</sup> se diferencian posteriormente en células NK CD56<sup>dim</sup> que se enriquecen en la expresión de CD16 y de los receptores de tipo inmunoglobulina de células NK (KIR) [8].



Las células NK contienen un número abundante de gránulos los cuales son ricos en enzimas líticas como las granzimas además de perforina [9],[10],[11]. La liberación del contenido de estos gránulos, permite a las células NK inducir la apoptosis de la célula blanco a través de un mecanismo que se conoce como citotoxicidad natural [12][13]. Las células NK expresan en su superficie una serie de receptores que están codificados por genes de línea germinal. Cada uno de estos receptores puede, tanto estimular como inhibir las funciones efectoras de estas células como son la citotoxicidad y la secreción de citocinas[13],[14]. Debido a que las células NK son capaces de reconocer y eliminar células blanco sin la necesidad de un reconocimiento previo, se consideran células del sistema inmune innato [13],[14].

## **2.2 Mecanismos de activación de las células NK**

Las células NK junto con los linfocitos CD8+ T citotóxicos (CTLs), representan las dos principales poblaciones de ejercer una respuesta citotóxica que tiene como resultado la apoptosis de células estresadas como son la células tumorales o aquella infectadas por virus [15]. Sin embargo, a diferencia de las CTLs, las cuales requieren de recibir un estímulo previo para poder adquirir la expresión de varios elementos de la maquinaria citotóxica, las células NK están “armadas” con la maquinaria necesaria para poder desplegar su potencial citotóxico sin la necesidad de recibir un estímulo previo [16]. Aparte de esta diferencia, las células NK y las CTL comparten una serie de mecanismos celulares a través de los cuales se orquesta su capacidad de poder eliminar células blanco. A groso modo, estos eventos incluyen la adhesión celular; la convergencia de vesículas líticas y su polarización; así como la exocitosis o desgranulación de proteínas líticas [17]. Cada uno de estos eventos son críticos durante la respuesta citotóxica y están regulados por una serie de proteínas de superficie así como por proteínas intracelulares. Por otro lado, si alguno de estos eventos llegara a fallar, la capacidad citotóxica se puede ver comprometida, lo que provoca que las células NK o CTL no puedan eliminar adecuadamente a las células blanco[17].

Las distintas funciones efectoras que son mediadas por las células NK están reguladas y coordinadas por diferentes proteínas de superficie celular conocidas como inmunoreceptores[18][19]. Las funciones efectoras de las células NK no están reguladas por un solo receptor, como es en el caso de los linfocitos T, cuya activación está principalmente regulada por el receptor de células T o TCR, sino que exhiben un repertorio de receptores que pueden tanto activar como restringir la activación de las células NK[20]. Por lo tanto, una regulación entre las señales que emanan de las regiones citoplasmáticas de ambas clases de receptores determina si las células NK podrán ejercer su potencial citotóxico hacia las células blanco.[21] De acuerdo a este esquema de activación, la interacción de un mayor número de receptores de activación con sus ligandos respecto a las de los receptores de inhibición favorecerá una respuesta citotóxica y por el contrario, una mayor interacción de los receptores de inhibición con sus ligandos, respecto a los de activación favorecerá una restricción de la activación de las células NK[21],[22].

### **2.3 Receptores de inhibición**

Los receptores de inhibición fueron los primeros en ser identificados como importantes para regular la función de las células NK, por lo que procedimos primero a su descripción[23]. Los principales receptores de inhibición que se expresan sobre la superficie de las células NK son los que se agrupan en la familia KIR (del inglés NK Immunoglobulin-like Receptor), los cuales reconocen como ligando a las moléculas del MHC-I (del inglés, Major Histocompatibility Complex), también conocidas como HLA-I en humanos (del inglés, Human Leukocyte Antigen I)[24]. Las moléculas de MHC-I se expresan sobre la superficie de todas las células nucleadas y su expresión sobre la membrana plasmática protege a las células de ser atacadas por las células NK, ya que la interacción entre receptores KIR y las moléculas de MHC clase I, resulta en la generación de señales intracelulares que van a restringir la activación de las células NK y por ende no podrán desplegar su función citotóxica en contra de las células blanco que expresan abundantemente moléculas de MHC clase I en su superficie[25],[26]. La capacidad de los receptores KIR para restringir la

activación de las células NK depende de su interacción con la fosfatasa SHP-1, la cual es reclutada a una secuencia conservada de la que destacan residuos de tirosina que son fosforilados y que lleva por nombre secuencia ITIM (por sus siglas en inglés) La interacción de SHP-1 con la región citoplasmática de los receptores KIR permite que SHP-1 se fosforile, lo cual a su vez conduce a su activación[28]. Una vez activada la fosfatasa puede mediar la desfosforilación de varios sustratos casacada abajo. Se ha demostrado que uno de los principales sustratos de la proteína SHP-1, es Vav1, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina, la cual es una proteína que está involucrada en reorganizar el citoesqueleto de actina, lo cual es fundamental para la formación de una estructura molecular denominada sinapsis inmunológica, esta a su vez será crucial para organizar la serie de eventos que están implicados para mediar la desgranulación de perforina y granzimas entre otras serie de eventos celulares. SHP-1 promueve la inactivación de Vav1 removiendo grupos fosfatos presentes en esta proteína[29]. Por lo tanto, la inactivación de Vav1 por SHP-1 bloquea todas las vías de señalización río abajo que acontecen a través de esta proteína.

Además de los receptores inhibitorios que pertenecen a la familia KIR, las células NK expresan otra serie de receptores que pueden inhibir las funciones de las células NK. Entre estos se encuentra al receptor NKG2A el cual pertenece a la familia NKG2 (del inglés NK group 2), la cual además está constituida por receptores de activación[29]. Los receptores de la familia NKG2 son un grupo de receptores que son similares a las lectinas de tipo C, forman dímeros con la molécula CD94 y presentan una cualidad en común ya los tres miembros de esta familia (NKG2A/C/D) reconocen a la molécula HLA-E, una molécula de HLA-I no clásica. NKG2A, el único miembro de la familia que es capaz de mediar señales de inhibición, presenta una región carboxilo terminal larga la cual presentan varios motivos ITIM (por sus siglas en inglés Inmunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) los cuales funcionan como sitios de reclutamiento y activación para la fosfatasa SHP-1[30]. Se ha demostrado que la expresión de la molécula NKG2A parece ser muy abundante durante los estadios más tempranos de maduración de las células NK, sin embargo, su expresión se reduce de manera significativa durante los estadios finales de diferenciación, lo

cual, impacta en la capacidad citotóxica de las células NK terminalmente diferenciadas[30].

Las células NK también expresan a otros receptores que restringen su capacidad citotóxica. Entre estos se encuentran los receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina (LILR, por sus siglas en inglés) o CD85, los cuales, también reconocen como ligando a moléculas del MHC-I. Dentro de estos, se encuentran receptores con funciones de activación o de inhibición[30]. Particularmente los receptores LILRB, CD85J, CD85D, CD85A, CD85K y CD85C presentan en su región citoplasmática varios motivos ITIM que son capaces de reclutar y activar a las fosfatasas SHP-1 y/o SHP-2, por lo que pueden mediar señales que restringen la activación de las células NK[31].

Actualmente se desconocen en detalle los mecanismos celulares y moleculares por lo cuales todos estos receptores son capaces de restringir la función de las células NK, aunque se sugiere que todos ellos deberían inhibir un evento muy temprano en las vías de señalización que son generadas a partir de los receptores de activación. Por otro lado, también se desconoce la serie de eventos celulares que son modulados por los receptores de inhibición[31].

## **2.4 Receptores de activación**

Como se mencionó anteriormente, la activación de las células NK resulta de una fina regulación entre las señales de inhibición y de activación que resultan de la interacción de los respectivos receptores con sus ligando. La mayoría de los receptores de activación en las células NK se expresan de manera constitutiva, sin embargo, su expresión puede modularse durante el proceso de activación celular[31],[32]. Así mismo, el ambiente de citocinas también puede afectar el perfil de expresión de estos receptores. La función de estos receptores de activación es incidir sobre la distinta serie de eventos celulares que son requeridos para que las células NK puedan no solo desplegar sus funciones efectoras sino para regular los distintos fenómenos en los que participan como son la secreción de citocinas inflamatorias, proliferación, adhesión y diferenciación celular[32].

Al igual que los receptores de inhibición, los receptores de activación de células NK están codificados en la línea germinal. Los primeros receptores de activación en ser descritos fueron los receptores de citotoxicidad natural (NCR, por sus siglas en inglés), un grupo de receptores transmembranales integrados por NKp46, NKp44 y NKp30 entre otros[32]. La función de estos receptores depende en gran medida de su capacidad de asociarse con la cadena gamma común del receptor Fc o a través de las cadenas  $\zeta$ . Tanto la cadena gamma común y la cadena  $\zeta$ , ejercen la función de proteínas adaptadoras, ya que por sí solas carecen de actividad enzimática[33]. Lo anterior quiere decir que estas proteínas están involucradas en mediar el reclutamiento y activación de varias proteínas efectoras cascada abajo. Esta capacidad depende de la presencia de una secuencia de aminoácidos muy conservada de la cual destacan dos residuos de tirosina que son potencialmente fosforilables. Esta secuencia se conoce como ITAM (por sus siglas en inglés, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)[34]. Los receptores de citotoxicidad natural reconocen diversos ligandos que van desde diferentes proteínas de origen viral y tumoral hasta moléculas solubles, por lo tanto, son capaces de regular considerablemente la capacidad citotóxica de las células NK[34][35].

Adicionalmente a los receptores de citotoxicidad natural previamente descritos, las células NK expresan otra serie de receptores de activación que pertenecen a otras familias. Ejemplos de estos son los receptores NKG2C y NKG2D, los cuales pertenecen al grupo 2 de NK. Al igual que los NCR, ambos receptores se encuentran asociados de manera no covalente con una serie de proteínas adaptadoras conocidas como DAP-10 o DAP-12, los cuales presentan en su región citoplasmática un dominio YINM y un dominio ITAM respectivamente. NKG2D se expresa en la mayoría de las células NK y reconoce distintos ligandos como son las moléculas MIC-A (del inglés, MHC class I chain-related protein A) y MIC-B, cuya expresión en la superficie de las células blancas se induce como consecuencia de estrés celular[35]. Además de estos ligandos, NKG2D también reconoce a las proteínas ULBP1 (del inglés, UL16-binding protein 1), ULBP2, ULBP3 y ULBP4 [69], las cuales son expresadas por células cancerosas como las leucemias, carcinomas o melanomas. La diversidad de ligandos que son reconocidos por el receptor NKG2D, lo colocan como uno de los receptores con

mayor impacto durante el reconocimiento de células cancerosas por parte de las células NK[35].

## **2.5 Receptores de la Familia SLAM**

Los receptores de la familia SLAM son glicoproteínas transmembranales de tipo I que se expresan en células de origen hematopoyético [36]. Esta familia está conformada por los receptores SLAM (CD150), 2B4 (CD244), SLAMF7 (CD319), Ly9 (CD229), NTBA (CD352, Ly108 en ratón) y CD84 [36][37]. Todos ellos pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas por lo que presentan dos o cuatro dominios I tipo de las inmunoglobulinas. Además de presentar solo un dominio transmembranal, los miembros de la familia SLAM contienen en su región citoplasmática una secuencia conocida como ITSM [37]. Una de las características de estos receptores es que todos ellos participan en interacciones hemofílicas, es decir, un receptor reconoce como ligando a otra molécula del mismo tipo expresada en una célula adyacente o célula blanco. Por ejemplo, el receptor SLAMF7 reconoce como ligando a SLAMF7. La única excepción es el receptor 2B4, el cual reconoce como ligando a CD48 [37],[38]. En consecuencia, los receptores son activados bajo el contexto de las interacciones que se establecen entre las diferentes células hematopoyéticas[38].

La identificación del gen causante del síndrome linfoproliferativo de tipo I, dio pauta al descubrimiento de la proteína adaptadora SAP y su importancia en regular la función de los receptores de la familia SLAM. Adicionalmente, los fenotipos descritos en ratones deficientes en varios miembros de la familia SLAM ha permitido demostrar que los receptores SLAM regulan numerosos eventos celulares dentro del sistema inmune. Estos eventos van desde el desarrollo, supervivencia, adhesión y activación celular, los cuales están implicado en regular distintas respuestas efectoras como son la fagocitosis, citotoxicidad natural, el cambio de isotipo, o distintas respuestas efectoras mediadas por linfocitos T [36][38].

Los receptores SLAM señalizan a través de su asociación con las proteínas adaptadoras de la familia SAP [38]. En humanos, esta familia está formada por dos miembros que son SAP (del inglés SLAM-Associates Protein) y EAT-2 (del inglés, Ewing's sarcoma-associated transcript-2) y al igual que los receptores de la familia SLAM, su expresión está restringida al sistema hematopoyético. Ambos miembros de esta familia se conforman de tan solo 132 aminoácidos, dentro del cual se incluye un dominio SH2 y una región carboxilo terminal de 23 aminoácidos[39]. Se ha demostrado que la interacción entre los receptores SLAM y las proteínas SAP está mediada por las cinasas de la familia Src, las cuales, inducen la fosforilación de las tirosinas presentes en los motivos ITSM, lo favorece el reclutamiento de SAP y EAT-2 a través del dominio SH2. SAP y EAT-2 presentan una homología del 47%, asimismo, cada una de estas proteínas presentan características específicas. Por un lado, SAP presenta una arginina en la posición 78 que es esencial para asociarse con la cinasa de tirosinas Fyn y así promover la activación en las células inmunes. En contraste, EAT-2 presenta una región carboxilo terminal, un par de residuos de tirosina, una en la posición 120 y la otra en la posición 127. Ambos residuos pueden ser potencialmente fosforilados y se piensa que esto les permite asociarse con proteínas efectoras cascada abajo[30],[39].

Como se mencionó anteriormente, las proteínas adaptadoras de la familia SAP juegan un papel importante en acoplar a los receptores de la familia SLAM con promover señales de activación. Adicionalmente, también se ha demostrado que, en ausencia de expresión de las proteínas adaptadoras, los receptores de la familia SLAM pueden transducir señales, solo que, en contraste a las mediadas en presencia de las proteínas adaptadoras de SAP, éstas son señales de inhibición. Se sabe que en ausencia de las proteínas de la familia SAP, los receptores de la familia SLAM puede reclutar y activar a las fosfatasa SHP-1 y SHIP-1, en donde la primera es una fosfatasa de residuos de tirosina mientras que la segunda lo es de fosfolípidos[39].

Por otro lado, se ha reportado que alteraciones en alguna de las proteínas de la familia SLAM o SAP pueden afectar la función efectora de las células inmunes y conducir al desarrollo de ciertas patologías [38],[39]. De manera notable, mutaciones en el gen que codifica para la proteína SAP (SH2D1A), resulta en

una inmunodeficiencia asociada al cromosoma X (XLP1, X-linked lymphoproliferative disease). Esta alteración conlleva a una susceptibilidad a infecciones por el virus de Epstein Barr y el desarrollo de un síndrome linfoproliferativo, un desorden inmune catalogado como una inmunodeficiencia primaria [39], [40]. Los sujetos que presentan mutaciones en el gen SH2D1A son incapaces o poco capaces de generar (si es que se llega a generar) la proteína SAP. El virus de Epstein Barr (EBV, por sus siglas en inglés) infecta linfocitos B maduros, sin embargo, en sujetos sanos inmunocompetentes, las células T CD8+ y las células NK eliminan eficientemente a estas células infectadas. No obstante, sujetos que desarrollan mutaciones en el gen SH2D1A presentan una citotoxicidad celular reducida, en consecuencia, desarrollan linfocitosis[41]. Posteriormente, esas células pueden infiltrarse en la médula ósea, favoreciendo el desarrollo de otras patologías como HLH (del inglés, hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome), otro trastorno de inmunodeficiencia grave que se presenta principalmente en la infancia []. La existencia de este tipo de patologías dio pauta para estudiar a SAP de una manera más detallada, y se demostró que está involucrada en los procesos de adhesión celular. En consecuencia, la ausencia de SAP compromete el proceso de adhesión celular [36][41]. Recordemos que un evento esencial para la eliminación de células blanco es la adhesión celular, por lo que una incapacidad para formar conjugados celulares puede evitar la respuesta inmune celular y como resultado, conducir al desarrollo de infecciones patológicas [36]. En relación con lo anterior, y con la finalidad de estudiar a estas proteínas de manera más específica, se generaron distintos modelos celulares y animales que han permitido conocer los diversos eventos que se encuentran regulados por los receptores SLAM y las proteínas SAP. Interesantemente, estos modelos permitieron demostrar que, en ausencia de SAP, EAT-2 y/o ERT, los receptores SLAM se convierten en receptores con potentes efectos de inhibición. En consecuencia, el contexto ambiental durante el entrecruzamiento de los receptores SLAM determina si estos receptores promueven activación o inhibición en las células inmunes [36], [37], [41]. Así mismo, estos modelos también permitieron reproducir el fenotipo observado en sujetos con mutaciones en el gen SH2D1A. En ese contexto, la ausencia de la proteína SAP (modelos murinos knockout), reduce de manera significativa la capacidad citotóxica de las células NK [37], [42]. Actualmente, se sabe que los



mecanismos moleculares a través de los cuales los receptores de la familia de SLAM promueven señales de inhibición, parecen ser a través del reclutamiento de las fosfatasas SHP-1, SHP-2 o SHIP-1, moléculas que al presentar dominios SH2 también pueden ser reclutadas por las tirosinas fosforiladas de los motivos ITSM [36], [42]. Así mismo, también se ha propuesto que la cinasa Csk (del inglés, C-terminal Src kinase) puede estar siendo reclutada a los motivos ITSM. Csk promueve la fosforilación de proteínas de la familia Src en la región carboxilo terminal lo cual genera un cambio conformacional de la proteína blanco y su consecuente inactivación, de esta manera, regula negativamente la activación de las células inmunes. Sin embargo, aún se requieren estudios futuros para corroborar de manera contundente estas hipótesis[42]. Por otro lado, lo que sí está claro es que para que los receptores SLAM medien señales de inhibición, las proteínas de la familia SAP no deben estar presentes. Por lo tanto, las proteínas adaptadoras de la familia de SAP han sido clasificadas no solamente como proteínas que promueven señales de activación celular, si no también, como interruptores moleculares que desacoplan a los receptores SLAM de promover señales de inhibición[43]. Aun con todo el trabajo que demuestra el papel esencial de los receptores SLAM y las proteínas de la familia de SAP en células inmunes, conocemos relativamente poco sobre la contribución individual exacta de la mayoría de los receptores SLAM en cada una de las diferentes células humanas[36],[43].

Tabla 1. Clasificación y nomenclatura de los miembros de la familia SLAM [18].

Miembros típicos de la familia	Miembros de la familia atípicos
SLAMF1 (CD150)	SLAMF2 (CD48)
SLAMF3 (Ly-9 o CD229)	SLAMF8 (CD353)
SLAMF4 (2B4 o CD244)	SLAMF9 (SF2001 o CD84H)
SLAMF5 (CD84)	
SLAMF6 (Ly108, NTB-A o SF2000)	
SLAMF7 (CRACC, CD319 o CS1)	

## 2.6 SLAMF7

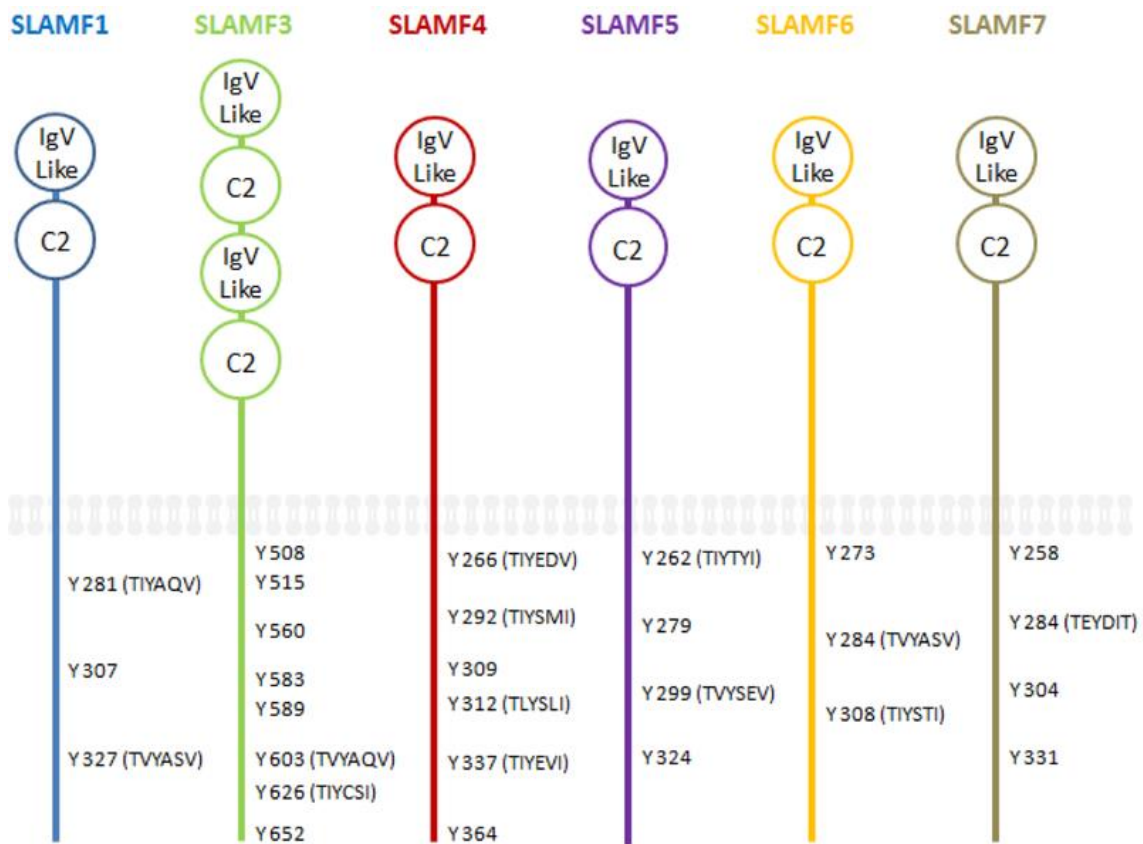
SLAMF7 también conocido como CRACC (del inglés, CD2- like receptor activating cytotoxic cells) o CS1, es un receptor presente en células citotóxicas tanto en ratón como en humano. SLAMF7 es un receptor capaz de promover un aumento en la capacidad citotóxica de las células NK [43],[44],[45]. Recientemente se han descrito los mecanismos celulares por los cuales SLAMF7 promueve la activación de las células NK. Por otro lado, también se ha demostrado que, en ausencia de EAT-2, pero no de SAP, SLAMF7 promueve señales inhibitorias, reprimiendo la capacidad citotóxica de las células NK. Lo anterior indica que SLAMF7 es receptor que puede promover tanto señales de activación como de inhibición. Sin embargo, se desconocen los mecanismos celulares y moleculares por los cuales este receptor inhibe o restringe la función citotóxica de las células NK[45].

La función de SLAMF también se ha descrito en otras células del sistema inmune, tanto adaptativo como innato. Por ejemplo, la función de SLAMF7 se ha explorada en linfocitos T murinos, células que no expresan EAT-2, y se ha demostrado que su entrecruzamiento conlleva a una inhibición de la proliferación celular y la producción de citocinas como IL-2, una citocina relacionada a

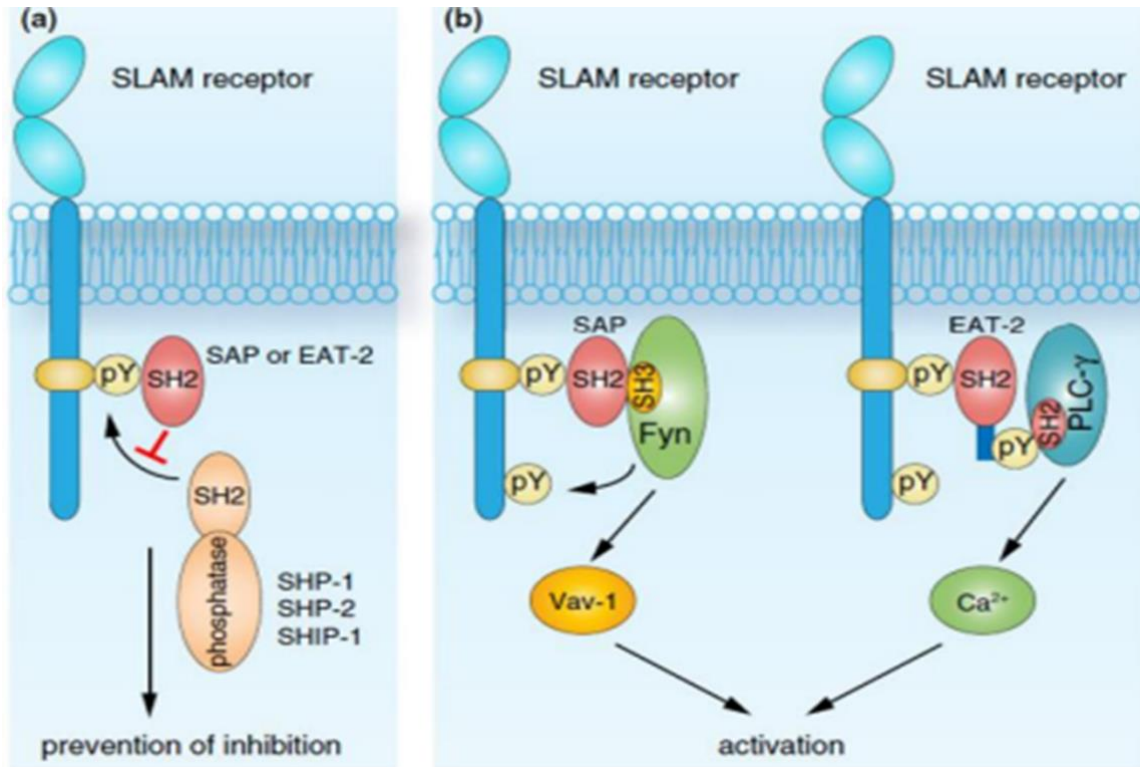
sobrevida y proliferación [44],[45]. También, se ha sido sugerido que el entrecruzamiento de SLAMF7 promueve una mayor citotoxicidad en células T CD8+ de origen humano, sin embargo, todo indica que las células T CD8+ no expresan EAT-2, por lo cual, se requieren mayores estudios en células T que ayuden a corroborar estas discrepancias. Por otro lado, en linfocitos B humanos, se ha reportado que SLAMF7 induce proliferación celular y producción de citocinas, sin embargo, se desconoce si estas funciones son o no dependientes de EAT-2, pues parece ser que las células B expresan el transcrito de EAT-2, pero la proteína no parece llegar a generarse. Finalmente, SLAMF7 también ha sido estudiado en otra célula del sistema inmune innato, a saber, en los macrófagos, las células residentes de tejido capaces de reconocer y eliminar una amplia variedad de agentes patógenos y células tumorales[45].

En lo que a eso respecta, se sabe que uno de los receptores que regula de manera importante la activación de los macrófagos es la molécula SIRP (del inglés, signal regulatory protein)- $\alpha$ , un receptor que inhibe la capacidad del macrófago para fagocitar. Interesantemente, se ha demostrado que el simple hecho de bloquear la interacción de SIRP- $\alpha$  con su ligando (CD47), favorece de manera significativa la capacidad de los macrófagos para fagocitar células tumorales. En ese mismo contexto, ha sido sugerido que la fagocitosis de células tumorales se potencia aún más cuando se involucra la participación de SLAMF7 durante la activación de los macrófagos[18],[45].

Las proteínas de la familia SLAM se consideran parte de la superfamilia de la siguiente manera:



*Figura 1* La estructura de los receptores típicos de la familia SLAM. Los receptores de la familia SLAM son glicoproteínas de tipo I que contienen dominios similares a Ig (IgV) aminotermiales, dominios de constante 2 (C2) proximal de membrana y tirosinas fosforiladas (Y), algunas de las cuales forman parte de motivos de cambio de tirosina inmunitaria (ITSM) secuencias (TxYxxV / I / L) [18].



*Figura 2* Influencia de las proteínas de SAP sobre los receptores SLAM (a) La activación de los receptores de la familia de SLAM promueven el reclutamiento de proteínas que presentan dominios SH2[36], particularmente se reclutan a las proteínas de la familia de SAP (SAP y EAT-2), y este reclutamiento favorece la activación de diferentes células inmunes[36][46]. Sin embargo, SAP y EAT-2 no solamente promueven la activación de los receptores SLAM, sino que también evitan el desarrollo de respuestas inhibitorias al desacoplar a estos receptores de otras proteínas que también presenten dominios SH2, por ejemplo, se ha propuesto que las fosfatasas SHP-1, SHP-2 o SHIP-1 también pudieran ser reclutadas[47]. (b) a través de su dominio SH2, SAP recluta a la cinasa Fyn, la cual es capaz de fosforilar a otras tirosinas presentes en el receptor, así como también a Vav-1. Por su parte, las tirosinas fosforiladas en la región carboxilo terminal de EAT-2 recluta a PLC- $\gamma$  esta última promueve flujos de calcio en células NK. Por lo tanto, EAT-2 ySAP promueven activación de células inmunes a través de distintos mecanismos[47]..

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células citotóxicas juegan un papel central en la inmunidad antiviral y antitumoral. El gran avance sobre el conocimiento científico en la biología de las células NK ha permitido posicionarlas como un blanco prometedor en la terapia

antitumoral. Sin embargo, aunque se han caracterizado muchos de los receptores de activación e inhibición, aún se desconocen los detalles moleculares y celulares, por los cuales estos regulan la inhibición de células NK. Por lo tanto, nuestro estudio se justifica en el hecho de conocer los modos de acción por los cuales SLAMF7 inhibe las funciones efectoras de las células NK.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los mecanismos por los que las SLAMF7 inhiben la función la función citotóxica de células NK?

#### **5. HIPÓTESIS**

SLAMF7 inhibe la función de las células NK a través de un mecanismo celular que es responsable de mediar la adhesión, polarización o desgranulación.

#### **6. OBJETIVOS**

##### **General**

Determinar los mecanismos celulares por los cuales SLAMF7 inhibe la función citotóxica de células NK.

##### **Específicos**

1. Establecer un modelo que nos permita elucidar los mecanismos celulares por los cuales SLAMF7 restringe la función citotóxica de las células NK.
2. Determinar la influencia de SLAMF7 en la adhesión de las células NK.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 Anticuerpos y citometría de flujo**

Los anticuerpos utilizados en este estudio incluyen anticuerpos de BioLegend: anti- CD319 (mSLAMF7) mouse (4G2, acoplado al fluorocromo PE), anti-CD54 humano (clona HA58, acoplado a Pacific Blue), Pacific Blue Mouse IgG1, k, Control isotipo (clona MOPC-21) anti-his Tag (clona J099B12). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro BD FACSCanto II, IBT, UNAM.

### **7.2 PCR en punto final**

Se amplificó una secuencia de DNA mediante ciclos repetidos de separación de cadenas y replicación del DNA. Para la preparación de la reacción se utilizaron los siguientes componentes, DNA (50 ng), dNTPS, primer F y R que fueron diseñados para amplificar mSLAMF7, buffer, MgCl, Enzima (Biotecmol) y H<sub>2</sub>O milli Q. Con las siguientes condiciones de 94°C ( 3min), 94°C (4 seg), 55°C (30 seg), 72°C(1 min), 72°C(7 min) y 4°C (∞) por 30 ciclos.

### **7.3 Análisis de DNA por electroforesis**

La PCR en punto final se corroboró mediante una electroforesis corriendo un gel de agarosa al 0.8%, utilizando un marcador de peso molecular, buffer de carga y la muestra de muestra reacción a 110 v por 1 hrs, la banda de amplificación para mSLAMF7 se observó en la orientación correcta en 1000 pb.

### **7.4 Construcción de la secuencia codificante de SLAMF7**

La secuencia codificante de SLAMF7 fue clonada en el vector pFB-GFP con los sitios de restricción para la enzima EcoRI, se hizo una fosforilación al inserto utilizando la enzima CIAP posterior a la fosforilación se purificó el inserto y vector por columna, se corroboró corriendo un gel de agarosa al 0.8% , se observaron las bandas linealizadas en la orientación correcta, seguido a esto se realizó la ligación del vector e inserto utilizando la relación V:6 e I:1 utilizando buffer, la enzima ligasa y H<sub>2</sub>O, una vez hecha la ligación tener 4 tubos con los componentes

se hizo la transformación de bacterias utilizando la cepa 1116 de E.coli, se plaquearon 500 uL de bacterias en 4 cajas con medio LB solido cada tubo a una placa teniendo en cuenta que el tubo 4 tenía mayor concentración de los componentes una vez realizado el protocolo se incubaron las placas de 3 a 5 horas, al día siguiente se guardaron las placas a 4°C antes para evitar que siguiesen creciendo las colonias, se mantuvieron ahí hasta que se picaron 10 colonias de la placa 4, para hacer el mini prep de las 10 colonias y obtener el plásmido de las colonias y posterior a eso hacer una digestión con EcoRI para ver cuantas clonas habían salido para el vector e inserto, el cual se obtuvieron 6 colonias positivas para vector e inserto.

### **7.5 Digestión con Hind III**

Se realizo una digestión con las 6 clonas positivas para inserto y vector mediante la enzima Hind III que corta el inserto la secuencia codificante mSLAMF7 en la posición #981 vector pFB-GFP con los sitios de restricción para la enzima EcoRI, solo una clona resulto con la orientación correcta, se observaron las bandas linealizadas en la orientación correcta, posteriormente con el plásmido de la clona en la orientación correcta se realizó el maxi prep para obtener el plásmido más concentrado.

### **7.6 Cultivo de línea celular HeLa**

La línea celular HeLa fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco™ Advanced DMEM Medium) suplementado con 5 % de suero fetal bobino, L-glutamina, estreptomicina y penicilina. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en un ambiente humidificado 36 y 5 % de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono). El conteo de células y la viabilidad se realizó en cámara de Neubauer utilizando azul de tripano (Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4%) como colorante de viabilidad celular.

### **7.7 Transfección directa con lipofectamina 2000 (Invitrogen™)**

Para la expresión de SLAMF7 (ligando de SLAMF7) en la línea celular HeLa, se usó el vector retroviral pFB-GFP (addgene), un vector bicistrónico que codifica para la proteína verde fluorescente, GFP (green fluorescent protein). La



secuencia codificante de SLAMF7 fue clonada en el vector pFB-GFP con los sitios de restricción para la enzima EcoRI. Una vez generada la construcción y analizada por restricción y secuenciación, el plásmido fue transfectado en la línea celular HeLa.

Brevemente, en placas de 60 mm para cultivo celular se plaquearon 1.5 millones de células HeLa y se incubaron toda la noche, al día siguiente, el sobrenadante de las células se reemplazó por medio nuevo y fueron transfectadas con 10 µg de DNA plasmídico que se obtuvo del Maxi prep, según correspondía (SLAMF7 en pFB-GFP para la expresión de SLAMF7), la transfección se realizó utilizando medio OPTI-MEM (Gibco™) y 10 µg de lipofectamina 2000 (Invitrogen™) para cada condición. A los 5 días de la transfección se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo. Las células HeLa positivas para GFP fueron crecidas a una densidad suficiente y sorteadas por citometría de flujo en base a la positividad para GFP, el sorting se realizó utilizando el citómetro BD FACSAria III (BD Biosciences), a cargo del Dr. Ismael Mancilla en el Instituto Nacional de Perinatología.

### **7.8 Infección retroviral**

Para la expresión de SLAMF7 (ligando de SLAMF7) en la línea celular HeLa, se usó el vector retroviral pFB-GFP (addgene), un vector bicistrónico que codifica para la proteína verde fluorescente, GFP (green fluorescent protein). La secuencia codificante de SLAMF7 fue clonada en el vector pFB-GFP con los sitios de restricción para la enzima EcoRI. Una vez generada la construcción y analizada por restricción y secuenciación, el plásmido fue transfectado en la línea celular Phoenix (línea celular empacadora de virus) para generar las partículas virales infectivas.

Brevemente, en placas de 60 mm para cultivo celular se plaquearon 1.5 millones de células Phoenix y se incubaron toda la noche, al día siguiente, el sobrenadante de las células se reemplazó por medio nuevo y fueron transfectadas con 10 µg de DNA plasmídico según correspondía (pFB-GFP para el vector vacío y SLAMF7 en pFB-GFP para la expresión de SLAMF7), la transfección se realizó utilizando medio OPTI-MEM (Gibco™) y 10 µg de lipofectamina 2000 (Invitrogen™) para cada condición. Las células transfectadas fueron incubadas

una noche a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, al día siguiente, el sobrenadante de las células Phoenix fue retirado y remplazado por medio RPMI nuevo y completo, después de 24 horas, el sobrenadante fue recuperado y filtrado (0.45 µm). Este sobrenadante (con las partículas infectivas) fue utilizado para transducir las células HeLa, se utilizaron 500 mil células HeLa para la transducción, se realizaron dos rondas de infección retroviral usándose 2 ml de sobrenadante filtrado para cada infección. A los 5 días posinfección se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo. Las células HeLa positivas para GFP fueron crecidas a una densidad suficiente y sorteadas por citometría de flujo en base a la positividad para GFP, el sorting se realizó utilizando el citómetro BD FACSAria III (BD Biosciences), a cargo del Dr. Ismael Mancilla en el Instituto Nacional de Perinatología.

### **8.1 Lisis Celular Especifica**

Las células NK o las células YT-S mSLAMF7 fueron incubadas con las células HeLa transducidas, HeLa SLAMF7- o HeLa SLAMF7+, a diferentes relaciones celulares. Las células HeLa ya eran GFP positivas, por lo que no fue necesario marcarlas nuevamente.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos fondo "V" en un volumen final de 200 µL. Una vez colocados los co-cultivos, la placa fue centrifugada a 500 rpm por 4 minutos para favorecer los contactos celulares. En seguida, la placa fue incubada por 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, las células fueron recuperadas en tubos para FACS y teñidas con una sonda fluorescente capaz de detectar a las células en estado apoptótico (Invitrogen™, LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit). Las células dobles 38 positivas (GFP+Violeta+), correspondieron a las células HeLa en estado apoptótico. Las muestras fueron adquiridas por la técnica de citometría de flujo.

## **8.2 Conjugados Celulares**

Para los conjugados celulares, las células YT-S mSLAMF7 fueron marcadas con la sonda Marcadas con la sonda cellTracer Orange a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  por 30 minutos a 37°C, todo en hielo y protegidas de la luz. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendida a 5 x 10<sup>5</sup> células por mL. Para el ensayo, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células NK-92 y se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  (2 x 10<sup>5</sup> células) de las células HeLa SLAMF7- o HeLa SLAMF7+. Inmediatamente fueron centrifugadas a 500 rpm por 3 minutos a 4 °C. En seguida, los co-cultivos fueron incubados por 0, 5, 10 o 20 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se recuperaron las muestras, se les dio un vórtex (1 segundo, velocidad máxima), y la reacción se detuvo con 300  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído frío al 0.5 %. Las muestras se colocaron a 4°C y fueron protegidas de la luz. Las muestras fueron adquiridas por citometría de flujo. El porcentaje de las células PE+GFP+ (dobles positivos, células YT-S mSLAMF7: células HeLa) representaron a los conjugados celulares.

## **8.3 Estadística de los resultados obtenidos**

Para el análisis estadístico usamos el software GraphPad Prisma version 8.0.1 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. Para determinar la diferencia estadísticamente significativa usamos la prueba una prueba t de Student. Un valor de  $p$  menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 Clonación de mSLAMF7 en el vector pFB-GFP**

Para obtener el inserto que corresponde al cDNA para SLAMF7 murino, se diseñaron un par primers (Forward y Reverse) los cuales contienen un sitio de restricción para EcoRI. Como vector se uso a pFB-GFP, el cual es un vector retroviral bicistrónico que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). El tamaño del amplicón o inserto es de alrededor de 1000 pares de bases (pb), el cual se clono en pFB-GFP usando sitios de restricción para EcoRI (Figura X). Para proceder a la ligación del inserto en el vector, se usa la una ligasa (Ligasa IV) la cual se incubo en un volumen de reacción de 20 uL totales en presencia de dos condiciones distintas, una en donde hay una relación vector: inserto de la 3 y en la otra de 1 a 9. La reacción se incubo toda la noche a 16 grados centígrados.

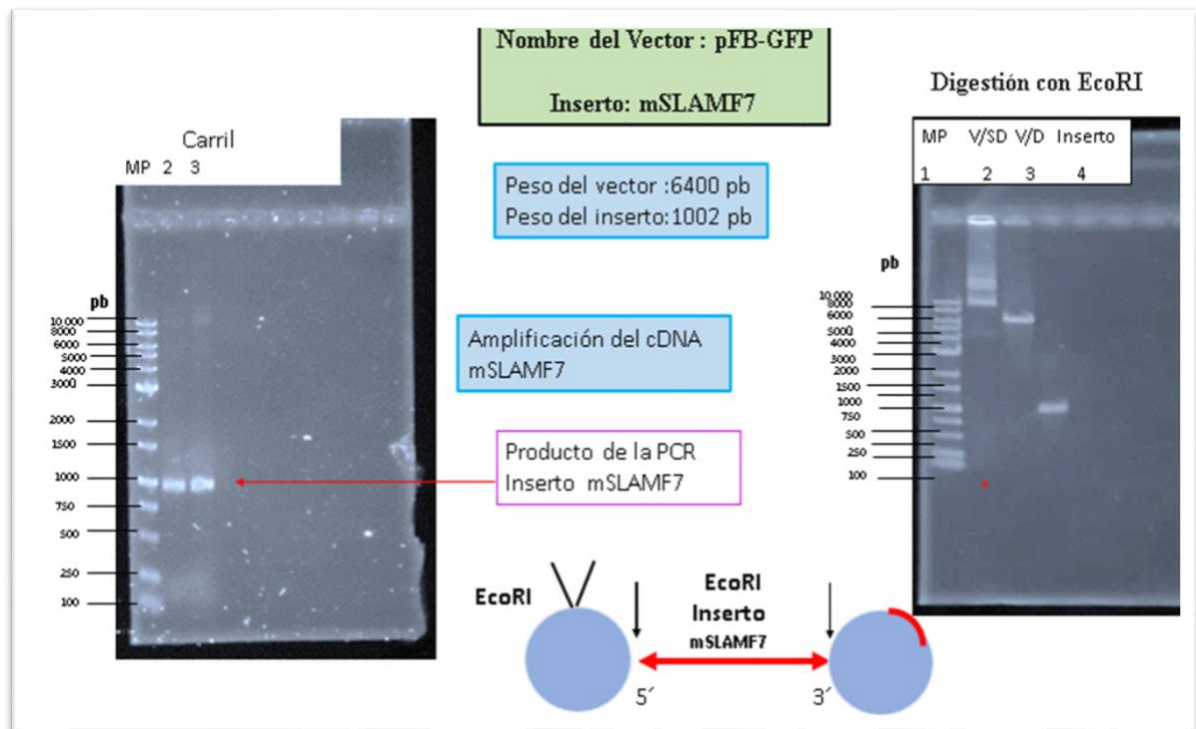
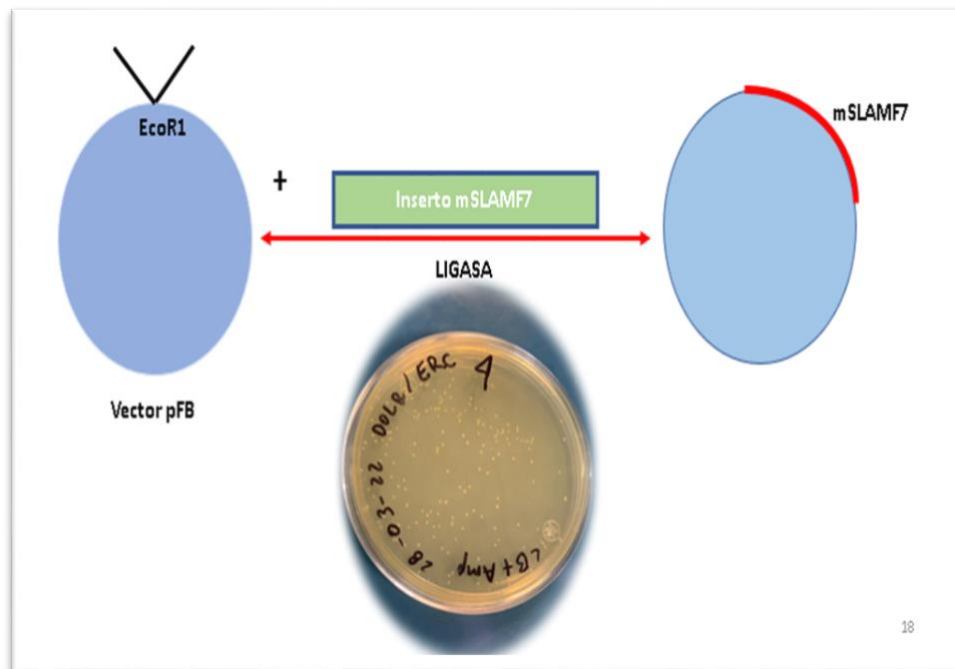


Figura 3 Digestión con EcoRI del inserto (mCracc) y vector (PFB-GFP). Se observa la linealización del vector e inserto digerido.

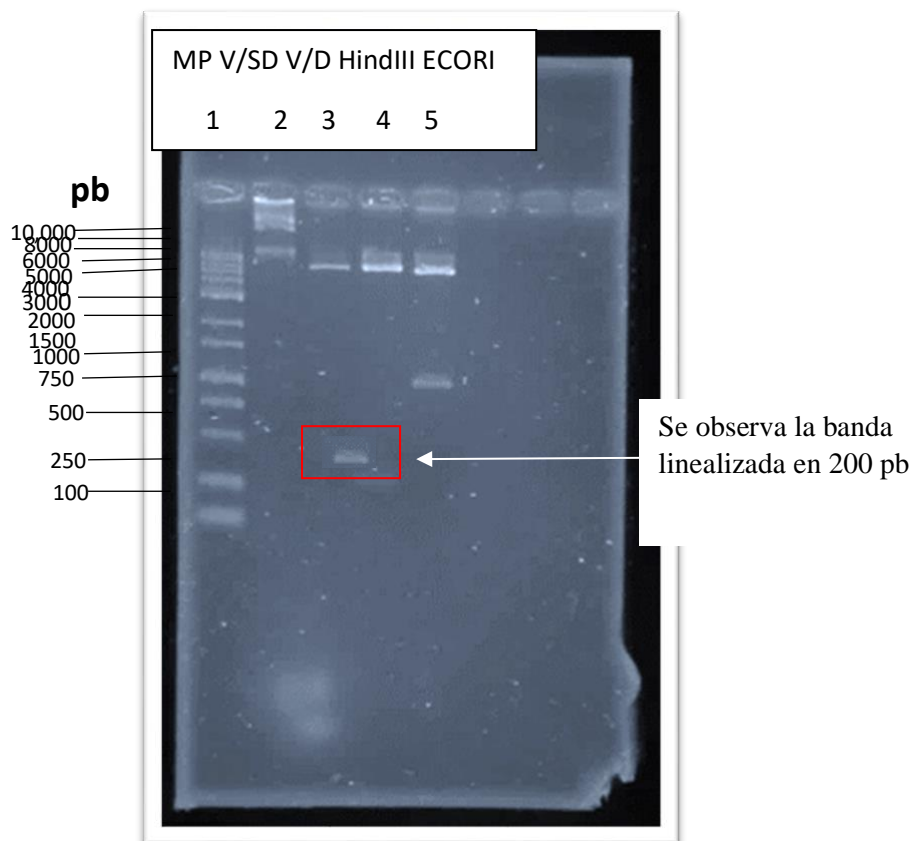
## 9.2 Transformación de bacterias competentes

Del producto de la ligación de uso un volumen de 10 uL, los cuales se incubaron con 100 uL de bacterias competentes (1316) en frío y por un tiempo de 45 minutos. Posteriormente las bacterias sufrieron un choque térmico al hacerlas pasar a una temperatura de 42 grados centígrados por dos minutos para luego ser regresadas a una temperatura de 4 grados centígrados. Finalmente, las bacterias se plaquearon una plaga de medio LB agar en presencia de 100 ug/ml de ampicilina. La placa se incubó a 37 grados centígrados toda la noche.



*Figura 4* Transformación de bacterias competentes, del producto de la ligación obtuvimos clonas positivas cuyo vector contenía el inserto.

Al día siguiente, Se tomaron 10 colonias de la caja de LB agar para crecerlas en 2 ml medio LB liquido en presencia de ampicilina 100ug/ml. Posteriormente se realizó un mini-prep de cada una las colonias para obtener el plásmido. Los plásmidos correspondientes de digirieron con EcoRI para comprobar la presencia del inserto. Al final, se obtuvieron 6 clonas positivas cuyo vector contenía el inserto. De las seis clonas positivas que se obtuvieron, solo una clona se insertó en sentido correcto. Lo anterior se dedujo de una digestión con HindIII, cuyo patrón de restricción en caso de una inserción en sentido correcto, debería dar lugar a la aparición de una banda de 200 pb. Se tomó esa única clona para hacer un maxi-prep y obtener suficiente cantidad de DNA para realizar los procedimientos posteriores (Figura 5).



*Figura 5 digestión con HindIII, se utilizó esta enzima, para corroborar que nuestra clona dio positiva tanto para nuestro inserto mSLAMF7.*

### **Infección Retroviral**

Para la infección retroviral se usó el vector pFB-GFP que contiene o no el cDNA que codifica para SLAMF7 de origen murino. El vector se transfecto en células Phoenix junto con el vector Vsv, el cual codifica para una glicoproteína requerida para la infección de las partículas virales. Las células Phoenix sirven como células empacadoras que van a producir partículas virales infectivas que contienen al vector pFB-GFP. Para la transfección de las células Phoenix se usó lipofectamina como se describe en materiales y métodos. 48 horas después de la transfección, se recuperó el sobrenadante para infectar a células HeLa con el vector vacío pFB-GFP o que contiene el inserto que codifica para SLAMF7. De 48 a 72 horas post-infección se analizó la expresión de GFP en células HeLa por citometría de flujo. Aquellas células que fueron positivas se aislaron por técnicas de citometría de flujo. La figura X, muestra la expresión de GFP en células HeLa

transfectadas con el vector vacío o con el vector que codifica para SLAMF7. Estos resultados sugieren la infección retroviral fue adecuada y que, en ambas condiciones de transfección, las células HeLa muestran una expresión estable de GFP después de ser purificadas por el citómetro.

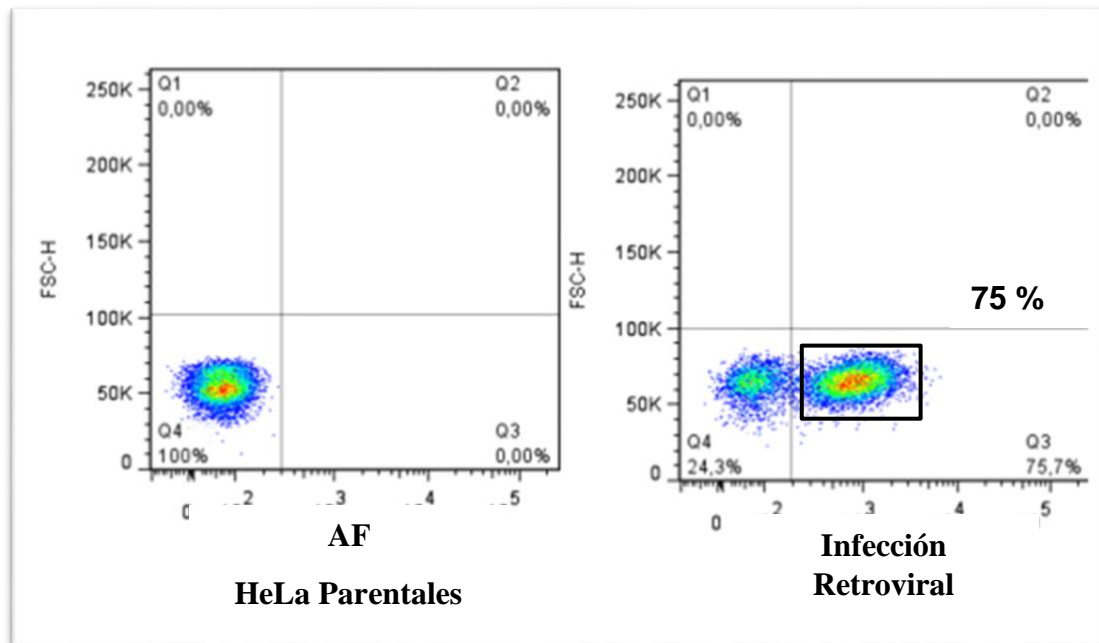


Fig 6 Infección Retroviral en células HeLa. Autofluorescencia HeLa parentales, segundo dot blot. Expresión del 75 % de GFP (proteína verde fluorescente) en células HeLa con infección Retroviral.

### 9.3 Expresión de mSLAMF7 en células HeLa

Para analizar la expresión de SLAMF7, las células HeLa transfectadas con el vector vacío o con el vector que además codifica para SLAMF7, se tiñeron con anticuerpo específico para SLAMF el cual además está acoplado con un fluorocromo. Como se observa en la figura X, solo las células que fueron transfectadas con el vector que contiene el inserto expresan SLAMF7 en contraste a las células que fueron transfectadas con el vector vacío.



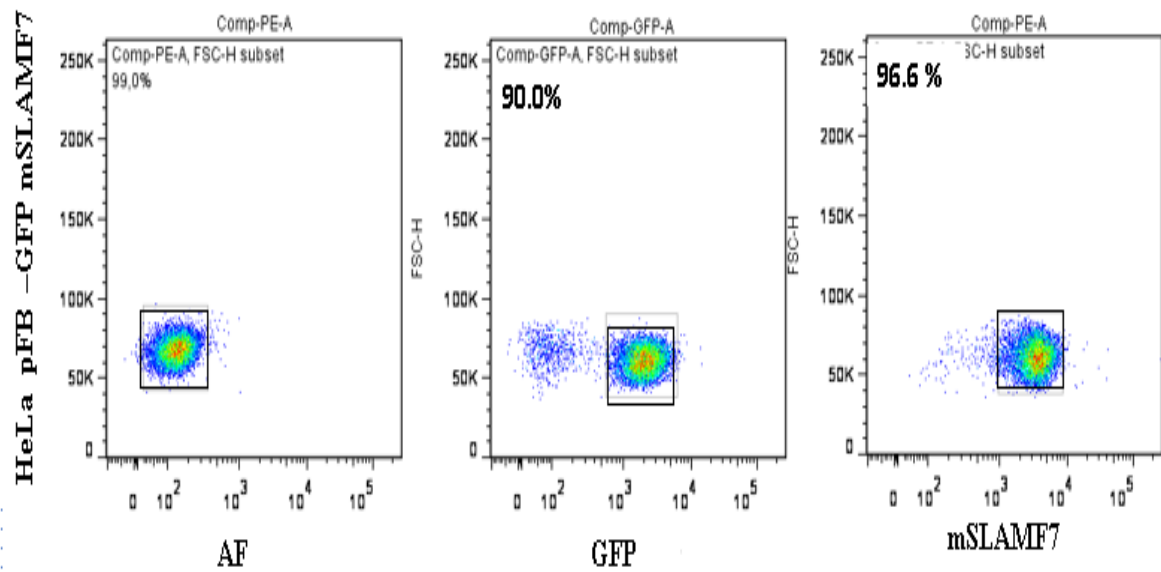
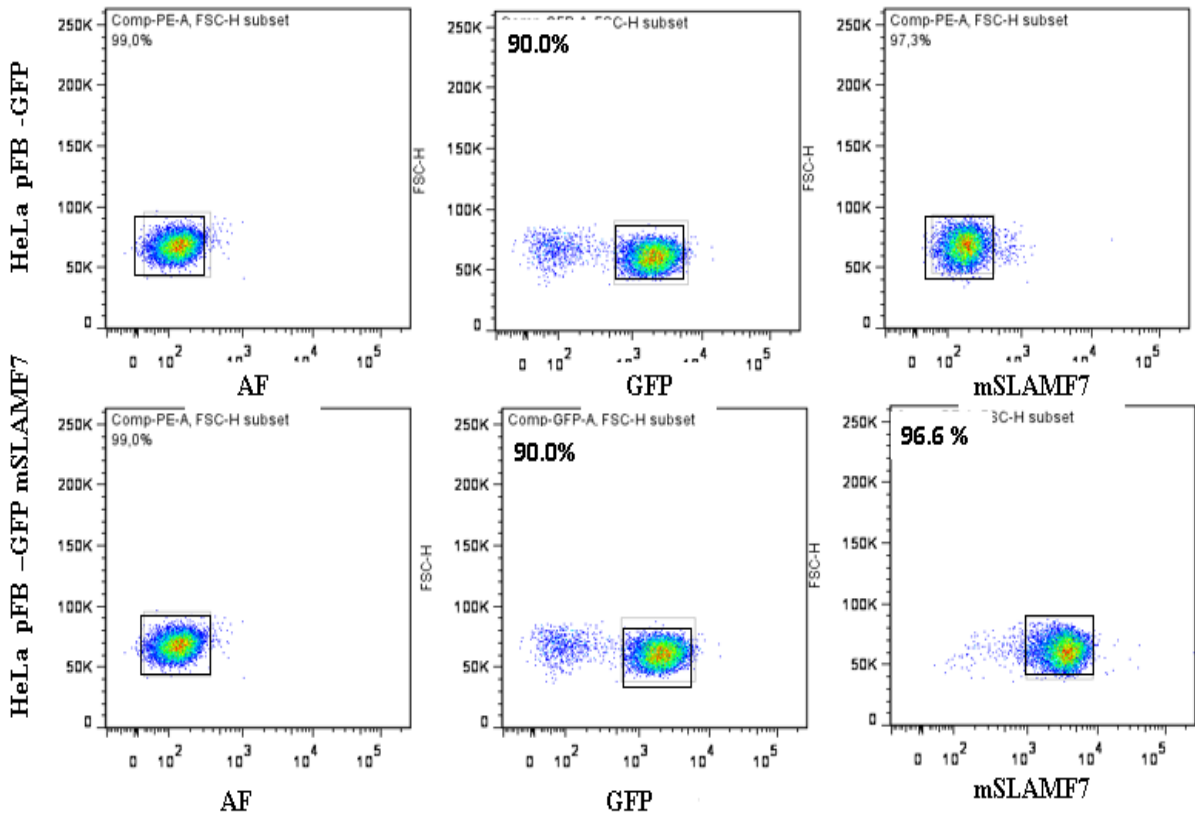
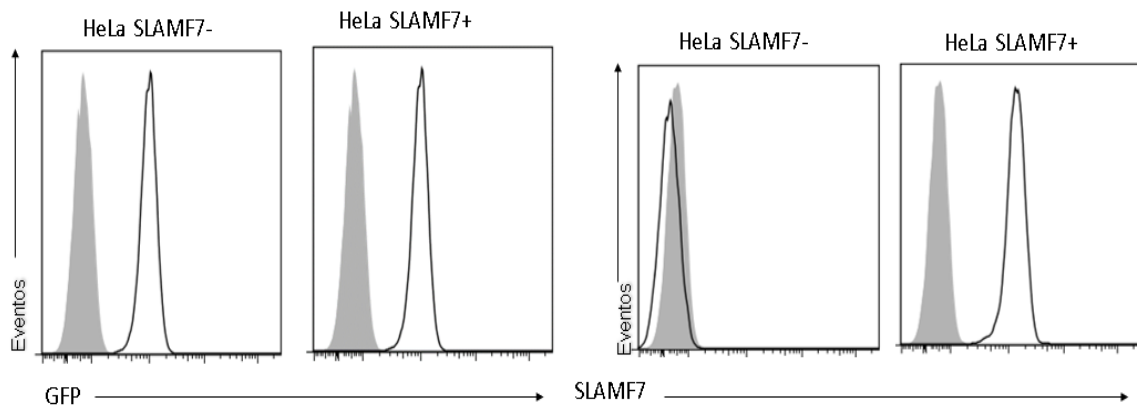


Figura 7 Expresión de *mSLAMF7* en células *HeLa*. En el primer Dot plot Autofluorescencia (*HeLa* parentales), segundo dot plot *HeLa* parentales contra *mSLAMF7*, tercer dot plot expresión del 75 % de GFP (proteína verde fluorescente) en células *HeLa* pFB-GFP *mSLAMF7*, en el cuarto dot blot *HeLa* *mSLAMF7* contra *mSLAMF7*, expresión de 78% de *mSLAMF7*.



*Figura 8 Tinción contra mSLAMF7 en células HeLa pFB-GFP y HeLa pFB-GFP mSLAMF7. Primer dot plot Autofluorescencia (HeLa parentales), segundo dot plot tanto para HeLa pFB-GFP y HeLa Pfb-GFP m SLAMF7, expresión del 90.0 % de GFP (proteína verde fluorescente), en el tercer dot plot HeLa pFB-GFP sin presencia de SLAMF7 ,en comparación con HeLa Pfb-GFP m SLAMF7 contra mSLAMF7, se obtuvo una expresión de un 96.6% de mSLAMF7.*



*Figura 9 En esta imagen se plasma la tinción contra m SLAMF7 y expresión de GFP en histogramas tanto para la línea HeLa pFB-GFP o HeLa pFB-GFP mSLAMF7.*

### **9.5 Expresión de mSLAMF7 en células YT-S**

En el laboratorio se cuenta con una línea celular de células NK, las YT-S, las cuales normalmente no expresan SLAMF7 pero que fueron transfectadas con una construcción que contiene el cDNA que codifica para esta proteína. Para corroborar la expresión de SLAMF7 murino en YT-S, las células se tiñeron con anticuerpo específico para SLAMF7 y el cual está acoplado a un fluorocromo. Como puede observarse en la figura X, las células YT-S que fueron transfectadas con la construcción correcta expresan SLAMF7 en contraste con la línea parental.

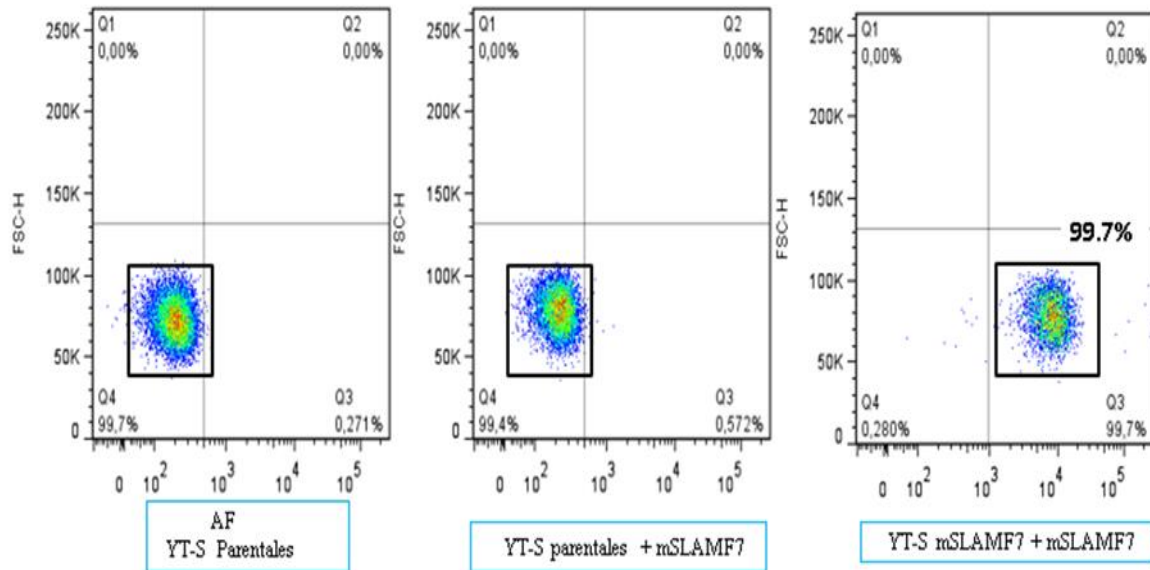


Figura 10 En esta imagen se plasma la tinción contra mSLAMF7, en células YT-S mSLAMF7.

### 9.6 Lisis celular específica con células YT-S mSLAMF7 HeLa pFB-GFP Y HeLa pFB-GFP mSLAMF7.

Para corroborar el efecto inhibitorio que promueve SLAMF7 en la ausencia de la proteína adaptadora EAT-2, se realizaron ensayos de lisis específica, los cuales consisten en incubar las células efectoras, en este caso las YT-S que expresan SLAMF7, con células blanco, en este caso con células HeLa que expresan o no SLAMF7, a diferentes relaciones como se muestra en la figura X. Nuestros datos muestran la expresión de SLAMF7 en la superficie de las células HeLa, promueve un efecto inhibitorio en células NK (YT-S) que es dependiente de la expresión de SLAMF7 comparado con células HeLa que no expresan SLAMF. Esta disminución en el porcentaje de lisis específica de células HeLa que expresan SLAMF7 respecto células HeLa parentales fueron significativas a las diferentes relaciones exceptuando la relación 1:1 (Figura 12). Estos resultados confirman que en ausencia de la proteína adaptadora EAT-2, SLAMF7 promueve señales que inhiben la función citotóxica de células NK.

### Lisis celular específica con tres ratios

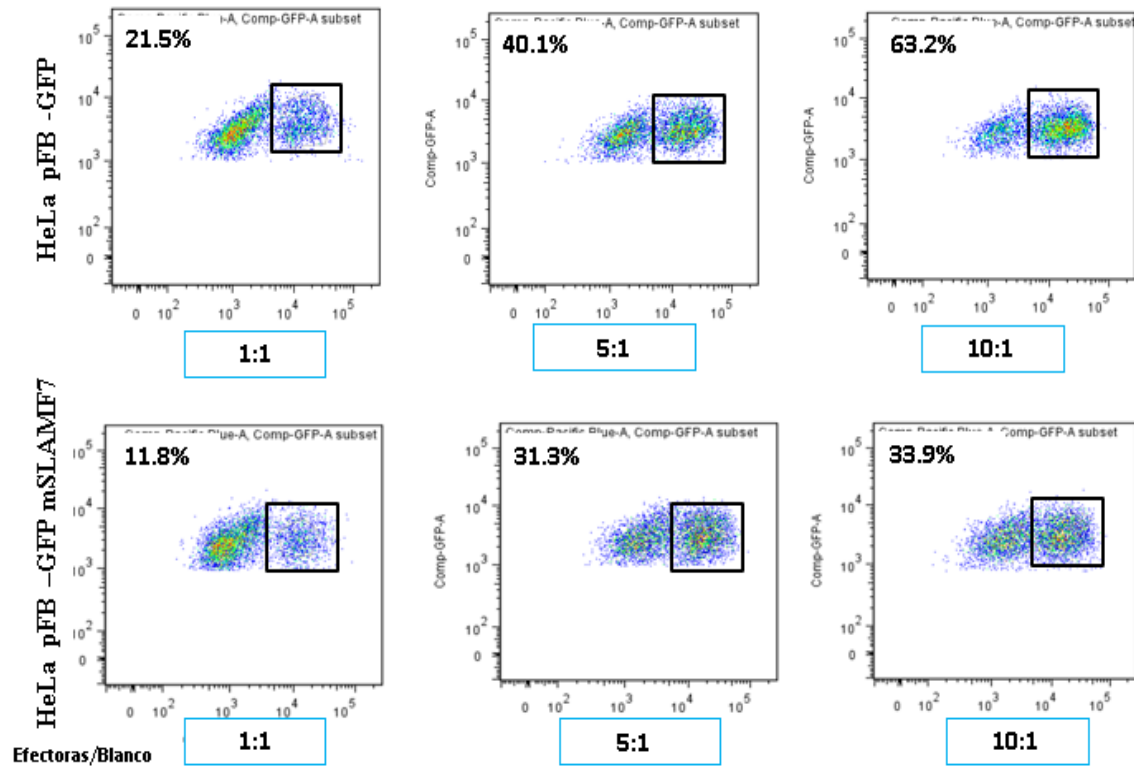
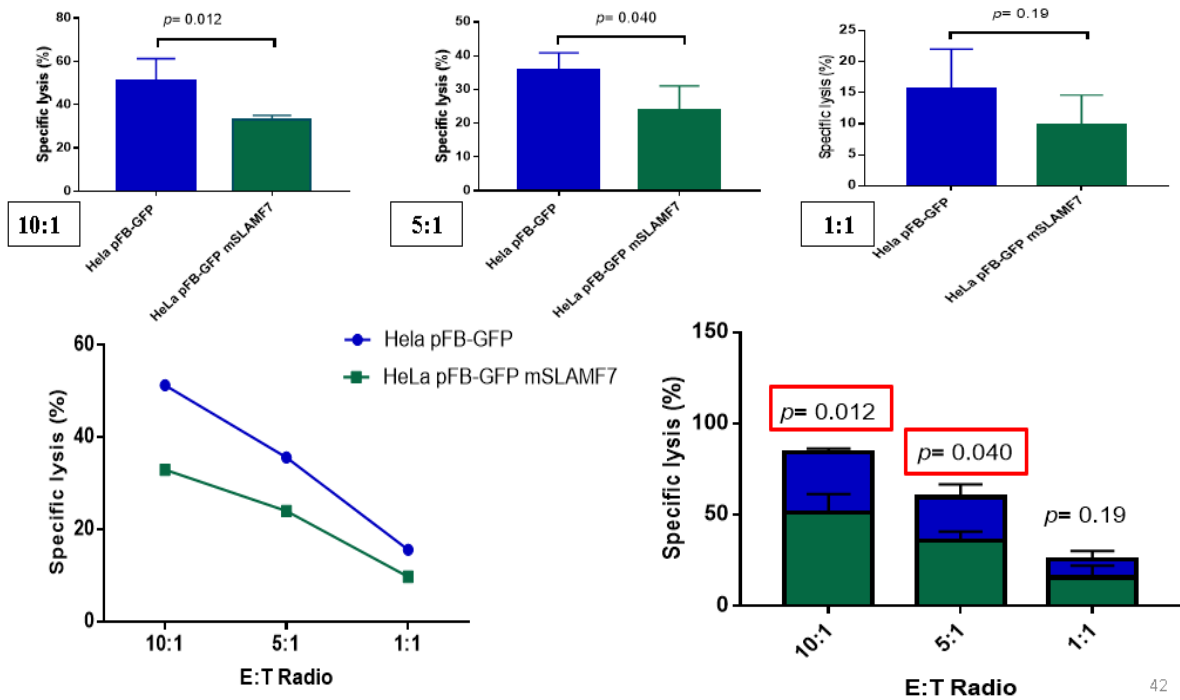


Figura 11 Se plasma lisis celular específica en tres diferentes relaciones (E/T) 1:1, 5:1 Y 10:1) para HeLa pFB-GFP o HeLa pFB-GFP mSLAMF7.



**Figura 12** En esta imagen se plasma los análisis estadísticos de la lisis celular específica donde observamos que en la relación 10:1 y 5:1, se obtuvo un valor estadísticamente significativo, en la relación 1:1 no fue estadísticamente significativo.

### 9.7 Conjugados Celulares en células HeLa pFB-GFP Y HeLa pFB-GFP mSLAMF7

La capacidad de las células NK para poder eliminar eficientemente a sus células diana, depende de una serie de eventos por los cuales las células NK debe transitar. Esta serie de eventos involucran un fenómeno de adhesión celular, de polarización de la maquinaria citotóxica y otros elementos como proteínas que participan en vías señalización y, finalmente la desgranulación de gránulos que contienen perforina y enzimas líticas como las granzimas. Para poder identificar si algún evento de éstos está regulado por SLAMF7, lo primero que se evaluó fue la capacidad de SLAMF7 de regular la adhesión de las células NK a su célula blanco. La adhesión celular se evaluó por ensayos de formación de conjugados celulares para posteriormente ser analizados por citometría de flujo. Para lo anterior las células NK (YT-S) se marcaron con una sonda fluorescente para

favorecer su identificación. Por su parte, tanto las células HeLa que expresan o no SLAMF7 también expresan a GFP lo que a su vez favorece su identificación.

Los resultados nos indican que, en función del tiempo, el porcentaje de conjugados entre células NK y célula blanco incremento del 2% al tiempo 0 al 14% a los 10 minutos. Interesantemente, la presencia de SLAMF7 en células HeLa resulto en una disminución significativa del porcentaje de conjugados entre células NK y células HeLa (*Figura 14*). Es importante mencionar que esta disminución fue significativa a los dos tiempos evaluados, 5 y 10 minutos. Estos resultados indican que la expresión de SLAMF7 en células NK, favorece una disminución en de la capacidad adhesión de las células NK. Lo que sugiere que uno de los mecanismos por lo cuales SLAMF7 puede inhibir la función citotóxica de las células NK es regulando la adhesión de las células NK.

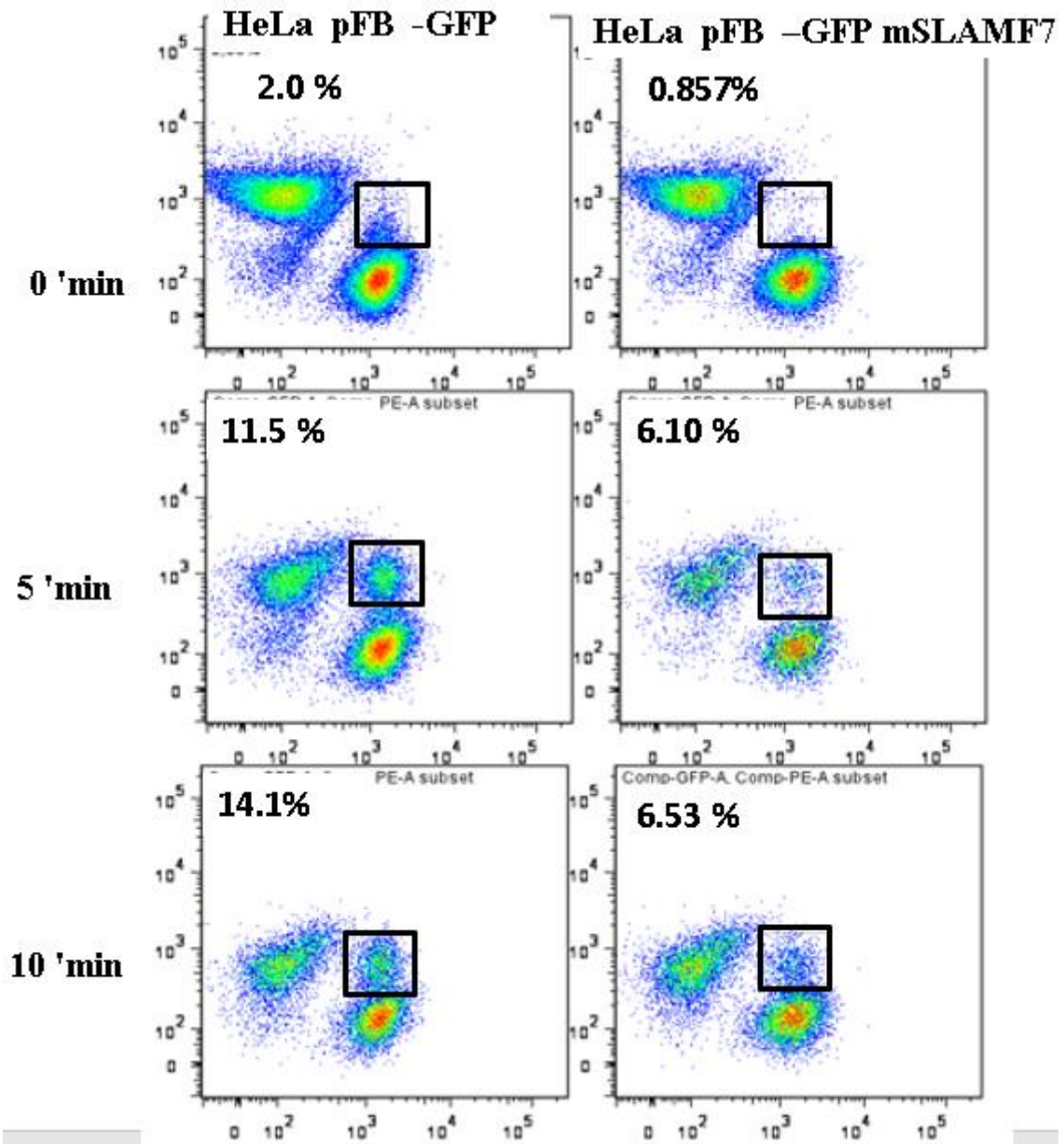


Figura 13: Se plasman los conjugados celulares a diferentes tiempos (10 minutos, 5 minutos y 0 min ) tanto para HeLa p FB-GFP o HeLa p FB-GFP mSLAMF7.

## Análisis estadísticos de adhesión celular

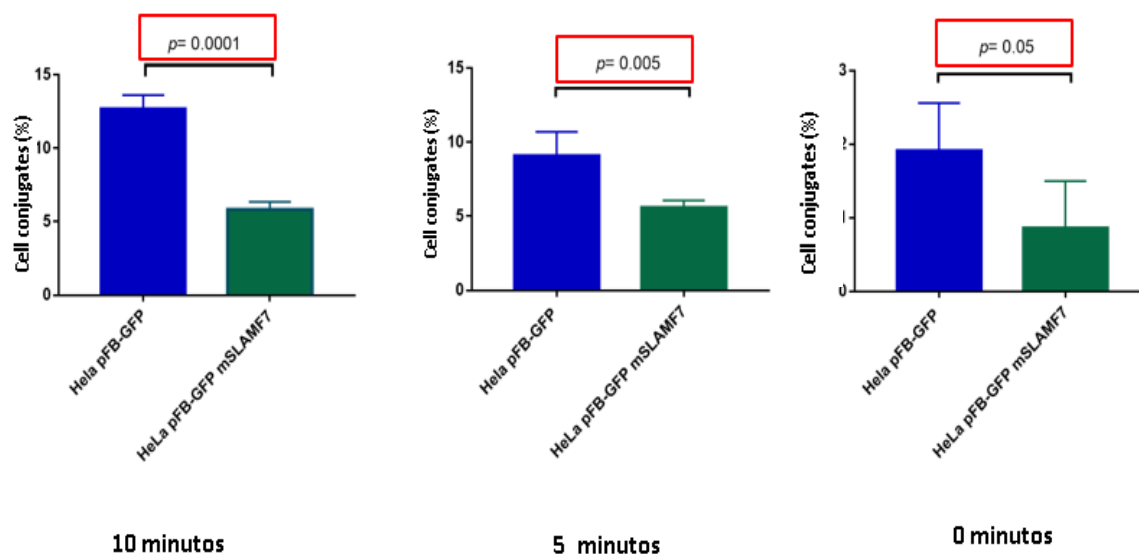


Figura 14 En esta imagen se plasma los análisis estadísticos de los ensayos de adhesión celular donde observamos que en el tiempo 10 minutos y 5 minutos, se obtuvo un valor estadísticamente significativo, en el tiempo 0 minutos el valor que se obtuvo no fue muy relevante.

## 10. DISCUSIÓN

Las células NK son linfocitos que juegan un papel fundamental tanto en la respuesta inmune innato como adaptativa. Esto radica en sus atributos para ejercer una función citotóxica, así como en su capacidad para secretar citocinas proinflamatorias[1],[2]. La función citotóxica de las células NK está dirigida principalmente contra células infectadas por virus o células que sufren de una transformación maligna. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales las células NK pueden lisar a sus células diana. El primero de ellos se basa en la liberación de gránulos citotóxicos que son ricos en perforina y enzimas líticas como las granzimas. Adicionalmente a este mecanismo, las células NK pueden también inducir apoptosis en células blanco a través de la activación de receptores de muerte como FasL y TRAIL [5][36].



Existen varios mecanismos celulares que regulan la capacidad citotóxica de las células NK, los cuales ya han sido bien descritos y estos de manera general se pueden agrupar en tres eventos discretos. El primero incluye la adhesión celular, el segundo la polarización y finalmente la desgranulación celular. Todos estos eventos se suman para promover de manera eficiente la capacidad citotóxica de las células NK [28],[29],[30]. No obstante, si alguno de esos eventos llegara a fallar o a no suceder de manera adecuada, la capacidad citotóxica de las células NK se puede ver gravemente comprometida y, en consecuencia, conducir al desarrollo de patologías, como son principalmente las inmunodeficiencias primarias [30].

Cada uno de estos eventos celulares está regulado por una batería de proteínas de superficie que funcionan como receptores y los cuales están agrupados en diferentes familias. Una de estas familias, llamada SLAM, contiene al receptor SLAMF7, quien es un receptor tanto de activación como de inhibición [31]. Todos los miembros de la familia SLAM señalizan a través de las proteínas adaptadoras SAP y EAT-2. SLAMF7 se ha estudiado a detalle en modelos murinos, lo cual, ha permitido demostrar que es el único receptor de la familia SLAM que señala específicamente a través de EAT-2, en consecuencia, en ausencia de EAT-2, SLAMF7 se vuelve un receptor de inhibición [36]. En células humanas el papel de SLAMF7 ha sido poco explorado y al igual que en ratón, este receptor favorece la inhibición de la función citotóxica de las NK a través de la ausencia de la proteína adaptadora EAT-2. Sin embargo, aún se desconocen los eventos celulares y moleculares por los cuales SLAMF7 inhibe la función citotóxica de las células NK [36].

En este trabajo, nos propusimos identificar cuáles eran los principales mecanismos celulares por los cuales SLAMF7 pudiese inhibir la función citotóxica de las células NK. Para esto, dispusimos de un modelo en el cual tenemos una variante de la célula blanco, en este caso, las células HeLa, las cuales derivan de un cáncer cervicouterino. La única diferencia de esta variante con respecto a su célula parental es la expresión de SLAMF7. Este modelo no permitió por un lado comparar la susceptibilidad de las células blanco a ser lisadas por las células NK en función de la presencia o ausencia de SLAMF7 en las células diana. Nuestra primera serie de resultados nos indican que se

observaron diferencias significativas en el porcentaje de lisis en las relaciones 10:1 (E/T) y 5:1 (E/T). Por lo cual, estos resultados sugieren que la sola expresión del ligando natural de SLAMF7 sobre una célula blanco, que además expresa moléculas del MHC-I, promueve la Inhibición citotóxica de las células NK humanas de manera significativa, lo cual ya se ha demostrado anteriormente.

Con la finalidad de interrogar sobre los mecanismos celulares por los cuales SLAMF7 en células NK pudiese estar inhibiendo su función citotóxica, se decidió evaluar la formación de conjugados celulares como una manera de saber la capacidad de adhesión de las células NK.

Nuestros resultados mostraron que las células YT-S fueron capaces de formar conjugados con las células HeLa. La influencia de SLAMF7 sobre la formación de conjugados celulares, demostró que la presencia de este receptor en las células HeLa disminuyó significativamente el porcentaje de conjugados entre células NK y células blanco. Estos resultados sugieren que SLAMF7 puede estar impactar en el proceso de adhesión celular en células NK como uno de los principales mecanismos por los cuales se pueda estar modulando la respuesta citotóxica de las células NK. Sin embargo, aún falta evaluar si SLAMF7 participa en modular otros eventos discretos como son la polarización y desgranulación [14],[43].

Hasta ahora, se sugiere que receptores de inhibición como aquellos que se agrupan en la familia KIR, restringen la función citotóxica las células NK a través de inhibir la polarización de los gránulos citotóxicos hacia la interfase que se forma entre la célula NK y la célula blanca. Así mismo se sugiere que este mecanismo, parece ser el preferido por los receptores inhibitorios. Es importante destacar que los receptores inhibitorios agrupados en la familia KIR así como NKG2A inhiben a través de reclutar a la fosfatasa de tirosinas SHP-1. Hasta ahora, hemos demostrado que SLAMF7 puede inhibir de manera significativa la formación de conjugados entre célula NK y su blanco, lo que sugiere que SLAMF7 puede inhibir la adhesión de las células NK [43]. Aquí, vale la pena resaltar que SLAMF7 promueve la inhibición de función citotóxica de las células NK a través de un mecanismo que depende la fosfatasa de lípidos SHIP1, por lo que es posible que los receptores KIR y SLAMF7 representen dos módulos de inhibición independientes que operen a través de reclutar diferentes elementos de

señalización y que esto explique el que estos dos receptores pudiesen estar inhibiendo diferentes respuestas celulares [43].

## **11. CONCLUSIÓN**

SLAMF7 es un receptor que inhibe la citotoxicidad celular mediada por células NK en parte a través de regular la adhesión celular.

## **12 . PERSPECTIVAS**

Evaluar el papel de SHIP-1 en células humanas que no expresan EAT-2, en especial en los linfocitos T citotóxicos, por lo que implementar un modelo celular bajo este escenario permitirá desarrollar nuevo conocimiento acerca del papel que cumple SLAMF7 en células citotóxicas humanas que carecen de la presencia de EAT-2.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Xie G, Dong H, Liang Y, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine*. 2020; 59.
- [2] Liu S, Galat V, Galat Y, Lee YKA, Wainwright D, Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):7.
- [3] Cichocki F, Grzywacz B, Miller JS. Human NK cell development: One road or many? *Front Immunol*. 2019;10:2078.
- [4] Wang W, Hank JA, Sondel PM. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2015;6.
- [5] Barrow AD, Colonna M. Tailoring Natural Killer cell immunotherapy to the tumour microenvironment. *Semin Immunol*. 2017;31:30–6.
- [6] Zhang X, He D, Gao S, Wei Y, Wang L. *Aspergillus fumigatus* enhances human NK cell activity by regulating M1 macrophage polarization. *Mol Med Rep*. 2019;20(2):1241–9.
- [7] H. Schlums et al., “Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function,” *Immunity*, vol. 42, no. 3, pp. 443–456, 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.008.
- [8] J. L. Cannons, S. G. Tangye, and P. L. Schwartzberg, “SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, no. 1, pp. 665–705, Apr. 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101302.
- [9] N. Wu and A. Veillette, “SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 38, pp. 45–51, 2016, doi: 10.1016/j.coi.2015.11.003.
- [10] Z. Dong, M. E. Cruz-Munoz, M. C. Zhong, R. Chen, S. Latour, and A. Veillette, “Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 973–980, 2009, doi: 10.1038/ni.1763.
- [11] H. Nakajima et al., “Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity,” *Eur. J. Immunol.*,

- vol. 30, no. 11, pp. 3309–3318, 2000, doi: 10.1002/1521-4141(200011)30:11<3309::AID-IMMU3309>3.0.CO;2-3.
- [12] J. L. Cannons, S. G. Tangye, and P. L. Schwartzberg, “SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, no. 1, pp. 665–705, 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101302.
- [13] L. A. Pérez-Quintero, R. Roncagalli, H. Guo, S. Latour, D. Davidson, and A. Veillette, “EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase C $\gamma$ , Ca $^{++}$ , and Erk, leading to granule polarization,” *J. Exp. Med.*, vol. 211, no. 4, pp. 727–742, 2014, doi: 10.1084/jem.20132038.
- [14] Z. Dong, D. Davidson, L. A. Pérez-Quintero, T. Kurosaki, W. Swat, and A. Veillette, “The Adaptor SAP Controls NK Cell Activation by Regulating the Enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by Enhancing Conjugates with Target Cells,” *Immunity*, vol. 36, no. 6, pp. 974–985, 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.023.
- [15] P. Engel, M. J. Eck, and C. Terhorst, “The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 813–821, 2003, doi: 10.1038/nri1202.
- [16] M. E. Cruz-Munoz, Z. Dong, X. Shi, S. Zhang, and A. Veillette, “Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 3, pp. 297–305, 2009, doi: 10.1038/ni.1693.
- [17] H. Guo, M.-E. Cruz-Munoz, N. Wu, M. Robbins, and A. Veillette, “Immune Cell Inhibition by SLAMF7 Is Mediated by a Mechanism Requiring Src Kinases, CD45, and SHIP-1 That Is Defective in Multiple Myeloma Cells,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 1, pp. 41–51, Jan. 2015, doi: 10.1128/mcb.01107-14.
- [18] I. Tassi and M. Colonna, “The Cytotoxicity Receptor CRACC (CS-1) Recruits EAT-2 and Activates the PI3K and Phospholipase C $\gamma$  Signaling Pathways in Human NK Cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 12, pp. 7996–8002, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.12.7996.
- [19] A. Bouchon, M. Cella, H. L. Grierson, J. I. Cohen, and M. Colonna, “Cutting Edge: Activation of NK Cell-Mediated Cytotoxicity by a SAP-Independent Receptor of the CD2 Family,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 10, pp. 5517–5521, 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5517.

- [20] S. Stark and C. Watzl, "2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells," *Int. Immunol.*, vol. 18, no. 2, pp. 241–247, 2006, doi: 10.1093/intimm/dxh358.
- [21] Gunesch JT, Angelo LS, Mahapatra S, Deering RP, Kowalko JE, Sleiman P, et al. Genome-wide analyses and functional profiling of human NK cell lines. *Mol Immunol.* 2019;115:64–75.
- [22] Poznanski SM, Ashkar AA. What defines NK cell functional fate: Phenotype or metabolism? *Front Immunol.* 2019;10:1414.
- [23] Campbell AR, Duggan MC, Suarez-Kelly LP, Bhave N, Opheim KS, McMichael EL, et al. MICA-expressing monocytes enhance natural killer cell fc receptor-mediated antitumor functions. *Cancer Immunol Res* . 2017;5(9):778–89.
- [24] Wu S-Y, Fu T, Jiang Y-Z, Shao Z-M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer.* 2020;19(1):120.
- [25] Yang Y, Day J, Souza-Fonseca Guimaraes F, Wicks IP, Louis C. Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases. *Clin Transl Immunology.* 2021;10(2):e1250.
- [26] Friend R, Bhutani M, Voorhees PM, Usmani SZ. Clinical potential of SLAMF7 antibodies - focus on elotuzumab in multiple myeloma. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:893–900.
- [27] Kühne L, Konstandin M, Samstag Y, Meuer S, Giese T, Watzl C. WF10 stimulates NK cell cytotoxicity by increasing LFA-1-mediated adhesion to tumor cells. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:436587.
- [28] Gross CC, Brzostowski JA, Liu D, Long EO. Tethering of intercellular adhesion molecule on target cells is required for LFA-1-dependent NK cell adhesion and granule polarization. *J Immunol.* 2010;185(5):2918–26.
- [29] Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren H-G, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med.* 2005;202(7):1001–12.
- [30] Chen J, Zhong M-C, Guo H, Davidson D, Mishel S, Lu Y, et al. SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin. *Nature.* 2017;544(7651):493–7.

- [31] Chen S, Cai C, Li Z, Liu G, Wang Y, Blonska M, et al. Dissection of SAP-dependent and SAP-independent SLAM family signaling in NKT cell development and humoral immunity. *J Exp Med*. 2017;214(2):475–89.
- [32] Dragovich MA, Mor A. The SLAM family receptors: Potential therapeutic targets for inflammatory and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2018;17(7):674–82.
- [33] Geng L, Yang J, Tang X, Peng H, Tian J, Hu Z, et al. SLAM/SAP decreased follicular regulatory T cells in patients with Graves' disease. *J Immunol Res*. 2021;2021:5548463.
- [34] Gartshteyn Y, Askanase AD, Mor A. SLAM Associated Protein signaling in T cells: Tilting the balance toward autoimmunity. *Front Immunol*. 2021;12:654839.
- [35] Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011;29(1):665–705.
- [36] Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2016;38:45–51.
- [37] Chen S, Yang M, Du J, Li D, Li Z, Cai C, et al. The self-specific activation receptor SLAM family is critical for NK cell education. *Immunity* [Internet]. 2016;45(2):292–304.
- [38] Wu N, Zhong M-C, Roncagalli R, Pérez-Quintero L-A, Guo H, Zhang Z, et al. A hematopoietic cell-driven mechanism involving SLAMF6 receptor, SAP adaptors and SHP-1 phosphatase regulates NK cell education. *Nat Immunol* [Internet]. 2016 [citado el 1 de junio de 2022];17(4):387–96.
- [39] Higashioka K, Ota Y, Maehara T, Moriyama M, Ayano M, Mitoma H, et al. Association of circulating SLAMF7+Tfh1 cells with IgG4 levels in patients with IgG4-related disease. *BMC Immunol*. 2020;21(1):31.
- [40] Ishibashi M, Soeda S, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Tanaka N, et al. Clinical impact of serum soluble SLAMF7 in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2018;9(78):34784–93.
- [41] Loyal L, Warth S, Jürchott K, Mölder F, Nikolaou C, Babel N, et al. SLAMF7 and IL-6R define distinct cytotoxic versus helper memory CD8+ T cells. *Nat Commun*. 2020;11(1):6357.

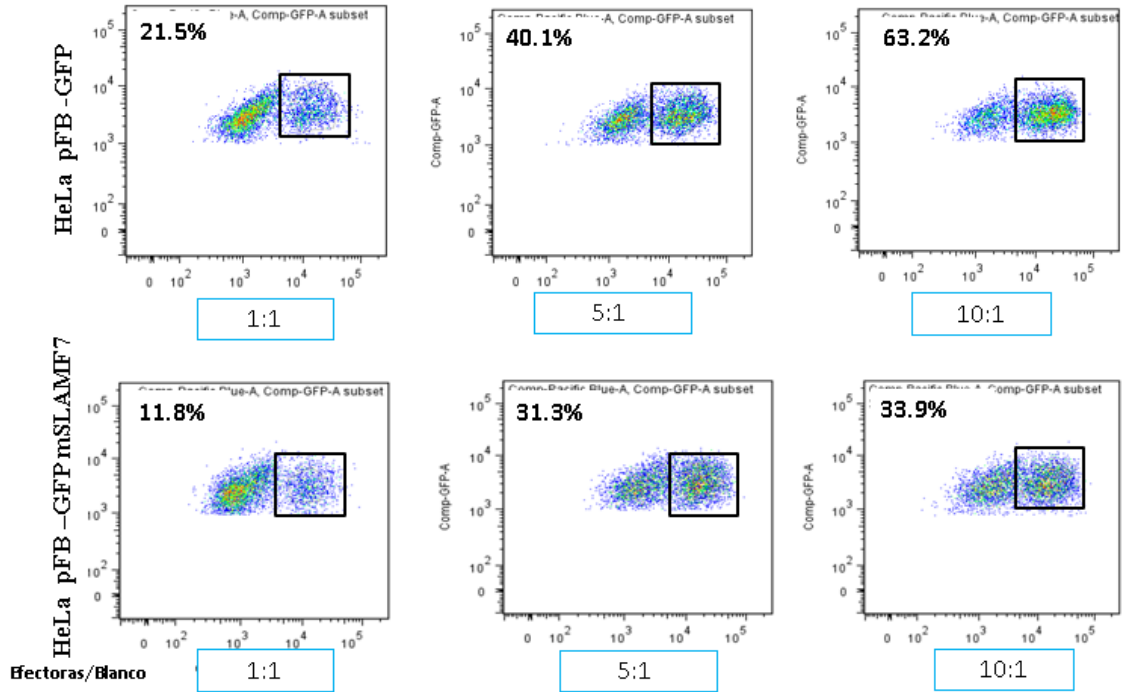
- [42] Pazina T, James AM, Colby KB, Yang Y, Gale A, Jhatakia A, *et al.* Enhanced SLAMF7 homotypic interactions by elotuzumab improves NK cell killing of multiple myeloma. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(10):1633–46.
- [43] Guo H, Cruz-Munoz M-E, Wu N, Robbins M, Veillette A. Immune cell inhibition by SLAMF7 is mediated by a mechanism requiring src kinases, CD45, and SHIP-1 that is defective in multiple myeloma cells. *Mol Cell Biol.* 2015;35(1):41–51.
- [44] O’Connell P, Pepelyayeva Y, Blake MK, Hyslop S, Crawford RB, Rizzo MD, *et al.* SLAMF7 is a critical negative regulator of IFN- $\alpha$ -mediated CXCL10 production in chronic HIV infection. *J Immunol.* 2019;202(1):228–38.
- [45] Gutierrez-Guerrero A, Mancilla-Herrera I, Maravillas-Montero JL, Martinez-Duncker I, Veillette A, Cruz-Munoz ME. SLAMF7 selectively favors degranulation to promote cytotoxicity in human NK cells. *Eur J Immunol.* 2021;52(1):62–74.
- [46] Gumbleton M, Vivier E, Kerr WG. SHIP1 intrinsically regulates NK cell signaling and education, resulting in tolerance of an MHC class I-mismatched bone marrow graft in mice. *J Immunol.* 2015;194(6):2847–54.
- [47] Pedicone C, Meyer ST, Chisholm JD, Kerr WG. Targeting SHIP1 and SHIP2 in cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(4):890.
- [48] Pal M, Schwab L, Yermakova A, Mace EM, Claus R, Krahl A-C, *et al.* Tumor-priming converts NK cells to memory-like NK cells. *Oncoimmunology.* 2017;6(6):e1317411.



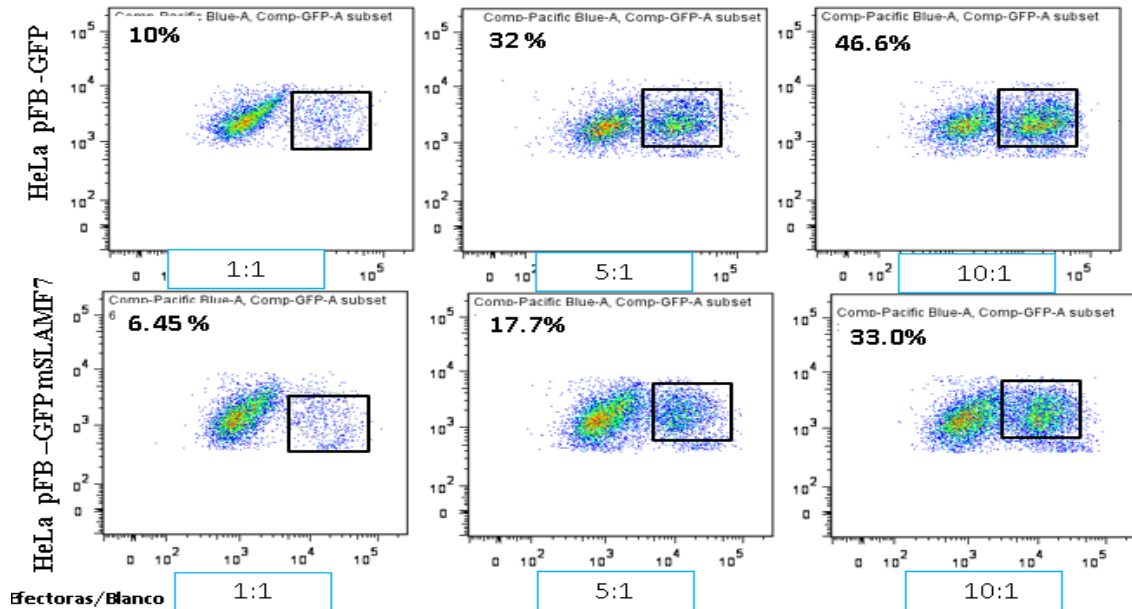
## 14. ANEXOS

### Triplicado de ensayos de lisis celular especifica

#### Lisis celular especifica con tres radios 1



#### Lisis celular especifica con tres radios 2



### Lisis específica con tres radios 3

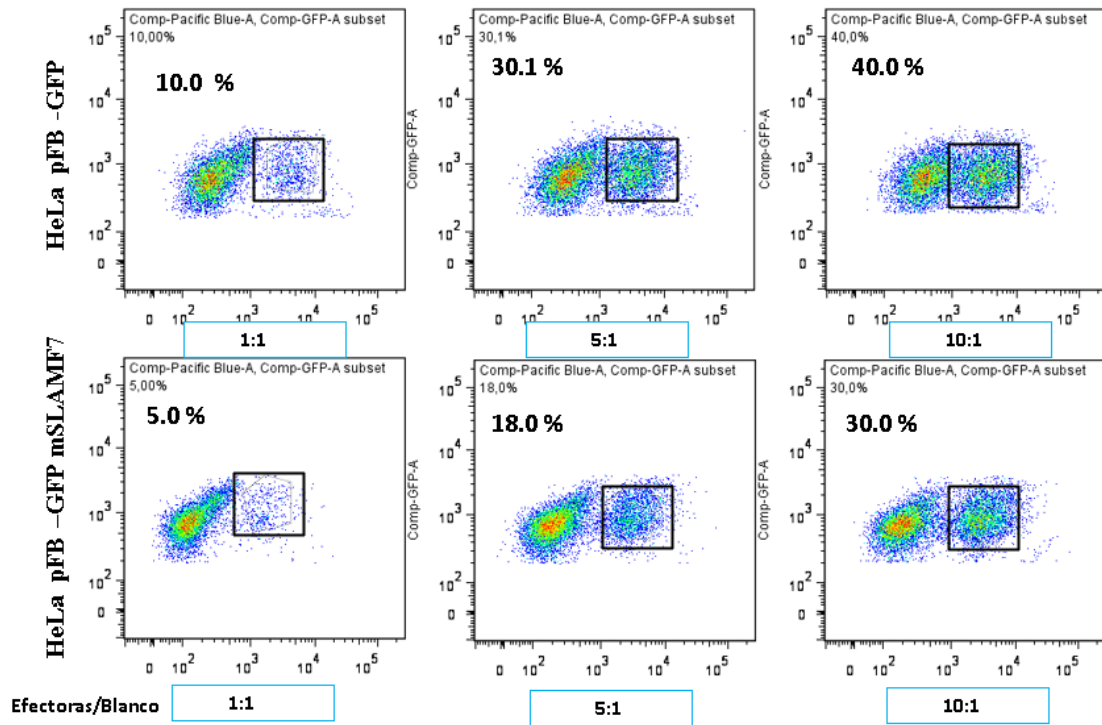
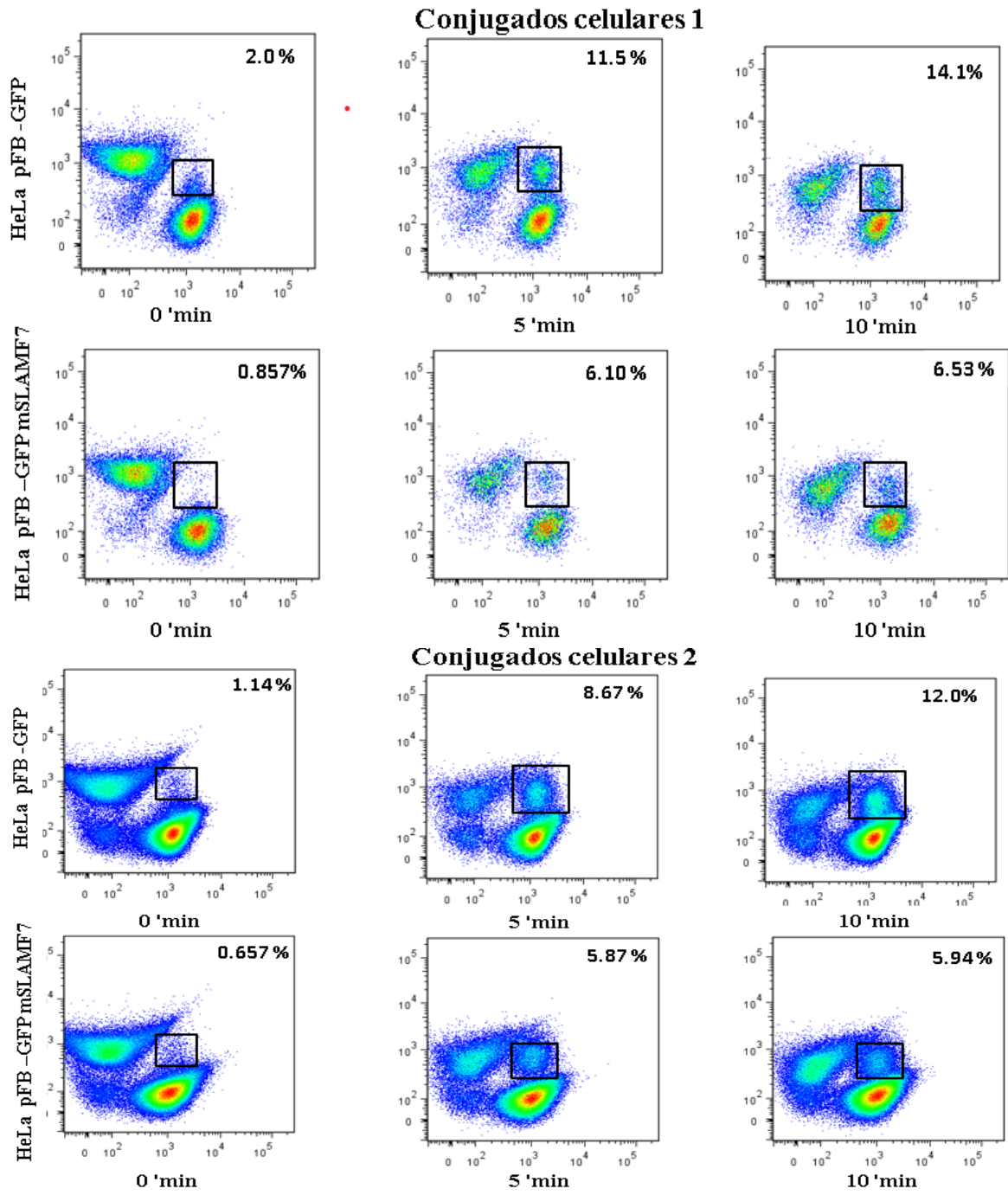
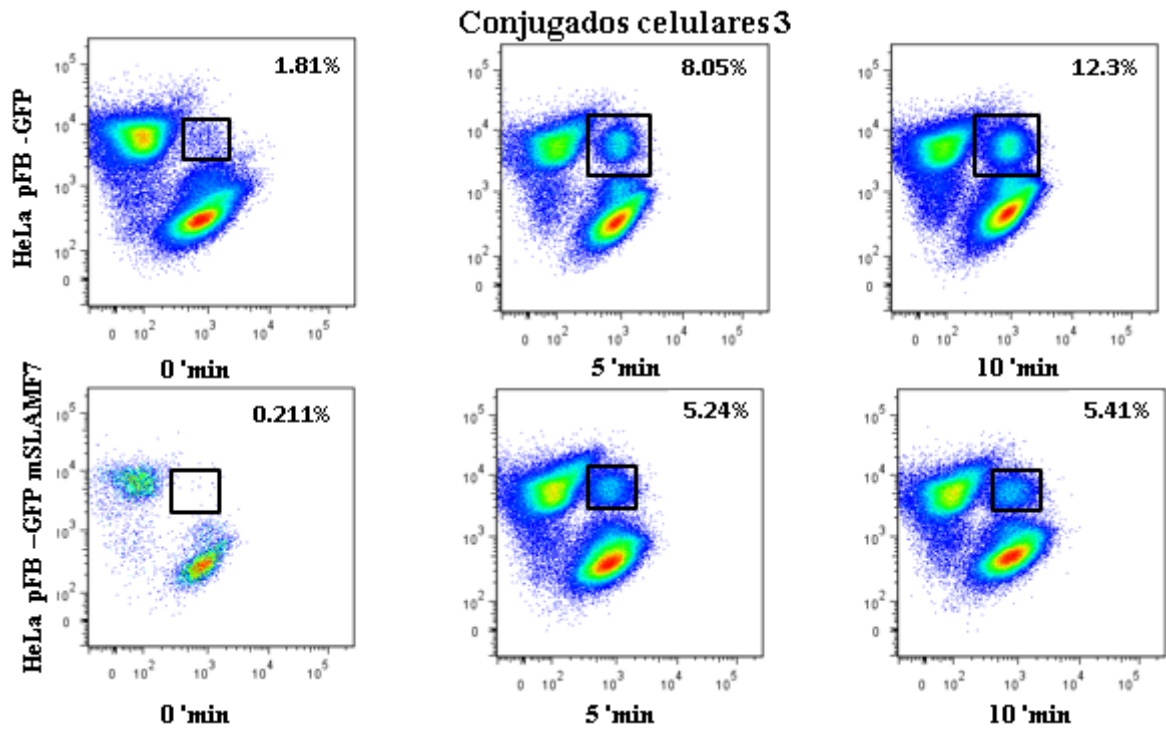


Figura 15 Se plasma triplicado de lisis celular específica en tres diferentes relaciones (E/T) 1:1, 5:1 Y 10:1 para HeLa p FB-GFP o HeLa p FB-GFP mSLAMF7.

## Triplicado de ensayos de conjugados celulares





*Figura 16* Se plasman triplicados de conjugados celulares a diferentes tiempos (10 minutos, 5 minutos y 0 min ) tanto para HeLa p FB-GFP o HeLa p FB-GFP mSLAMF7.

## Curva de concentración de inhibidores SHP-1 Y SHIP en células HeLa pFB-GFP

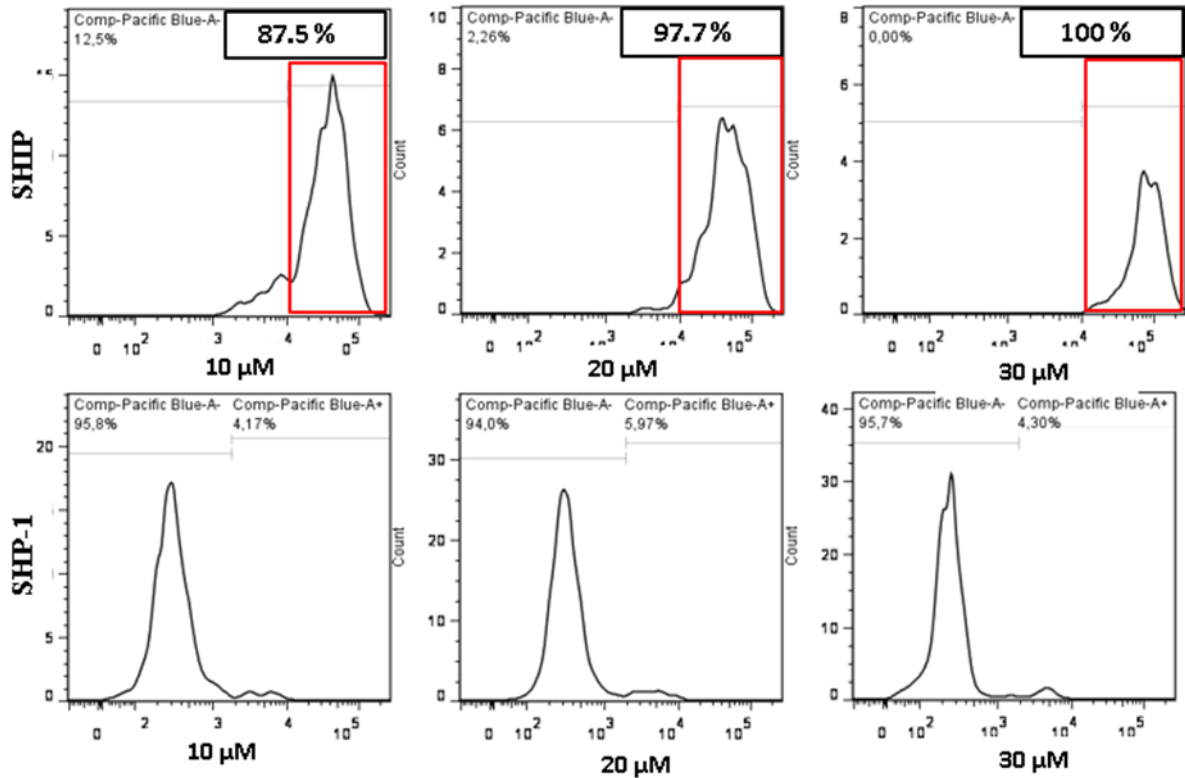


Figura 17 Curva de concentración de los inhibidores a diferentes concentraciones tanto para SHP-1 Y SHIP en células HeLa pFB-GFP. Se observa muerte celular en las diferentes concentraciones con SHIP.



Cuernavaca, Morelos, 14 de mayo de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Mecanismos de inhibición del receptor SLAMF7 en células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Elizabeth Ramírez Casarrubias. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ** | Fecha:2024-05-27 20:32:24 | FIRMANTE

iiicnhbKEk5SmfaYDk5kYRGrdxoVewzzN5GbSAEivnYLnzswd8zQ3mGgR3K1QFeq8WBG0TYLnP3MldWWhr26sF3av4j2NwVbbz5Y4XOdG/vjts6h4+ssGyEqNcj9n7p11HqZqDVIzk  
omx54i4O3U5ZWD+3ksirCFRCv5UcEBA8w6PmBEuRxlVZtjrbMojS79RnywlegSKqH611TzG06Z0pwcE4aGnfmLz7133GeZ+j0Qo5hdgG+Ibf3hcDpsizHpev2J7SRScPxdMs1cxI6  
YqdzPu6nFoTagYE+iuNOjosMIEnLk8oPAH1guVyfTtR3UP/gI6kAvAX84VzqIflXrgzw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[pk4Lq6yPJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/y5reGVRZuK4AGFHEpsSD2lceZBPJYFIP>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 14 de mayo de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Mecanismos de inhibición del receptor SLAMF7 en células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Elizabeth Ramírez Casarrubias. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama**







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2024-05-27 21:59:24 | FIRMANTE**

bMidP9CX4phqAn5vptAKj+MqtdCo3oYCIA2cHeLH5iGBnijMq3tSDImYnVSaZ5ROGA4KD8rO/r7YxvER4ArxOSWYJMApMUVBV8jfQZGw3Qyov3ZyEN2yeadpzGqsx9YsYzcxvuU  
TNOEJwVV1yD0p3MURY4Twr1EmgHO7PiZm8FGwUVrEFlgCk8MDZySziVECaPqs5Bs/YOifoUizUQjdOqE668l8obt02waO7gNBaf9mPqufdRRI+ttoy8/eXSGVcfrTVpTNPn+m  
vfKq8OXJm/MDzLg4hOVHsTX2V6NX/OMpR2O0O5VhPLLY+yKWGxeavPOIfS9J1eJufAA5rP/15Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Jhpk3GMu1](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hkLknte57MVYwYY9rdouH0fddvHPdUwy>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 14 de mayo de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Mecanismos de inhibición del receptor SLAMF7 en células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Elizabeth Ramírez Casarrubias. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2024-05-27 16:08:58 | FIRMANTE

oC80yE1aaSRm8o8cckp2h8UbQ1taLzGTJBd8O5UWk3+M67hRX38Bw8ROQOIPNHl0eJbEbvVkJFH1xb5RoI0FicsKvN0G9zSGHkNH3D2QW4VfvVhdH6bYUPfguxgbZILiQfYuj9ooSexOrr/H0APYyJ08b+Vztmj7WWMYIIXZ0lci88xdWYSf6QDf8WvnDWr8MSCVx+wOZCZaO1T5zIHbHRYwuPckzu8i9i6q1RpUh+BVXtOMvgOLobKR0YCc7fBOjf5N1mZmrQeOH25YldfqVWWTMMs3Y235xRKLXF+rYBMRcnnwkAg7NBI+M9se3UeDgDUENEITAWXZP11leUYZS7XA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[vMI9PRkoV](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7O3MHq0SxXe6i9oaMDKHwPzTswcpl3Dt>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 14 de mayo de 2024.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**  
**Encargada de Despacho de la**  
**Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Mecanismos de inhibición del receptor SLAMF7 en células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Elizabeth Ramírez Casarrubias. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dra. Gabriela Rosas Salgado**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2024-05-28 09:58:22 | FIRMANTE**

ArlKsR5im1W2kLMIOmeLMp71kWanPtoMUIPdQ8cos0c9djlU9MiwAWb8iDUNcdRjF15ismq90wVzww+oLShfweLfmz7dEEZ6qcoU1Y+OlvRgK4/MtytkfGOQHucQqpnTX9j1RaE  
Vsk9mqH5XWLuiGLEKetKLMvDqUdryNI+WhrHrr0elUCRpoig9/PgwzlezorLo5zoYYM/aaqV4qxM3fRpu1FQa6QzKNMqkaVqquh9DlueH8pTY9L113yNOIzSixY5R2GbXbX7Je1B1g  
YwOlaUqcZOZh/C+KRTtrBndQUUe4/xJZsjwcorLEYWa+57JEMazVH/XICxBn23U1Zmh0g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[sSybDLZBQ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JzUVrkmkZRkidGUcPP6ChSaup9Z7Ugh8>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029