



Universidad Autónoma del Estado de Morelos



FACULTAD DE MEDICINA MAESTRIA EN MEDICINA MOLECULAR

SECRETARIA DE INVESTIGACION COORDINACION GENERAL DE POSGRADO

“Influencia del receptor SLAMF7 sobre la adhesión de células NK”

Tesis

Para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular

Que presenta:

Bióloga Nataly López Garduño

Director de tesis:

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Cuernavaca, Morelos, México abril del 2026.

Facultad de Medicina UAEM

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

Tutor personal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama (Facultad de Medicina-UAEM)

Miembros del comité tutorial:

Dr. Dr. Juan José Acevedo Fernández (Facultad de Medicina-UAEM)

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama (Facultad de Medicina-UAEM)

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

Miembros del jurado de examen

Presidente: Dr. Luis Enrique Cañedo y Dorantes

Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández

Primer vocal: Dr. José Luis Montiel Hernández

Segundo vocal: Dr. Arturo Gutiérrez Guerrero

Tercer vocal: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a la vida, a mis papas, hermanos: Manuel y Cristóbal por apoyarme todo el tiempo, y levantarme aun cuando yo creía que ya no podía, por no dejar que me diera por vencida, doy gracias por todo el camino recorrido y las metas alcanzadas.

Doy gracias a mis compañeros del laboratorio por el afecto recibido y en especial a Jacky que siempre tuvo mucha paciencia y me ayudo en lo que estuvo en sus manos.

Gracias Asiel por llegar y darme la mano y sostén cuando lo he necesitado.

Gracias a todas mis primas y familia que me apoya.

Agradezco a el laboratorio 4 de la facultad de medicina, en donde realice mis ensayos y lo académico, así como también al Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz por permitir ser mi asesor, enseñarme y guiarme en el transcurso de la

maestría; al IBT UNAM y al Hospital del Niño Morelense por permitirnos trabajar en sus instalaciones y utilizar el citómetro de flujo.

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

Hoy que no estas, todo esto es por ti y para ti. Te amo siempre y te extrañare toda la vida. Cristobal López garduño.

Solamente aquellos que han sufrido lo suficiente, pueden ver la luz dentro de las sombras. RRZ.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Célula Natural Killer.....	7
1.2 Mecanismos de activación de las células NK	10
1.2.1 Papel de la adhesión celular en la acción de las células NK.....	14
1.3 Receptores inhibidores	15
1.4 Receptores activadores.....	19
1.4.2 Receptores NKG2D y NKG2C.....	24
1.4.3 Otros receptores coestimuladores (DNAM-1, 2B4, CD16).....	26
1.4.4 Integrina LFA-1 y su ligando ICAM en células NK: del reconocimiento a la ejecución citotóxica y su cooperación con SLAMF7	27
1.5 SLAM.....	29
2. Pregunta de investigación	40
3. Hipótesis.....	40
4. Objetivo general.....	40
4.1 Objetivos Específicos.....	40
6. Resultados	49
7. Discusión	60
8. Conclusiones.....	65
9. Referencias Bibliográficas	66

Índice de imágenes.

Figura 1. Subpoblaciones de células NK.....	9
Figura 3. Educación y activación de células NK.....	13
Figura 4. NCRs activando señalización vía adaptadores ITAM (CD3 ζ /FcR γ o DAP12)	23
Figura 5. Comparativa esquemática de la señalización de NKG2D (DAP10, YINM, PI3K/Grb2-Vav1) frente a NKG2C (CD94–NKG2C–DAP12, ITAM, Syk/ZAP-70) en células NK.	25
Figura 6. Sinapsis ADCC mediada por CD16 y cooperación con LFA-1. (Explicar figura) ¿De dónde se tomó?.....	27
Imagen 7. Receptores de la familia SLAM en células inmunitarias	30
Figura 8. Mecanismo de señalización del receptor SLAMF7.	36
Figura 9. señalización del receptor SLAMF7.....	36
Figura 10. Comparación de la expresión de m. SLAMF7 en células YT-S nativas y transfectadas	50
Se muestran experimentos representativos.....	50
Figura 11. Evaluación de la presencia relativa de SLAMF7 en líneas celulares HeLa parentales y modificada (HeLa m.SLAMF7). Se muestran experimentos representativos..	51
Figura 12. Comparación de la presencia relativa de GFP en líneas celulares HeLa por citometría de flujo. Figuras representativas de experimentos independientes.Análisis mediante programa FLOWJO. Se muestran experimentos representativos.	52
Figura 13. Expresión ICAM en líneas celulares HeLa. Análisis mediante programa FLOWJO. Se muestran experimentos representativos.	53
Figura 14. Cinética de formación de conjugados celulares entre YT-S m. SLAMF7 y líneas HeLa. Se muestran experimentos representativos.....	54
.....	55
Figura 16. Verificación de la construcción PSR ∞ Puro/hICAM mediante digestión con EcoRI.....	55
figura 17. Digestión con EcoRI de clonas PSR ∞ Puro/hICAM.	56
Figura 18. Digestión con Nco I para determinar la orientación de PSR ∞ Puro/h ICAM.	57
Figura 19. Análisis de conjugados celulares YT-S m. SLAMF7 con diferentes líneas HeLa	58
Figura 20. Análisis estadístico de la adhesión celular a minuto cero	59
Figura 21. Análisis estadístico de la adhesión celular a minuto cinco..	59
Figura 22. Análisis estadístico de la adhesión celular a minuto diez..	60

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros de diseño de oligos dirigidos al gen hICAM	41
Tabla 2. Esquema de reacción de ligación entre hICAM y PSR ∞ Puro con T4 DNA ligas	42

RESUMEN

Introducción: Las células *Natural Killer* (NK) son linfocitos esenciales del sistema inmunitario innato, capaces de eliminar células tumorales y células infectadas por virus o bacterias sin requerir una activación previa del sistema inmune adaptativo. Su acción se basa principalmente en dos mecanismos: la secreción de citocinas y la citotoxicidad directa. El receptor SLAMF7, perteneciente a la familia SLAM, se expresa en células NK y participa en interacciones homotípicas, actuando su propio ligando como molécula de reconocimiento. En modelos murinos, se ha observado que la función citotóxica mediada por SLAMF7 se encuentra inhibida en ausencia del adaptador EAT-2. Asimismo, se ha documentado que las células tumorales que expresan SLAMF7 junto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) son eliminadas más eficientemente que aquellas que carecen del receptor. Este estudio explora el papel de SLAMF7 en la adhesión celular dentro de la vía de citotoxicidad de las células NK, evaluando cómo la ausencia del adaptador EAT-2 puede modular dicha interacción. **Objetivo:** Evaluar la influencia del receptor SLAMF7 en la adhesión celular de líneas HeLa y su posible papel en la modulación de la citotoxicidad mediada por células NK. **Materiales y Métodos:** Se utilizaron las líneas celulares YT-S (modelo de células NK humanas) y HeLa, modificadas genéticamente para expresar o no los receptores SLAMF7 e ICAM. La expresión de los receptores fue confirmada mediante citometría de flujo. La formación de conjugados celulares se analizó a diferentes intervalos de tiempo (0, 5 y 10 minutos) para determinar el efecto de la coexpresión de SLAMF7 en ambas líneas celulares. Los resultados se procesaron con el software FlowJo y se realizó el análisis estadístico con GraphPad Prism (v10). **Resultados:** Se observó una disminución aproximada del 50 % en la formación de conjugados celulares cuando ambas líneas celulares expresaban SLAMF7, lo que sugiere un posible efecto inhibitorio dependiente de la ausencia del adaptador EAT-2. Sin embargo, al introducir el receptor de adhesión ICAM, se registró una recuperación significativa en la formación de conjugados, lo que indica que ICAM puede compensar la inhibición inducida por SLAMF7, facilitando nuevamente la interacción célula-célula. **Conclusiones:** Los resultados demuestran que SLAMF7 modula la adhesión

celular entre células NK y células tumorales, presentando un efecto inhibitor cuando EAT-2 está ausente. No obstante, la incorporación de receptores de adhesión como ICAM favorece la recuperación de la unión celular, lo que sugiere una cooperación funcional entre SLAMF7 e ICAM en la regulación de la respuesta citotóxica de las células NK.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Célula Natural Killer

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos linfoides innatos (ILC) que se caracteriza por la presencia de gránulos citotóxicos. Su porcentaje en la sangre periférica oscila entre el 5 y el 15 % del total de linfocitos y ejercen una función decisiva en la respuesta inmunitaria. Durante la embriogénesis, su linaje se establece inicialmente en el saco vitelino y posteriormente en la médula ósea, donde derivan de células madre hematopoyéticas CD34+(1). Estudios recientes han puesto de manifiesto que en la vida adulta las células NK también pueden diferenciarse en órganos linfoides secundarios, como las amígdalas, el bazo y los ganglios linfáticos. Los precursores de las células NK atraviesan diferentes etapas de maduración y van incorporando de manera secuencial moléculas de superficie que las distinguen fenotípicamente (2). En el modelo murino, el marcador NK1.1 y en el humano el marcador CD56 funcionan como marcadores para la identificación de estas poblaciones. Las células NK constituyen la primera línea de defensa frente a infecciones virales y colaboran en la vigilancia inmunológica de células neoplásicas. Su característica más sobresaliente radica en la capacidad para identificar y eliminar células que presentan déficit en moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I)(3). Este reconocimiento es mediado por un repertorio amplio de receptores de membrana. Dichos receptores están especificados por genes situados en la línea germinal y se clasifican en activadores e inhibidores. La inducción de un efecto citotóxico o, por el contrario, la preservación celular depende, por lo tanto, de la integración y el balance de estas señales contrapuestas (4).

Las NK convencionales son linfocitos innatos de vida corta que tienen una especificidad, limitada y codificada durante la línea germinal, expresan citotoxicidad natural contra células tumorales, funcionan como células efectoras productoras de citocinas y quimiocinas, debido a la capacidad que tienen para secretar citocinas, las células NK regulan indirectamente la activación de otras células inmunes (5). Por lo general se identifican mediante la expresión de CD56 y la ausencia de CD3, quien es un marcador de células T (TCR). Estudios recientes revelaron que un subconjunto de células NK maduras puede provocar una naturaleza

"adaptativa" de larga vida en el contexto específico de la infección por CMV. Ahora se entiende que las células NK de tipo "adaptativo" expresan el receptor activador NKG2C y que la naturaleza "adaptativa" de las células NKG2C NK se atribuye a la molécula no clásica MHC I HLA-E que presenta un péptido viral específico de CMV a NKG2C (6). Las células NKG2C NK se pueden encontrar en la circulación de individuos seropositivos para HCMV (7).

Las NK pueden subdividirse en dos poblaciones, cada una con funciones efectoras diferentes:

- 1.- NK CD56 bright, el 10% de las células NK totales en circulación, se encuentran principalmente en los tejidos y se caracterizan por la expresión abundante de la molécula CD56. CD56 es un receptor de membrana que participa en la activación y regulación de las células NK (7).

Las células NK CD56 bright secretan grandes cantidades de citocinas, principalmente interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas tienen un papel importante en la respuesta inmune innata, y participan en la defensa contra infecciones, la eliminación de células tumorales y la regulación de la inflamación, desempeñan un papel importante en la respuesta inmune local. Estas células expresan una abundante cantidad de receptores para quimiocinas, lo que les permite desplazarse fácilmente de un sitio a otro (8) (véase Figura 1).

2. NK CD56^{dim}. Esta subpoblación es altamente citotóxica por su abundancia de gránulos líticos y el alto contenido de perforina y granzimas, con potente acción contra células diana. En sangre periférica es la fracción mayoritaria (~90% de las células NK). Fenotípicamente presenta CD56 en baja intensidad, CD16 (Fc γ RIIIa) alto, KIR alto y NKG2A bajo. En términos funcionales, producen IFN- γ y TNF- α tras activación, aunque su capacidad secretora basal es menor que la de las CD56^{bright} (7,8) (véase Figura 1).

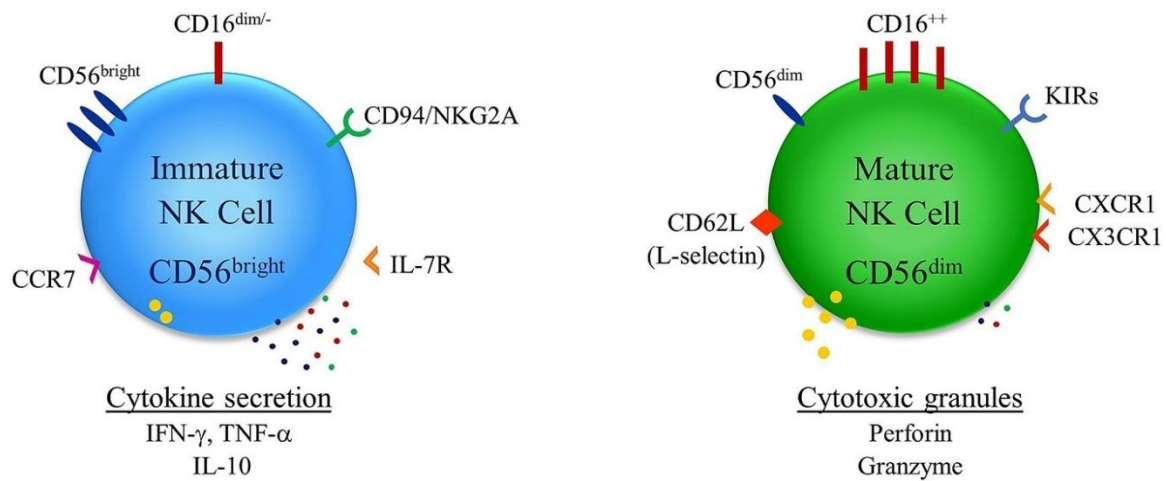


Figura 1. Subpoblaciones de células NK. El panel izquierdo representa las células NK CD56^{bright} (inmaduras): CD16^{bajo/negativo}, NKG2A^{alto}, KIR^{bajo}, expresión de CCR7 y IL-7R, y capacidad secretora elevada de IFN-γ y TNF-α (puntos que emergen de la célula). El panel derecho muestra las NK CD56^{dim} (maduras): CD16^{alto}, KIR^{alto}, NKG2A^{bajo}, presencia de CD62L, CXCR1 y CX3CR1, y gránulos líticos abundantes con perforina y granzimas (puntos intracelulares), lo que se traduce en alta citotoxicidad y menor producción basal de citocinas. Adaptado de Kucuksezer (9)

A pesar de décadas de trabajo, la ontogenia de las células NK en humanos aún no está completamente dilucidada. El modelo lineal sugiere que las células NK maduras surgen de progenitores linfoides comunes (CLP) progresando a través de un continuo lineal (10). El modelo lineal propone que CD56 marca una transición de un estado inmaduro a uno más maduro y que CD56 inmaduro (bright). Las células NK se diferencian aún más en CD56 maduros (dim) poblaciones humanas. La evidencia reciente ha desafiado este modelo y sugiere la posibilidad de un desarrollo más ramificado en forma de CLP y progenitores mieloides comunes (CMP) que dan lugar a progenitores de células NK. El modelo ramificado también propone que distintas poblaciones precursoras se desarrollan de forma independiente en diferentes subconjuntos NK maduros (7,8).

1.2 Mecanismos de activación de las células NK

Las células NK, junto con los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs), constituyen las principales poblaciones efectores contra células malignas y células infectadas, mediando apoptosis dependiente de anticuerpos (11). A diferencia de los CTLs, que requieren un *priming* (**una activación específica por antígeno**) para activar y desplegar diferentes componentes de su arsenal citotóxico, las células NK poseen receptores de origen germinal, tanto activadores como inhibitorios, que les permiten iniciar la citotoxicidad de inmediato. Esta dotación provee a las células NK con la maquinaria necesaria para actuar sin sensibilización previa. La unión de los ligandos a los receptores en la membrana de la célula NK genera una cascada de señales que pueden ser inhibitorias o activadoras, modulando la activación (12). Es el balance entre estas señales que, mediante el cotejo de las interacciones ligando/receptor, determina el destino funcional de la célula NK y su capacidad para iniciar la muerte celular programada en su blanco. Las células no transformadas limitan la producción de ligandos para receptores activadores de las células natural killer (NK), a la par que mantienen un alto nivel de expresión de las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I), que en humanos se denomina antígeno leucocitario humano (HLA)(12). Esta presentación de moléculas MHC I se une a receptores inhibitorios de tipo inmunoglobulina, conocidos como receptores KIR, en las NK, contribuyendo a la inhibición del reconocimiento y la lisis mediada por estas células (13).

Por el contrario, los tumores y las células infectadas inhiben la expresión de moléculas de MHC clase I e inducen los ligandos específicos de los receptores activadores de células NK. Esta combinación provoca la activación de las células NK, bien porque ya no hay señales inhibitorias, bien por la presencia de señales activadoras (14). Las células NK, a su vez, desarrollan su citotoxicidad a través de dos rutas. La primera, la de los gránulos citotóxicos, comienza con la exocitosis de la perforina, proteína que perfora la membrana plasmática de la célula diana. Subsecuente se crea un poro que permite la entrada de las granzimas, serina-proteasas que, ya en el citosol, inducen la apoptosis mediante la activación de caspasas (15). Este proceso, aunque bien caracterizado, presenta un nivel de complejidad que conviene desglosar; a él concurren dineínas, que dirigen el transporte vesicular; proteínas que regulan el tráfico de vesículas; y la polimerización de microfilamentos de actina (16). Todo

el entramado se ensambla en complejos multimoleculares que, junto con los centros organizadores de microtúbulos, dirigen la exocitosis y aseguran que los gránulos líticos se anclen en la célula diana, permitiendo así la eliminación eficaz de la célula comprometedora (15, 16).

En primer lugar, tras la adhesión y la formación de la sinapsis inmunológica, se produce primero una reorganización del citoesqueleto, seguida de la convergencia de los gránulos líticos hacia el centrosoma/MTOC, fenómeno mediado por dineínas, que dirige las vesículas cargadas con perforina y granzimas (16). A continuación, el centrosoma se reposita hacia el sitio de contacto y los gránulos se orientan al punto de lisis; en esta etapa se ensambla un complejo macromolecular en la sinapsis que organiza la polarización del contenido lítico (16,17). En la fase ejecutora, los gránulos se fusionan con la membrana plasmática de la célula NK en la sinapsis, liberando su contenido al hendidillo sináptico en un paso dependiente de Ca^{2+} . La perforina forma poros en la membrana de la célula diana, lo que permite la entrada de granzima A y B al citosol; estas activan nucleasas y caspasas, inducen fragmentación del ADN y culminan en apoptosis de la célula blanco (17). (Ver Figura 2.)

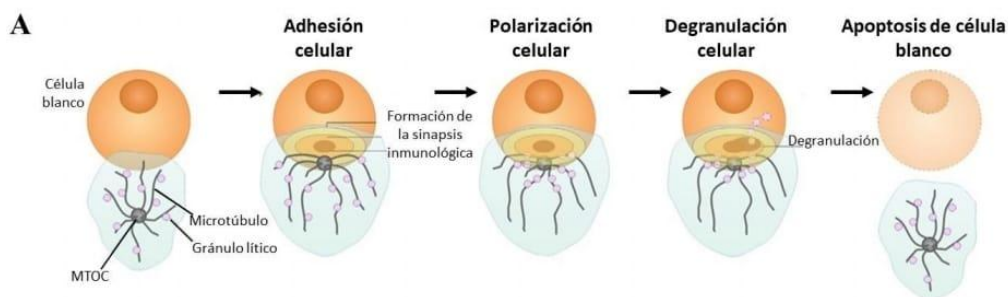


Figura 2. Vía clásica de citotoxicidad NK. Unión del complejo macromolecular de la célula NK a la célula blanco, adhesión celular y formación de la sinapsis inmunológica dan lugar a un proceso de polarización, en el que los gránulos líticos se orientan hacia el punto de contacto. Como resultado, se liberan perforina y granzimas en un proceso conocido como desgranulación, que culmina con la apoptosis de la célula blanco mediada por caspasas. Kabanova A, et al (17).

El segundo mecanismo de citotoxicidad es el que se produce mediante la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En este contexto, las células NK expresan en su membrana los receptores $Fc\gamma RIIC$ (CD32c) y $Fc\gamma RIIA$ (CD16a) que, al unirse al dominio Fc de las inmunoglobulinas que se han fijado a los epítopos presentes en

la superficie de la célula diana, inducen la muerte celular mediada por tres vías diferentes: (i) liberación de gránulos citotóxicos que provocan apoptosis, (ii) activación de la señalización de muerte dependiente de los receptores TNF mediante proteínas TRAIL que sensibilizan a la célula a la muerte celular, y (iii) secreción de citoquinas proinflamatorias que no solo refuerzan la respuesta inmune innata, sino que también contribuyen a la expansión y activación de la respuesta inmunitaria adaptativa a través de la presentación aumentada de antígenos (18).

Si alguno de estos pasos fracasa, la capacidad citotóxica se ve reducida, de modo que las células NK no pueden eliminar las células diana de forma eficaz. A diferencia de los linfocitos T, cuya activación se centra en el receptor de células T (TCR), las células NK utilizan un repertorio diverso de receptores que pueden activar o limitar su respuesta. La interacción entre las señales citoplasmáticas de estos receptores, por tanto, configura la facultad de las células NK de concretar su potencial citotóxico contra las células diana (17,18).

De acuerdo con el modelo funcional de las células NK, el balance entre la ocupación de los receptores de activación y la de los receptores de inhibición determina la respuesta citotóxica de las células. Cuando los receptores de activación interactúan en mayor número con sus ligandos que los de inhibición, se favorece la citotoxicidad; en cambio, si prevalece la interacción de los receptores de inhibición, la activación de las células NK se restringe (19). Las células NK maduras son efectivas en discernir entre células propias y foráneas. La tolerancia hacia las moléculas propias en los diversos tejidos se obtiene mediante un proceso de educación, o licencia, en el que las células NK adquieren la capacidad de distinguir lo propio de lo no propio (18,19). La literatura ha descrito cuatro modelos que explican este reconocimiento. El primero, conocido como licencia y equipamiento, postula que la interacción de los receptores inhibitorios de las células NK con moléculas de MHC-I permite la maduración de éstas, que las vuelve potencialmente citotóxicas. Así, las células NK adquieren tolerancia ante células sanas, pero desarrollan citotoxicidad contra células que presentan un perfil de MHC-I alterado o ausente, como en las células tumorales o infecciosas (20).

El segundo modelo postula que las células NK exhiben un alto grado de reactividad, pero, tras la activación sostenida de sus receptores, entran en un estado de anergia que las desactiva. Sin embargo, dicha actividad citotóxica puede ser reactivada o contenida por la disminución de los receptores de inhibición; este planteamiento se denomina desarme. El tercer modelo sintetiza las premisas de los dos anteriores, sumando la relación entre la capacidad citotóxica de las células NK y la cantidad de moléculas de MHC clase I disponibles para el reconocimiento (20, 21). Cuantos más receptores que pueden inducir señalización se encuentren en la superficie, mayor será el proceso de educación de las células NK, culminando en una tolerancia incrementada hacia las células propias y una citotoxicidad acentuada hacia las células diana; por ello, se reconoce como modelo de Reostato. Finalmente, el modelo de confinamiento integra las aportaciones de los tres anteriores, enfatizando, además, el rol de los receptores de adhesión celular, en particular las integrinas, que participan en la reestructuración del citoesqueleto. De este modo se configura un proceso dinámico que mantiene un control preciso, en el que los receptores de inhibición y activación se combinan con las moléculas de adhesión (22). (Figura 3.)

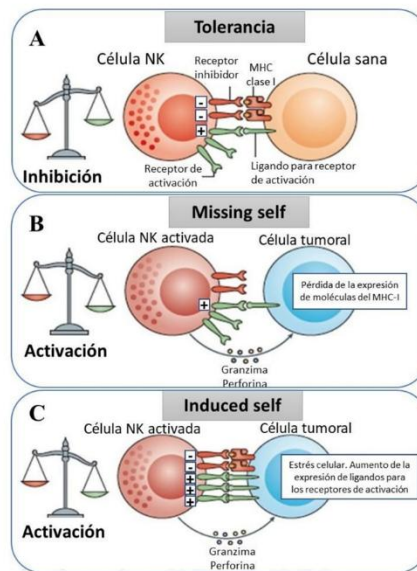


Figura 3. Educación y activación de células NK: A) Tolerancia: la interacción con moléculas del MHC clase I propias activa receptores inhibidores en la célula NK, lo que impide su activación y mantiene la tolerancia frente a células sanas; B) Pérdida de lo propio (missing self): la ausencia o disminución del MHC-I en células blanco impide la señal inhibitoria, lo que permite la activación de la célula NK; C) Inducción de lo propio (induced self): el estrés celular incrementa la expresión de ligandos para receptores activadores, lo que favorece la activación citotóxica de la célula NK. Modificado de Viver et al (23).

1.2.1 Papel de la adhesión celular en la acción de las células NK.

La eficiencia citotóxica de las células NK depende de una adhesión célula-célula precisa y regulada, cuyo núcleo es el eje LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1/2/3, que convierte el reconocimiento en una sinapsis estable (17,19). En reposo, LFA-1 está en low-affinity; tras la activación de receptores se dispara la señalización inside-out (de LFA-1) que activa Rap1-RIAM-talin/kindlin, promoviendo el cambio a high-affinity y aumentando la avidéz de LFA-1 (17,19). Este salto conformacional eleva la probabilidad de conjugación (NK-target) sin reiterar la vía de desgranulación (previamente descrita) (17).

La licensing/education por MHC-I modula esta etapa adhesiva: las células NK licensed traducen mejor las señales de receptores activadores en señalización inside-out (de LFA-1) y forman más y mejores conjugados, mientras que las unlicensed muestran menor conjugación (NK-target) por una deficiencia en la transmisión inside-out, no por fallas intrínsecas de LFA-1 (20,21). Una vez establecido el contacto, la señalización outside-in (de LFA-1) a través de Vav1 y Pyk2, con remodelado de actina, sostiene la despolarización de granulos con eficacia comparable entre licensed y unlicensed siempre que el contacto exista (17,21).

Varios coestimuladores alimentan la señalización inside-out (de LFA-1). DNAM-1 (CD226), al reconocer CD155 (PVR) y CD112, reduce el umbral adhesivo y coopera con las integrinas para estabilizar la sinapsis (17,19). 2B4 (SLAMF4), mediante SAP/EAT-2, potencia la conjugación (NK-target) y refuerza la activación de LFA-1, aunque en ausencia de adaptadores puede amortiguar señales (19). NCRs y NKG2D convergen en PI3K/Vav1/PLC γ y Ca²⁺ para facilitar el cambio conformacional de LFA-1 y la maduración de la sinapsis (17,19).

SLAMF7 (CRACC) tiene un papel destacado: su compromiso en el contacto amplifica la señalización inside-out (de LFA-1) y consolida la sinapsis, especialmente durante ADCC

mediada por CD16 (FcγRIIIa), donde las señales ITAM vía CD3ζ/FcεRIγ integran PI3K/Vav1/PLCγ–Ca²⁺ y dependen de una adhesión sostenida LFA-1–ICAM para mantener el contacto durante la lisis (19). El polimorfismo FCGR3A-158V/F en CD16a modula la afinidad por IgG1 y se asocia con diferentes respuestas a anti-CD20, lo que se traduce, en células NK licensed, en señalización inside-out (de LFA-1) más eficaz y mejor conjugación (NK–target) durante ADCC (18,20).

El microambiente regula este módulo adhesivo: TNF-α, IL-1 e IFN-γ incrementan ICAM-1 en endotelio, epitelio y dianas, facilitando la conjugación (NK–target), mientras que la variación de ICAM-1 en tumores puede dificultar la estabilización de la sinapsis (17). La glicosilación y densidad de ICAM-1, la rigidez de membrana y la organización de actina en la célula diana condicionan la fuerza adhesiva y la potenciación mecánica de la citotoxicidad al potenciar la acción de perforina mediante fuerzas de actina cortical y el retrograde flow de F-actina en la sinapsis (17).

Comparable a esto, en CTL la adhesión se integra en la arquitectura cSMAC/pSMAC/dSMAC dominada por TCR–LAT–SLP76–PLCγ1, donde la fuerza de F-actina dirige y potencia la lisis (17). En células NK, sin TCR, LFA-1 puede sostener señalización outside-in (de LFA-1) para la polarización de gránulos una vez logrado el contacto, con la etapa de señalización inside-out (de LFA-1) fuertemente sintonizada por licensing y coestimulación, y con una contribución determinante de la organización mecánica del dSMAC (17,19–21). Este marco, junto con el estado de educación, explica por qué la misma diana puede ser resistente en un contexto y vulnerable en otro según su paisaje adhesivo y la capacidad de la célula NK para abrir LFA-1 a alta afinidad (17,21).

1.3 Receptores inhibidores

En condiciones normales, los receptores inhibidores de las células NK reconocen las moléculas de MHC clase I, conocidas como HLA clase I en humanos, en las células diana y suprimen la actividad citotóxica. Cuando una célula sufre infección viral o transformación maligna, la reducción de las moléculas de MHC clase I anula la señal inhibidora, lo que

provoca la activación de las células NK y su posterior lisado de la célula diana (24). los receptores inhibidores constituyen el principal mecanismo de control de la activación de las células NK. Dentro de estas moléculas reguladoras, los receptores tipo KIR, que presentan dominios tipo inmunoglobulina y son característicos de los linajes de células NK, se unen a las moléculas de MHC clase I y dictaminan su compromiso (25).

Los receptores KIR, clasificados como receptores tipo inmunoglobulina, dirigen los programas de activación o inhibición de las células NK. Cada KIR está estructurado por dos o tres dominios extracelulares con homología a dominios Ig y presenta una cola citoplasmática que varía entre dos longitudes. La clasificación de KIR se basa en su función neta, resultando en KIR inhibidores y KIR activadores (26). Los KIR inhibidores incorporan un motivo ITIM que, tras la interacción con ligandos, se convierte en un sitio de reclutamiento para la proteína tirosina fosfatasa SHP-1. Llegado a este punto, SHP-1 se fosforila en un residuo de tirosina y, recluta a SHP-1 al ITIM fosforilado vía su dominio SH2, reacciona con la cola citoplasmática de los KIR. Esta fosforilación inicial que modula a SHP-1 promueve su activación y, en un segundo momento, la fosfatasa desfosforila múltiples sustratos, repercutiendo en la supresión del ambiente activador (27).

La proteína SHP-1 ha sido identificada como un regulador clave de Vav1, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina que participa en la remodelación del citoesqueleto de actina. Este proceso es esencial para la formación de la sinapsis inmunológica, una estructura que organiza de forma precisa una secuencia de eventos necesario para la desgranulación de perforinas y gránulos de granzimas, entre otros fenómenos celulares. SHP-1 inactiva Vav1 mediante la de-fosforilación de residuos fosforilados, un mecanismo que interrumpe todas las redes de señalización que transitan a partir de la proteína. Como resultado, la supresión de Vav1 por SHP-1 se traduce en el arresto de las respuestas celulares que dependen de la actividad del intercambiador (26, 28).

Las células NK tienen un repertorio diverso de KIR debido a la expresión aleatoria de genes KIR en cada célula NK. Esto da como resultado varios clones de células NK con distintos patrones de expresión de receptores. En consecuencia, un subconjunto de clones de células

NK puede reconocer un ligando único expresado por una célula tumoral particular. Los receptores KIR constituyen elementos clave de la inmunidad innata, facilitando a las células NK la capacidad de discernir entre células sanas y aquellas que exhiben infección o malignidad (29, 30). Adicionalmente, se ha sugerido que los KIR participan en la modulación de la respuesta inmune adaptativa. Experimentos realizados en modelos murinos han evidenciado que los receptores inhibidores, a través de los motivos ITIM asociados, la activación de fosfatasa y/o la participación de proteínas de la familia SAP son fundamentales tanto para la ontogenia de las células NK como para la propagación de señales reguladoras. Se ha constatado que deleciones en la región intracelular del receptor Ly49A, homólogo del KIR humano, así como mutaciones puntuales en los motivos ITIM, impiden la correcta educación de la célula NK, lo que a su vez priva a la célula de la capacidad de discriminar entre el estado normal y los estados de riesgo. Como consecuencia, las células NK afectadas desarrollan una mayor tendencia a reconocer y atacar células sanas, comprometiendo así el equilibrio de la inmunidad (31).

Por otro lado, la formación de las células NK en condiciones en las que faltan las proteínas adaptadoras que transfieren las señales ITIM resulta, en cambio, en la acumulación de células NK inmaduras que no consiguen realizar funciones citotóxicas efectivas. Esta deficiencia se origina en la incapacidad de los receptores inhibitorios para mediar señales de supresión hacia los efectores NK. En particular, la carencia de las fosfatasas SHP-1, SHIP-1 o de la proteína adaptadora SAP origina un fenotipo hiporreactivo, en el que las células efectores presentan una disminuida probabilidad de eliminar células infectadas o neoplásicas (32). Resulta, por ello, evidente el papel fundamental que la cascada integrada por receptores inhibitorios, dominios ITIM, fosfatasas y proteínas de la familia SAP desempeña en la evolución terminal de las células NK. Más allá de los KIR, estas cualidades se hallan igualmente en una variedad de receptores adicionales que modulan negativamente la efectividad funcional del compartimento NK (32).

KLRG1 constituye un receptor inhibitorio que se manifiesta en las células NK. Su interacción se establece con las cadherinas E, N y R, moléculas normalmente presentes en las células epiteliales. La expresión de KLRG1 presenta un incremento con la edad, lo que podría

relacionarse con la merma de la actividad citotóxica de las células NK en individuos ancianos. Se ha postulado que la disminución de la E-cadherina podría constituir una estrategia útil para potenciar la citotoxicidad de las células NK y atacar de forma más eficaz los tumores de origen epitelial. La E-cadherina, ligando de KLRG1, favorece la actividad inhibidora de este receptor; su reducción conllevaría una disminución en la expresión de KLRG1 y, en consecuencia, una menor inhibición de la activación citotóxica de las células NK (33, 34).

Los receptores LILRB, designados también como receptores de leucocitos de tipo inmunoglobulina (LILR, LILRB *leukocyte immunoglobulin-like receptors B* o CD85), son una familia de receptores inhibitorios expuestos en leucocitos, e incluyen diversas moléculas que interactúan selectivamente con ligandos de tipo MHC clase I. Su expresión en las células NK permite el reconocimiento de moléculas presentadas en células normales, confiriendo a las células NK un mecanismo de autorregulación que limita el ataque a células no alteradas. Entre las diversas variantes de LILRB, los receptores CD85J, CD85D, CD85A, CD85K y CD85C presentan una cola citoplasmática extendida en la que son detectables repeticiones de motivos de inhibición dependientes de tirosina (ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) (35). Estos motivos reclutan las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, las cuales, mediante la de fosforilación de proteínas de tirosina, bloquean la movilización de las cascadas de activación requeridas para la citotoxicidad. El incremento en la densidad de estos receptores LILRB en la superficie de las células NK correlaciona con una disminución de la actividad citotóxica, hallazgo que refuerza la noción de que su participación es determinante en la inhibición de las señales que, de otro modo, inducirían una respuesta citotóxica efectiva. En consecuencia, los receptores LILRB pueden favorecer que la inmunidad no suceda dándole origen a procesos patológicos como el cáncer (36).

Aparte de los mecanismos mediados por ITIM, a los receptores inhibidores también les cabe reunir la proteína adaptadora Crk. Crk, a pesar de ser ampliamente considerada una proteína adaptadora, posee también una actividad cinasa de baja potencia perteneciente a la familia Src, que se traduce en la fosforilación de residuos de tirosina situados en la porción carboxilo terminal de otras proteínas Src. Este evento fosforilante provoca un cambio conformacional

en la proteína blanco que, a su vez, favorece su estado inactivo (37). Cuando Crk dirige la fosforilación de Src, se observa disminución en la señalización proinflamatoria típica de las células NK, dado que su actividad cinasa es esencial para la ejecución de funciones citotóxicas. Modelos murinos en los que se inactiva el gen Crk han puesto de manifiesto que la carencia de esta proteína se traduce en una actividad citotóxica incrementada en las NK debido a una menor capacidad para facilitar la inhibición de las cinasas Src. En consecuencia, se mantiene un estado de activación funcional sostenido en estas células (38).

Los receptores de la familia NKG2 comprenden un grupo de proteínas que pueden actuar tanto como receptores inhibidores como activadores, contienen dominios similares a lectinas tipo C y se asocian en dímeros con la molécula CD94. Una característica común de los tres miembros NKG2A, NKG2C y NKG2D, es su capacidad para unirse a HLA-E, una molécula de HLA de clase I no clásica. NKG2A es el único receptor de la familia que transmite señales de inhibición; su dominio citoplasmático se caracteriza por una prolongación en el extremo carboxilo que contiene múltiples motivos ITIM (Inhibitory receptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), los cuales actúan como sitios de reclutamiento para la fosfatasa SHP-1 y modulan la actividad de la célula (39). Las mediciones de su expresión indican que NKG2A es altamente representado en las fases tempranas de la maduración de las células NK; sin embargo, su nivel se reduce de forma marcada a medida que las células se diferencian hacia un fenotipo citotóxico terminal, un hecho que influye en su capacidad de destrucción efectiva de células diana en esos estadios avanzados (40).

Actualmente carecemos de una comprensión exhaustiva de los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales estos receptores imponen restricción a la actividad de las células NK y, si bien se postula que la acción de cada uno de ellos se caracteriza por la atenuación de un paso inicial en las cascadas de señalización iniciadas por los receptores de activación, permanecen aún indefinidas las sucesiones de fenómenos celulares que los receptores inhibitorios inducen y que, a su vez, determinan la programación de la respuesta efectora (41).

1.4 Receptores activadores

Como se ha mencionado previamente, la activación funcional de las células NK depende de un delicado equilibrio entre las señales inhibitorias y las activadoras, mediado por la interacción de receptores específicos con sus correspondientes ligandos. La mayoría de los receptores activadores de las células NK presentan un patrón de expresión constitutiva, aunque su nivel de expresión puede incrementarse o decrecerse durante la activación celular. Dichos receptores se dirigen a ligandos que, en condiciones normales, se encuentran en células sanas, permitiendo a las células NK discriminar entre células diana y células propias (42). El perfil de expresión de estos receptores también puede ser influenciado por la concentración y la variedad de citocinas presentes en el microambiente. La función de los receptores activadores consiste en modular la cascada de eventos celulares requeridos para que las células NK no sólo ejecuten sus funciones efectoras, sino también regulen procesos tales como la secreción de citocinas proinflamatorias, la proliferación, la adhesión y la diferenciación celular. Al igual que sus homólogos inhibitorios, los receptores activadores de las células NK son codificados por el genoma germinal (43). El primer grupo de receptores mediadores de la activación fue constituido por los receptores de citotoxicidad natural (NCR, por su sigla en inglés), cuyos componentes transmembrana incluyen NKp46, NKp44, NKp30, y, en ocasiones, otras isoformas. La funcionalidad de dichos receptores depende, fundamentalmente, de la asociación con la cadena común de la subunidad gamma del receptor para la inmunoglobulina o, alternativamente, de la interacción con las cadenas de la proteína ζ . Tanto la cadena gamma común y la cadena ζ , ejercen la función de proteínas adaptadoras, ya que por sí solas carecen de actividad enzimática (44).

Las proteínas que aquí se analizan participan en el reclutamiento y la activación de efectores que actúan aguas abajo en la señalización celular. Su función depende de una secuencia de aminoácidos altamente conservada en la que se encuentran dos residuos de tirosina susceptibles de fosforilación. Esta secuencia es el motivo de activación basado en tirosina para receptores de inmunidad (ITAM, por sus siglas en inglés). Los receptores de citotoxicidad natural logran reconocer ligandos que van desde proteínas virales y tumorales hasta moléculas solubles, modularizando, de este modo, la actividad citotóxica de las células NK (44). Junto a estos, las células NK expresan otros receptores de activación que pertenecen a familias distintas. Entre ellos figuran NKG2C y NKG2D, que integran el subgrupo dos del

grupo NKG2. Estos receptores, como los NCR, se asocian, de forma no covalente, a proteínas adaptadoras como DAP-10 y DAP-12, que en el dominio citoplasmático presentan el fragmento YINM y el dominio ITAM, respectivamente (45).

La mayoría de las células NK expresan NKG2D, que se une a ligandos tales como MIC-A y MIC-B; estas moléculas de la familia MHC de clase I se inducen en la superficie celular tras situaciones que causan estrés. NKG2D se une además a las proteínas ULBP1, ULBP2, ULBP3 y ULBP4, las cuales son inducidas en la superficie de células tumorales, incluidas leucemias, carcinomas y melanomas. La amplia gama de ligandos que activan el NKG2D confiere a este receptor un papel clave en la vigilancia de células malignas por parte de los linfocitos NK. La capacidad de NKG2D para detectar múltiples, y a menudo estresados, elementos virales o tumorales maximiza su efectividad en el control del crecimiento tumoral (46, 47).

En el pináculo de la señalización de los receptores activadores de células NK se encuentra la quinasa de la familia Src Lck, que fosforila directamente el motivo YINM en DAP10 y los motivos ITAM dentro de DAP12, CD3 ζ y Fc ϵ RI γ . En el caso de NKG2D/DAP10, la fosforilación de DAP10 por Lck conduce al reclutamiento de los complejos p85/PI3K y Grb2/Vav1, que luego median la señalización aguas abajo. Por el contrario, la fosforilación de tirosina de ITAM por Lck conduce al reclutamiento de tirosina quinasas ZAP70 o SYK que, posteriormente, la tirosina fosforila otras moléculas de señalización, incluidos adaptadores y enzimas, para promover la señalización que conduce a la producción de citocinas y citotoxicidad. El miembro de la familia Src, Fyn, también está involucrado a través de su fosforilación del motivo de interruptor inmune basado en tirosina (ITSM) que se encuentra en la molécula coestimuladora 2B4 (41.48)

Este evento de fosforilación mejora aún más las vías de señalización involucradas por otros receptores activadores e incluye la fosforilación de Vav1 y PLC γ 2. PLC γ 2 está críticamente involucrado en la citotoxicidad de las células NK y la producción de citocinas, ya que es el productor clave de dos segundos mensajeros a través de la escisión de PI (4, 5), P2 ubicado en la valva interna de la membrana plasmática a diacilglicerol (DAG) e IP3(49).

Mientras que DAG participa en la activación de la vía PKC-NF κ B y Ras-MAPK, IP3 estimula el retículo endoplásmico para liberar su reserva luminal de Ca²⁺ al unirse al receptor IP3 localizado en ER, que a su vez conduce a la interacción de ITSM con el canal de calcio activado por liberación de calcio que conduce a una afluencia de calcio extracelular en la célula (Figura 4). Este aumento en el Ca²⁺ intracelular afecta varios procesos celulares, incluida la activación de varias enzimas, proteínas involucradas en la dinámica del citoesqueleto de actina F y la activación del factor de transcripción NFAT, que está involucrado en la expresión génica del interferón- γ (50).

1.4.1 Receptores de citotoxicidad natural (NCRs: NKp30, NKp44 y NKp46)

Los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) —NKp30 (NCR3), NKp44 (NCR2) y NKp46 (NCR1)— constituyen un eje cardinal del reconocimiento “por estrés” que realizan las células NK frente a células transformadas o infectadas. NKp46 y NKp30 se expresan ampliamente en células NK en reposo, mientras que NKp44 es típicamente inducible por citocinas como IL-2/IL-15. Estructuralmente, son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas y, pese a carecer de actividad catalítica en sus colas citoplásmicas, se acoplan no covalentemente a adaptadores portadores de ITAM —CD3 ζ , Fc ϵ RI γ o DAP12— mediante interacciones en el dominio transmembranal (véase Figura 4). Esta arquitectura modular hace que la salida funcional dependa no solo de la densidad de NCRs, sino también del repertorio de adaptadores disponibles en cada célula NK (51 y 52) .

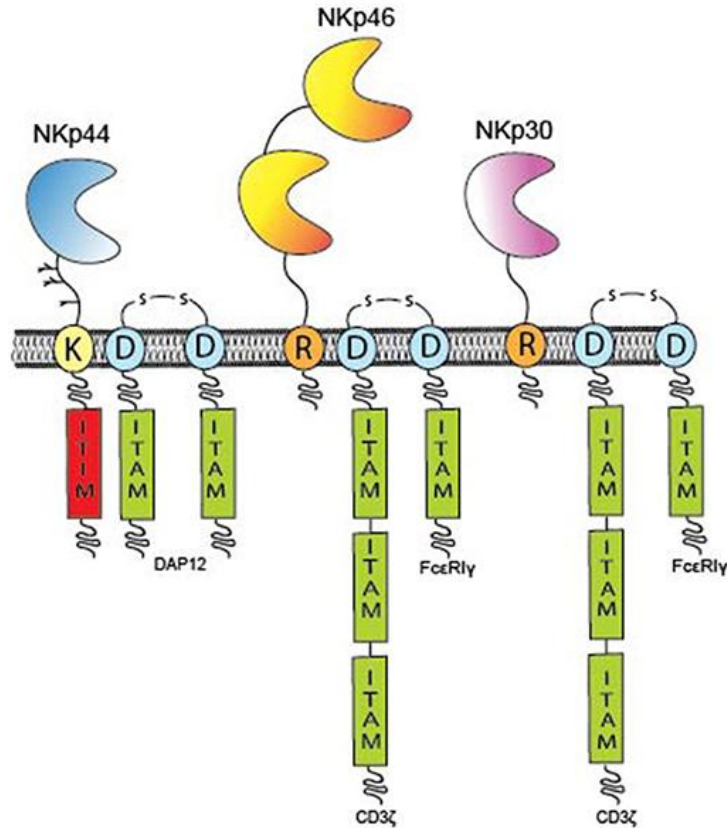


Figura 4. NCRs activando señalización vía adaptadores ITAM (CD3 ζ /FcR γ o DAP12)
 Representación de las estructuras transmembranales de NKp30, NKp46 (asociados a CD3 ζ /FcR γ) y NKp44 (asociado a DAP12), destacando los motivos ITAM que median la señalización interna. Barrow et al., 2019 (53)

En cuanto a ligandos, NKp30 reconoce determinante es inducidos por estrés como B7-H6 y BAT3/BAG6; NKp44 interactúa con varios ligandos de superficie y con PCNA expuesto en la membrana plasmática (pese a ser una proteína típicamente nuclear), una interacción que puede traducirse en señal inhibitoria según la isoforma y NKp46 reconoce hemaglutininas virales y determinantes glicosilados. Proteoglucanos de heparán sulfato actúan como correceptores que facilitan el acercamiento al blanco. Este paisaje es dinámico: tumores avanzados pueden reducir o “desprender” (shedding) ligandos (por ejemplo, B7-H6), atenuando el reconocimiento por NCRs y favoreciendo la evasión inmunitaria. La diversidad de isoformas también modula el resultado: NKp30a/b se asocian a perfiles activadores, mientras NKp30c se ha vinculado a respuestas reguladoras; NKp44-1 contiene un ITIM funcional capaz de convertir ciertos encuentros en señales inhibitorias (54, 55).

En los NCRs, la transducción ocurre a través de sus adaptadores ITAM: tras el entrecruzamiento con el ligando, quinasas Src fosforilan los ITAM y se reclutan Syk/ZAP-70, activando un programa que culmina en desgranulación y producción de citocinas; la cascada canónica (PLC γ 2, DAG/IP $_3$, Ca $^{2+}$, NFAT/NF- κ B/MAPK) ya se describió en detalle en el §1.4 y no se repite aquí. Funcionalmente, los NCRs se integran en el balance de señales con coestimuladores (NKG2D, DNAM-1, 2B4) y receptores inhibidores (KIR, CD94/NKG2A). Además, su activación favorece el crosstalk con integrinas, potenciando la señal inside-out de LFA-1 (CD11a/CD18) vía Rap1–talin/kindlin, lo que incrementa la afinidad por ICAM-1/2/3 y consolida la sinapsis NK–diana (52 y 56).

1.4.2 Receptores NKG2D y NKG2C

NKG2D se expresa ampliamente en células NK humanas y se asocia de manera no covalente con DAP10, cuyo motivo YINM recluta tras fosforilación los complejos p85/PI3K y Grb2/Vav1, promoviendo la reorganización del citoesqueleto y la desgranulación. Sus ligandos más caracterizados —MICA/B y ULBP1–4, entre otros— son moléculas inducidas por estrés y daño genómico, de modo que su presencia en la superficie de células tumorales o infectadas funge como una “señal de peligro” que dispara la activación de las células NK (57). Esta interacción es altamente sensible al contexto tisular: estímulos inflamatorios y la activación de vías de respuesta a daño del ADN pueden aumentar la transcripción y el transporte a membrana de ligandos de NKG2D, mientras que condiciones inmunosupresoras tienden a reducir su disponibilidad (58) (Figura 5).

La plasticidad tumoral y viral genera mecanismos de evasión que atenúan la señal de NKG2D. Entre los más frecuentes se encuentra el shedding de MICA/B por metaloproteasas (p. ej., ADAMs), que libera formas solubles capaces de secuestrar el receptor o de inducir su “downregulation” en la superficie de las células NK, disminuyendo la citotoxicidad (46, 59). De manera análoga, proteínas virales pueden retener o desviar ligandos hacia compartimentos intracelulares para impedir su exposición. Aun así, cuando NKG2D se activa de forma robusta, coopera con coestimuladores como DNAM-1 y con la adhesión mediada por integrinas para estabilizar el contacto efector–diana y conducir a una lisis eficiente (60,61).

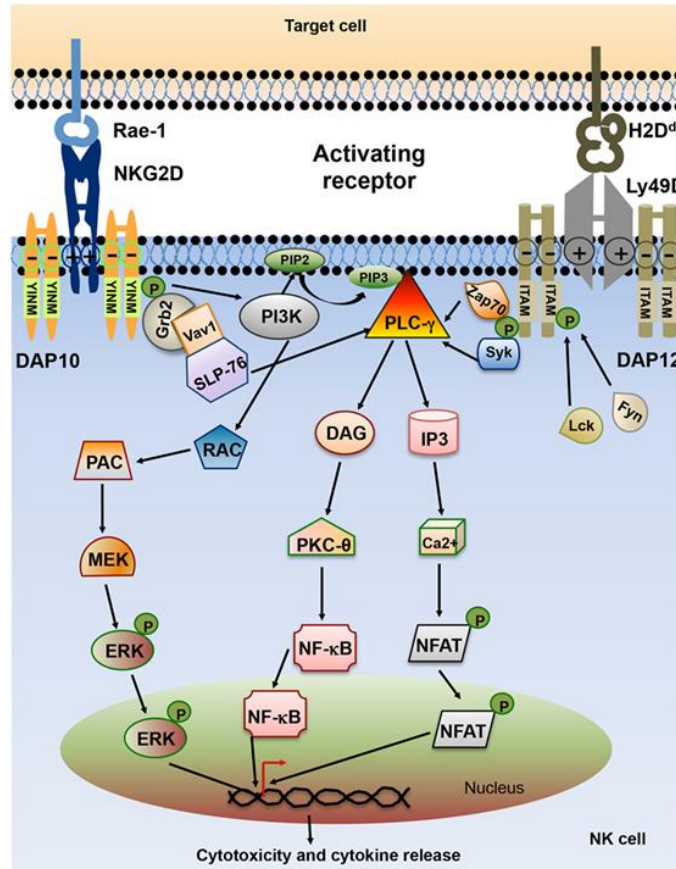


Figura 5. Comparativa esquemática de la señalización de NKG2D (DAP10, YINM, PI3K/Grb2-Vav1) frente a NKG2C (CD94–NKG2C–DAP12, ITAM, Syk/ZAP-70) en células NK. La parte izquierda (azul) muestra la vía de activación de NKG2D a través de DAP10 (motivo YINM) que recluta PI3K y Grb2-Vav1, conduciendo a desgranulación y producción de citocinas. La parte derecha (verde) emula la señalización tipo NKG2C–DAP12 con ITAM, activando Syk/ZAP-70 y PLC-γ → DAG/IP₃ → Ca²⁺. Martínez-Lostao L et al (62)

NKG2C, en contraste, forma heterodímeros con CD94 y reconoce HLA-E, una molécula de MHC-I no clásica que presenta péptidos derivados de proteínas virales y de señales de estrés. La activación de NKG2C se apoya en el adaptador DAP12, portador de ITAM, con reclutamiento de Syk/ZAP-70 y convergencia hacia PLCγ2–Ca²⁺–NFAT/NF-κB, configurando una salida efectora potente (63). En humanos, la exposición a HCMV se asocia con la expansión de subpoblaciones “adaptativas” de células NK NKG2C⁺, caracterizadas

por cambios epigenéticos, mayor capacidad de ADCC y perfiles funcionales de larga vida; estas células muestran una respuesta especialmente eficaz frente a dianas que exhiben HLA-E cargado con péptidos de origen viral o de estrés (64).

1.4.3 Otros receptores coestimuladores (DNAM-1, 2B4, CD16)

DNAM-1 (CD226) es un coestimulador central que potencia la activación iniciada por receptores como NKG2D y los NCRs. Sus ligandos PVR/CD155 y nectina-2/CD112 se expresan en numerosos tumores y en células sometidas a estrés, facilitando la formación de la sinapsis inmunológica y la desgranulación. En el punto de contacto efector–diana, DNAM-1 coordina la dinámica de actina, coopera con integrinas para sostener la adhesión y modula el umbral de activación. La pérdida de DNAM-1 o el predominio de vías competidoras que comparten ligandos (como TIGIT o CD96, con afinidades diferenciales por CD155) se asocian a hiporreactividad de las NK y a evasión tumoral (65).

2B4 (SLAMF4/CD244) reconoce CD48 y pertenece a la familia SLAM. Su salida funcional es contexto-dependiente porque se apoya en adaptadores de la familia SAP (SAP/EAT-2): en presencia de estos, 2B4 coestimula y favorece la desgranulación; cuando faltan, puede volverse inhibidor al acoplarse a fosfatasa, modulando negativamente la respuesta. A nivel celular, 2B4 facilita la conjugación con la diana, refuerza la activación inside-out de LFA-1 y contribuye a la estabilidad de la sinapsis, ubicándose en la interfase entre reconocimiento y ejecución. La densidad de CD48 en la célula blanco y el repertorio de adaptadores en la célula NK determinan la dirección y magnitud de la señal(66).

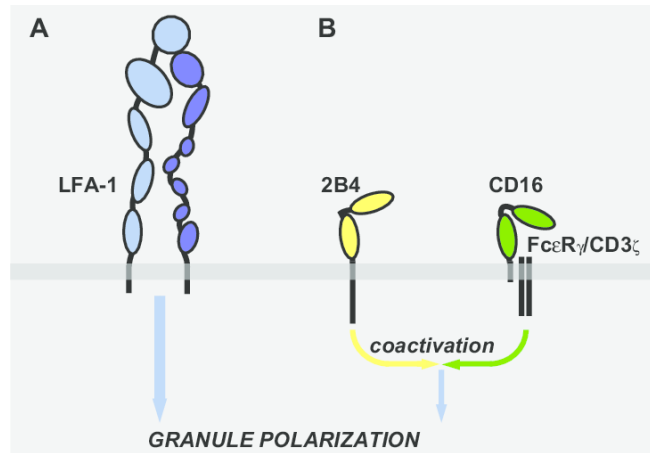


Figura 6. Sinapsis ADCC mediada por CD16 y cooperación con LFA-1. La figura ilustra dos mecanismos capaces de inducir la polarización de gránulos líticos en células de la neoplasia conocidas como células NK. (A) El vínculo de LFA-1 con ICAM-1 es adecuado para fomentar la polarización incluso en células NK en estado de reposo. Alternativamente, una señal sinérgica proveniente de CD16 y 2B4 puede inducir polarización en la ausencia de LFA-1. Estos mecanismos representan trayectos divergentes, pero funcionalmente convergentes para guiar el aparato citotóxico hacia la célula objetivo. Bryceson et al., 2006 (60).

CD16 (FcγRIIIa) media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) al reconocer regiones Fc de IgG1/IgG3 unidas a antígenos en la superficie de la diana. Señaliza a través de CD3ζ/FcεRIγ (motivos ITAM) con reclutamiento de Syk/ZAP-70 y activación de PLCγ2, lo que genera aumento de Ca²⁺, desgranulación y producción de citocinas (67). La eficacia de esta vía depende de una adhesión estable proporcionada por integrinas como LFA-1–ICAM, que mantienen el contacto mientras se ejecuta la lisis; además, factores como la glicosilación del Fc (por ejemplo, afucosilación que incrementa la afinidad por CD16a) y el shedding de CD16 durante la activación modulan finamente la potencia de la ADCC. En conjunto, DNAM-1, 2B4 y CD16 conforman un brazo coestimulador que eleva la probabilidad de superar el umbral de activación y traduce la señal en una sinapsis funcional y una citotoxicidad eficaz (68).

1.4.4 Integrina LFA-1 y su ligando ICAM en células NK: del reconocimiento a la ejecución citotóxica y su cooperación con SLAMF7

En la respuesta efectora de las células NK, el tránsito desde el reconocimiento inicial hasta la lisis de la célula diana exige un contacto estable y altamente organizado. Ese “anclaje funcional” lo proporciona la integrina LFA-1 (αLβ2=CD11a/CD18), cuya ligadura principal

son las moléculas de adhesión intercelular (ICAM), en particular ICAM-1 (CD54), pero también ICAM-2 (CD102) e ICAM-3 (CD50). LFA-1 se expresa en la superficie de todos los leucocitos —incluidas células NK, T citotóxicas, neutrófilos y macrófagos— y opera como un nodo que convierte señales de activación en adhesión firme, formación de la sinapsis inmunológica y desgranulación dirigida. Desde la perspectiva de la inmunovigilancia, uno de los primeros pasos es la adhesión dependiente de LFA-1 a la célula diana; esta adhesión no es constitutiva, sino que se dispara por señalización “inside-out” proveniente de receptores activadores de células NK (entre otros, NKG2D, DNAM-1, 2B4, NCRs y CD16) que incrementa afinidad y avidéz de LFA-1 y permite el acoplamiento inicial. En modelos clásicos, estas señales promueven el cambio conformacional de la integrina desde un estado cerrado a una conformación extendida de alta afinidad, aumentando su capacidad para unirse a ICAM y sostener el contacto célula–célula (69, 70).

Una vez que LFA-1 se une a ICAM en la superficie de la diana, se gatillan señales “outside-in” que remodelan el citoesqueleto e integran la maquinaria citotóxica. La activación de Vav1 y Pyk2, la reorganización de actina y el flujo intracelular de Ca^{2+} coordinan la polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el tráfico de gránulos líticos hacia el punto de contacto, pasos necesarios para la exocitosis de perforina y granzimas que culmina en apoptosis de la célula diana (71). La relevancia funcional de este módulo adhesivo es tal que el bloqueo con anticuerpos de LFA-1 o de ICAM-1 reduce de forma marcada la conjugación NK–diana y anula la lisis, tanto en células NK como en CTL. En el microambiente inflamatorio, además, citocinas como TNF- α , IL-1 e IFN- γ aumentan la expresión de ICAM-1 en células endoteliales, epiteliales y diversas células blanco, facilitando la conjugación; a la inversa, múltiples tumores disminuyen o desprenden (shedding) ICAM-1 como mecanismo de evasión, lo que dificulta la estabilización de la sinapsis (72).

En este escenario, SLAMF7 (CD319/CRACC) destaca como un coestimulador particularmente relevante para células NK. Cuando se compromete en el contacto celular, favorece la activación “inside-out” de LFA-1, estabiliza la sinapsis inmunológica y potencia la desgranulación. Esta cooperación es crítica durante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por CD16, en la que la unión sostenida LFA-1–ICAM

mantiene el contacto efector–diana mientras se ejecuta la lisis (73). Dado que los detalles moleculares de la señalización de la familia SLAM (incluida la organización de ITSM y el papel de los adaptadores SAP/EAT-2, así como la posibilidad de señales inhibitorias por acoplamiento alterno) aunque el efecto neto observado en NK: SLAMF7 amplifica la eficacia del módulo LFA-1–ICAM durante la fase efectora y contribuye a convertir el reconocimiento en muerte dirigida de la célula diana. Esta sinergia explica, además, parte del desempeño de estrategias terapéuticas que explotan SLAMF7 en oncología (p. ej., anticuerpos monoclonales), donde la adhesión integrínica es imprescindible para sostener la respuesta citotóxica (74).

En conjunto, el eje LFA-1–ICAM no es un mero “pegamento” estructural: es un módulo de adhesión-coestimulación que integra señales provenientes de receptores activadores de células NK y las canaliza hacia la ejecución citotóxica. Su cooperación con SLAMF7 refuerza la sinapsis, mejora la polarización de gránulos y asegura la desgranulación eficaz, mientras que su regulación por el entorno inflamatorio y por tácticas de evasión tumoral determina buena parte del resultado final de la interacción NK–célula diana (75).

1.5 SLAM

La familia de receptores de la molécula de activación linfocítica de señalización (SLAM) es un grupo de glicoproteínas transmembranales de tipo I que se expresan en células de origen hematopoyético lo que significa que se expresan en células como las células NK, las células T, los macrófagos y las células B, denominados SLAMF1 (CD150; SLAM), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (Ly-9; CD229), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (Ly108; NTB-A; CD352), SLAMF7 (CRACC; CS1; CD319), SLAMF8 (BLAME; CD353) y SLAMF9 (CD84-H1; SF2001; CD2F10) (76). Las moléculas de la familia SLAM son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) siendo que cada molécula SLAM presenta un segmento fuera de la célula compuesto por dos dominios de tipo Ig (V-lvariable y C2- constante), una región transmembrana y una cola citoplasmática con varios motivos que contienen tirosina (ITSM). Dentro de esta disposición estructural, la singularidad recae en SLAMF3, el cual presenta en su región extracelular cuatro dominios semejantes a la

inmunoglobulina. Asimismo, SLAMF2, SLAMF8 y SLAMF9 no poseen dominios ITSM (77).

La señalización del receptor SLAM en células inmunitarias varía según el tipo celular, y las respuestas suelen depender de la presencia o ausencia de dos proteínas adaptadoras de la familia SLAM: EAT-2 y SAP (76, 77). Las células del sistema inmunitario cuentan entre 3 y 5 receptores de la familia SLAM que poseen motivos ITSM. Dentro de las moléculas SLAM se encuentran proteínas adaptadoras que funcionan como inhibidores y activadores y pertenecen a la familia SAP (76, 77). Los complejos SLAM/SAP y SLAM/EAT-2 establecen una interacción directa con la cinasa de la familia Src Fyn y la fosfolipasa Cg, respectivamente, desencadenando una señal de activación en estas células del sistema inmunitario. Las enzimas Src llevan a cabo la fosforilación de los dominios ITSM de los receptores SLAM, lo cual favorece la interacción entre las proteínas SAP y EAT-2. En su mayoría, los receptores SLAM muestran interacciones homofílicas, lo que implica que un receptor identifica como ligando a otra molécula de idéntica naturaleza expresada en una célula receptora (76, 77).

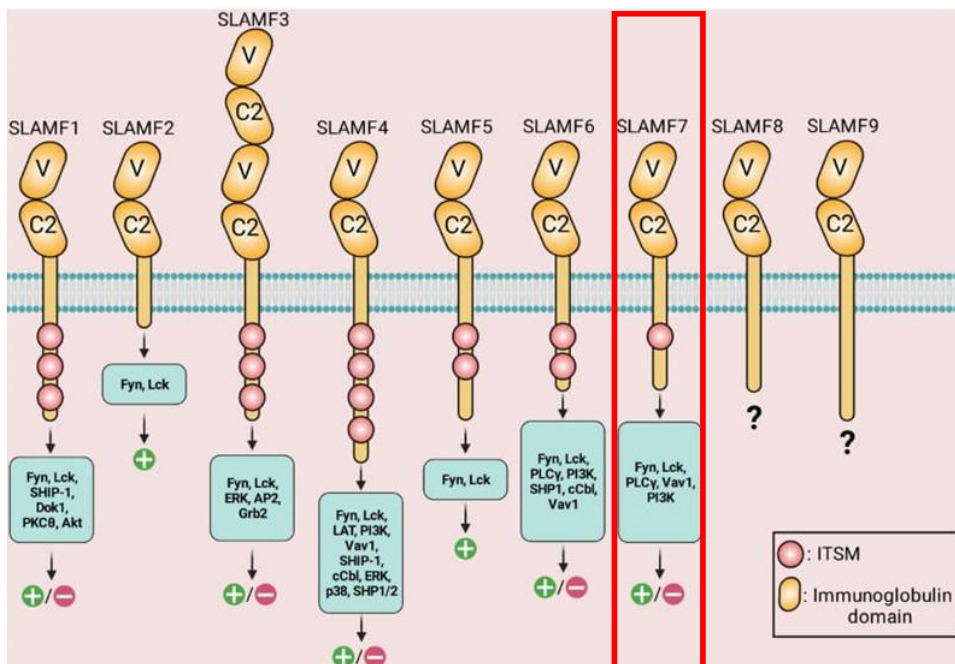


Imagen 7. Receptores de la familia SLAM en células inmunitarias: Receptores glicoproteicos transmembranales de tipo I pertenecientes a la familia SLAM, denominados SLAMF1 (CD150;

SLAM), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (Ly-9; CD229), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (Ly108; NTB-A; CD352), SLAMF7 (CRACC; CS1; CD319), SLAMF8 (BLAME; CD353) y SLAMF9 (CD84-H1; SF2001; CD2F10) Modificado de Farhangnia P. et al. (77)

La mayoría de los receptores de la familia SLAM establecen interacciones homofílicas, en las cuales cada receptor reconoce como ligando a una molécula idéntica expresada en otra célula del sistema inmunitario. Por ejemplo, SLAMF7 se une a SLAMF7 y Ly9 (SLAMF3) a Ly9, promoviendo la comunicación célula a célula y la coordinación de respuestas inmunitarias (78). El único que exenta esta regla es el receptor 2B4 (SLAMF4), que interactúa de manera heterofílica con CD48 (SLAMF2), una glicoproteína presente en la superficie de diversas células hematopoyéticas (78). Estas interacciones de afinidad entre los receptores SLAM cumplen un papel crucial en la regulación funcional de las células Natural Killer. En particular, la interacción SLAMF7–SLAMF7 favorece la formación de sinapsis inmunitarias entre células NK, lo que potencia la transmisión de señales intracelulares y promueve su actividad citotóxica (77, 78).

La relación entre 2B4 y CD48 es relevante para el desempeño de las células NK. CD48 es una molécula presente en células en buen estado, por lo tanto, la conexión entre 2B4 y CD48 contribuye a que las células NK no ataquen a las células sanas (78). Los receptores SLAM son exclusivos de las células de origen hematopoyético, por lo tanto, se hallan presentes en células como las células asesinas naturales, las células T, los fagocitos y las células B, y se activan mediante las interacciones que ocurren entre las diversas células sanguíneas. Como ejemplo, los receptores SLAM participan activamente en la modulación de la citotoxicidad de las células NK, facilitando el reconocimiento y la eliminación de células infectadas o con transformación neoplásica. (78).

El hallazgo del gen responsable del síndrome linfoproliferativo tipo I (XLP) condujo al descubrimiento de la proteína adaptadora SAP y su relevancia en el control de la actividad de los receptores pertenecientes a la familia SLAM, los cuales se vinculan y activan mediante su unión con las proteínas adaptadoras de la familia SAP (79). En el caso de los seres humanos, este grupo está compuesto por dos integrantes conocidos como SAP (acrónimo en inglés de SLAM-Associated Protein) y EAT-2 (Ewing's Sarcoma-Associated Transcript-2),

cuya función resulta esencial para la regulación de las señales mediadas por los receptores SLAM (79). Al igual que los receptores pertenecientes a la familia SLAM, su presencia se limita al sistema hematopoyético, ya que se expresan en linfocitos T y B, células NK, macrófagos y células dendríticas (78,79). Ambos miembros de la familia de adaptadores SAP en humanos, SAP y EAT-2, están compuestos por aproximadamente 132 aminoácidos, que contienen un dominio SH2 y una región C-terminal de 20-30 residuos (79). Se ha comprobado que la comunicación entre los receptores SLAM y las proteínas SAP se lleva a cabo mediante la acción de las quinasas de la familia Src, en particular Fyn, las cuales fosforilan las tirosinas ubicadas en los motivos ITSM, promoviendo la unión de SAP y EAT-2 a través del dominio SH2 (79). En conjunto, las enzimas Src-quinasas añaden grupos fosfato a los dominios ITSM de los receptores SLAM, lo cual favorece la interacción estable y funcional entre las proteínas SAP y EAT-2, permitiendo la transducción eficiente de señales inmunorreguladoras (78,79).

Las proteínas SAP y EAT-2 comparten un 47% de similitud en su estructura, sin embargo, presentan atributos particulares. En la posición 78 de SAP se encuentra una arginina crucial para su unión con la cinasa de tirosinas Fyn y estimular la activación en las células del sistema inmunitario. EAT-2 presenta dos residuos de tirosina en su extremo carboxilo, uno en la posición 120 y otro en la posición 127. Estas tirosinas pueden ser activadas por las enzimas cinasas Src, lo que se cree que facilita su unión con proteínas efectivas en la cascada descendente (80).

Además, los fenotipos observados en ratones carentes de diferentes integrantes de la familia SLAM han evidenciado que los receptores SLAM controlan diversos sucesos a nivel celular, abarcando desde la formación celular, la viabilidad celular, la unión, la respuesta inmunitaria humoral, la fagocitosis, la citotoxicidad, e incluso se han asociado con mecanismos autoinmunes (78). Tal y como se ha indicado previamente, las proteínas adaptadoras pertenecientes a la familia SAP desempeñan una función crucial al facilitar la unión entre los receptores de la familia SLAM y fomentar la transmisión de señales de activación (79). Además, se ha comprobado que, en caso de no haber expresión de las proteínas adaptadoras, los receptores pertenecientes a la familia SLAM tienen la capacidad de transmitir señales; sin embargo, a diferencia de las señales generadas en presencia de las proteínas adaptadoras

SAP, estas son de naturaleza inhibitoria (79). Es conocido que, cuando las proteínas de la familia SAP no están presentes, los receptores pertenecientes a la familia SLAM tienen la capacidad de atraer y poner en funcionamiento a las enzimas SHP-1 y SHIP-1, la primera elimina grupos fosfato de residuos de tirosina, mientras que la segunda actúa sobre fosfolípidos (79). 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 (78,79).

De forma destacada, las alteraciones en el gen que controla la producción de la proteína SAP (SH2D1A) provocan una deficiencia inmunológica ligada al cromosoma X (XLP1, enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X). Esta modificación genética resulta en una mayor vulnerabilidad a las infecciones causadas por el virus de Epstein-Barr (EBV) y en la aparición de un síndrome linfoproliferativo, una condición inmunológica clasificada como una inmunodeficiencia primaria (79). Los individuos con mutaciones en SH2D1A muestran una incapacidad significativa o limitada para producir la proteína SAP, en caso de que se sintetice. En condiciones fisiológicas normales, el virus de Epstein-Barr penetra en los linfocitos B maduros, pero en individuos sanos con un sistema inmunitario competente, las células T CD8⁺ y las células NK eliminan de manera efectiva los linfocitos infectados (79). Sin embargo, los individuos que presentan alteraciones genéticas en el gen SH2D1A muestran una disminución marcada en la capacidad de sus células T y NK para destruir células infectadas, lo que conduce a una proliferación anormal de linfocitos y desregulación inmunológica (79,80).

Después, dichas células tienen la capacidad de penetrar en la médula ósea, promoviendo la aparición de otros trastornos como el síndrome de hemofagocitosis linfohistiocitaria (HLH por sus siglas en inglés), otra enfermedad grave de inmunodeficiencia que suele manifestarse en la niñez (81). La presencia de este tipo de enfermedades motivó un análisis más exhaustivo de SAP, evidenciando su participación en los mecanismos de unión entre células (82). Por lo tanto, la falta de SAP pone en riesgo el procedimiento de unión de las células. Es importante tener presente que la unión entre células es fundamental para eliminar las células objetivo,

ya que si no se logra la formación de uniones celulares, se podría impedir la respuesta inmune de las células y, en consecuencia, favorecer la aparición de infecciones perjudiciales (81,82).

En este contexto, y con el objetivo de investigar de forma más detallada estas proteínas, se han desarrollado diversos modelos celulares y animales que han posibilitado comprender los distintos procesos que son controlados por los receptores SLAM y las proteínas SAP (78-80). De manera interesante, estos modelos han posibilitado evidenciar que, cuando no está presente SAP, EAT-2 y/o ERT, los receptores SLAM adquieren la capacidad de actuar como receptores con efectos inhibidores significativos (78-80). Por lo tanto, el entorno ambiental durante la interacción de los receptores SLAM es crucial para definir si estos receptores estimulan o bloquean la activación en las células del sistema inmunológico (78,80). De igual manera, estos diseños también posibilitaron la recreación del fenotipo detectado en individuos con alteraciones en el gen SH2D1A (79,81). En dicho escenario, la carencia de la proteína SAP (usando modelos murinos knockout) disminuye de forma notable la habilidad citotóxica de las células NK (79-81).

En la actualidad, se tiene conocimiento de los procesos moleculares mediante los cuales los receptores pertenecientes a la familia de SLAM facilitan señales de inhibición. Estos procesos parecen implicar la atracción de las enzimas fosfatasas SHP-1, SHP-2 o SHIP-1, las cuales, al contar con dominios SH2, también podrían ser atraídas por las tirosinas fosforiladas presentes en los motivos ITSM (78,79). Se ha sugerido que la enzima Csk, conocida como cinasa C-terminal de la Src (Csk por sus siglas en inglés), podría estar siendo atraída hacia los sitios ITSM. Csk estimula la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia Src en la región terminal de la cadena de carbono, provocando una alteración en la estructura de la proteína objetivo y su subsiguiente desactivación, lo que resulta en la regulación negativa de la activación de las células del sistema inmunitario (78,79). No obstante, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para validar estas teorías. Además, los receptores SLAM pueden inhibir cuando no están presentes SAP o EAT-2: los ITSM fosforilados reclutan SHP-1/SHP-2 o SHIP-1, y posiblemente Csk, lo que reduce la señalización activadora (78,79). Cuando SAP/EAT-2 sí están disponibles, impiden ese acoplamiento a fosfatasas y desatan vías activadoras (SAP-Fyn-Vav1; EAT-2-PLC γ 2-Ca²⁺) (79,80). SLAMF7 ilustra esta

dicotomía: activo con EAT-2, inhibidor en su ausencia (78,80). En consecuencia, las proteínas adaptadoras pertenecientes a la familia de SAP han sido categorizadas no solo como proteínas que estimulan señales de activación celular, sino también como reguladores moleculares que interrumpen la capacidad de los receptores SLAM para inducir señales de inhibición (78,79). A pesar del extenso estudio que evidencia la importancia de los receptores SLAM y las proteínas SAP en células del sistema inmunológico, existe escasa información acerca del papel específico que desempeñan la mayoría de los receptores SLAM en las diversas células presentes en el organismo humano (78,82).

1.5.1 SLAMF7

El receptor perteneciente a la familia de Moléculas de Activación de Señalización Linfocítica (SLAM), específicamente el Miembro 7 (CRACC; identificado también como CS1, CD319, SLAMF7). La proteína SLAMF7 se encuentra principalmente en células NK, linfocitos T, células B activadas y macrófagos, tanto en ratones como en seres humanos. Este receptor tiene la capacidad de potenciar la actividad citotóxica de las células NK. La conexión entre el receptor SLAMF7 presente en las células diana y la célula NK es una interacción homóloga que regula su función citotóxica. La configuración de este receptor específico se corresponde con la establecida en la familia SLAM, presentando únicamente un motivo de tirosina (ITSM) en su región citoplasmática como se muestra en la Figura 8 (83).

El receptor SLAMF7, presente en células NK de ratones, ha mostrado potenciar la capacidad citotóxica de las células NK contra células diana de origen hematopoyético. En el caso de que la proteína adaptadora EAT-2 no esté presente, SLAMF7 activa señales de inhibición que disminuyen la capacidad citotóxica de las células NK, tal como se muestra en la Figura 9 (84).

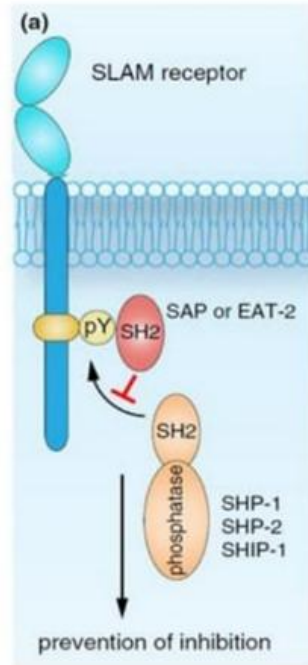


Figura 8. Mecanismo de señalización del receptor SLAMF7. También denominado CD319, CRACC o CS1, es un receptor transmembranral perteneciente a la familia de las moléculas de señalización de activación linfocítica (SLAM). Modificado de Wu y Veillette (83)

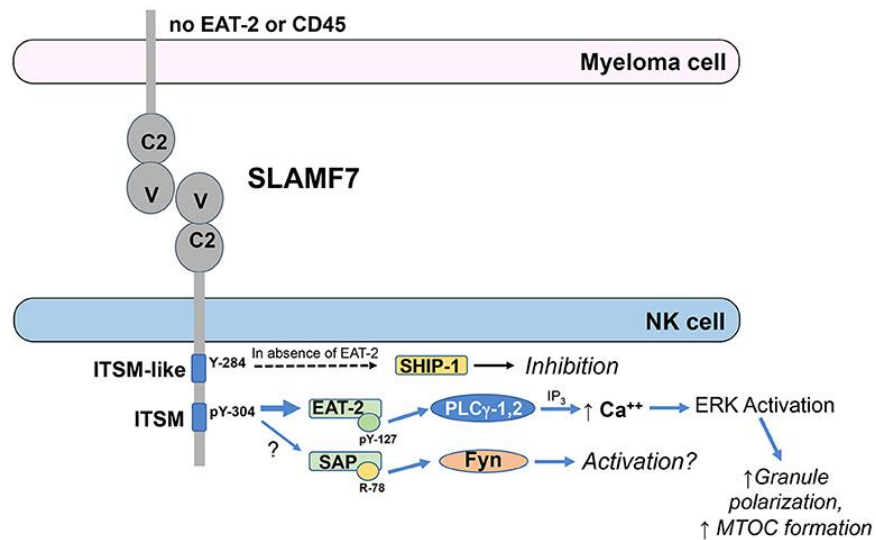


Figura 9. señalización del receptor SLAMF7.

Esquema del funcionamiento del receptor SLAMF7 en células NK según la presencia de EAT-2: su fosforilación y unión a EAT-2 activa la vía de PLC- γ y desencadena citotoxicidad; en ausencia de EAT-2, el reclutamiento de SHIP-1 induce señal inhibitoria. Adaptado de Campbell KS et al. (84)

Recientemente se han caracterizado con mayor detalle los mecanismos intracelulares mediante los cuales SLAMF7 estimula la activación de las células NK. Este receptor induce una liberación intensa de gránulos citotóxicos y potencia las funciones efectoras de las células NK a través de una vía dependiente de la proteína adaptadora EAT-2, que promueve la fosforilación de la tirosina 304 (Y304) dentro de su motivo ITSM y activa las rutas de señalización PLC- γ , Ca²⁺ y ERK (84). De forma complementaria, se ha demostrado que la interacción homotípica SLAMF7–EAT-2 también desencadena la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, la cual contribuye a la producción de citocinas y a la regulación de la apoptosis celular (85). Esta doble señalización refleja la naturaleza bimodal del receptor SLAMF7, capaz de generar respuestas activadoras o inhibitorias según la disponibilidad de EAT-2. En condiciones donde EAT-2 está ausente, pero no SAP, SLAMF7 se acopla a la fosfatasa SHIP-1 y transmite señales inhibitorias que reducen la capacidad citotóxica de las células NK. En conjunto, estos mecanismos confirman que la activación coordinada de las vías PLC- γ y PI3K por SLAMF7 es esencial para optimizar la respuesta citotóxica y la funcionalidad efectora de las células NK (84,85).

La región citoplasmática del receptor SLAMF7 murino (mSLAMF7) contiene dos residuos de tirosina fosforilables, localizados en las posiciones 261 (Y261) y 281 (Y281), cada uno asociado con funciones específicas. La tirosina 281, incrustada en un motivo ITSM, es responsable del reclutamiento de la proteína adaptadora EAT-2, lo que desencadena la activación de las células NK mediante las vías de señalización PLC- γ y PI3K/Akt (85). En contraste, la tirosina 261 parece mediar un efecto inhibitoria a través del acoplamiento de la fosfatasa SHIP-1, particularmente en ausencia de EAT-2, fenómeno descrito como un mecanismo de modulación negativa de la citotoxicidad de las células NK (84,85). El receptor SLAMF7 muestra una expresión marcadamente superior en las células de mieloma múltiple en comparación con las células NK, observándose más de tres veces su nivel de expresión. Actualmente se investigan los procesos regulatorios, tanto transcripcionales como epigenéticos, que podrían explicar la sobreexpresión de SLAMF7 en células tumorales (85).

Se tiene constancia de que el anticuerpo monoclonal anti-SLAMF7 (HuLuc63) bloquea la unión de las células MM a las células estromales, disminuyendo así la viabilidad de las

células MM (85). Desarrolla una actividad destructiva significativa contra las células MM, lo que resulta en la destrucción de tumores. Muestra actividad frente a las células de mieloma múltiple a través de la citotoxicidad desencadenada por anticuerpos (ADCC) llevada a cabo por las células NK tanto en entornos de laboratorio como en organismos vivos (85-86). Identifica un sitio de unión en el dominio IgC2 cercano a la membrana de la proteína SLAMF7 (84) y presenta dos mecanismos de acción fundamentales (85). En primer lugar, se une principalmente a la proteína SLAMF7 en las células de mieloma múltiple y luego elimina estas células mediante la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) a través del receptor Fc-gamma (FcγR) III (CD16) activado por las células NK (85-86). En una segunda instancia, estimula de forma directa a las células asesinas naturales para erradicar las células de mieloma múltiple (85). La activación de estas células desencadena una respuesta de señalización de calcio a través de los receptores Nkp46 y NKG2D, prescindiendo de CD16 (84). Además, este anticuerpo potencia la interacción SLAMF7-SLAMF7 entre las células asesinas naturales y las células de mieloma múltiple, lo que resulta en la destrucción de estas últimas por parte de las células asesinas naturales (84-85).

La activación de las células NK, mediada por señales provocadas por EAT-2 mediante la interacción SLAMF7-SLAMF7, persiste en un estado de incertidumbre debido a las insuficiencias de SAP y EAT-2 en células MM. En las células NK que presentan una carencia de EAT-2, SLAMF7 provoca la fosforilación de la tirosina de SHIP-1 a través de la activación de las Src quinasas dependientes de CD45, lo que interfiere con la función de las células NK (86). La inhibición de la señalización mediante SLAMF7 y SHIP-1 es esencial para el inicio de la señalización a través de la activación de la cinasa Src mediada por CD45. Además, en células MM que carecen de CD45, SLAMF7 no puede interactuar con SHIP-1 y, por ende, la señal inhibidora mediada por SLAMF7-SHIP-1 no se induce en estas células (86). Aunque la expresión de receptores inhibidores se restringe únicamente a las subpoblaciones específicas dentro del grupo de células NK, estos pueden co-expresarse con otros receptores inhibidores dentro de la misma célula, generando una amplia diversidad fenotípica y funcional en la población. Esta co-expresión permita una modulación más certera de la intensidad de las señales inhibitorias y activadoras, determinando respuestas heterogéneas frente a distintos estímulos. En consecuencia, cada célula NK exhibe un patrón

único de receptores y una capacidad de respuesta particular determinada por sus combinaciones específicas de interacciones receptor-ligando (87).

Según investigaciones recientes, se ha comprobado que los receptores SLAM y las proteínas adaptadoras de la familia SAP desempeñan una función fundamental en el control de las respuestas del sistema inmunitario, interviniendo en la estimulación de las células, la regulación de las señales y la erradicación de células afectadas por infecciones o cáncer. Específicamente, se ha descubierto que SLAMF7 actúa como un receptor capaz de generar conexiones homotípicas entre células activas y células objetivo, lo que favorece la unión entre células, un paso fundamental para la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (86). La unión está condicionada a la presencia de conectores como EAT-2, cuya falta puede hacer que SLAMF7 actúe como un transmisor de señales que inhiben, impactando la firmeza de la interacción inmunológica. Se ha notado que los receptores pertenecientes a la familia SLAM exhiben una variedad de expresiones y combinaciones en distintas subpoblaciones de células NK, lo que resulta en una gran diversidad funcional en sus relaciones con las células objetivo (87). Otra investigación indican que SLAMF7 podría influir en la interacción entre células del sistema inmunitario al activar vías intracelulares que requieren la participación de PI3K y NF- κ B, las cuales están relacionadas con la adhesión celular y la reacción inflamatoria (85). En su totalidad, estos descubrimientos subrayan la relevancia de profundizar en la investigación del rol de SLAMF7 en los procesos de unión celular, con el propósito de entender su impacto en la capacidad citotóxica y el control de la actividad de las células NK dentro del ámbito inmunológico.

2. Pregunta de investigación

¿Cuál es el papel de SLAMF7 en el mecanismo de adhesión celular en la célula NK?

3. Hipótesis

El receptor SLAMF7 tiene un papel inhibitorio en la adhesión celular dentro de la vía de citotoxicidad de la célula NK.

4. Objetivo general

Evaluar el papel de SLAMF7 en la adhesión celular dentro de la vía de citotoxicidad de la célula NK.

4.1 Objetivos Específicos

- Determinar si SLAMF7 participa en la inhibición de la adhesión celular en células NK.
- Determinar si SLAMF7 participa en la inhibición de la adhesión de células NK con sobreexpresión de ICAM.

5. Materiales y métodos

Diseño experimental y construcción genética

Diseño de oligos

Se diseño un par de oligos para amplificar hICAM. Los primers fueron flanqueados con la secuencia de reconocimiento correspondiente a la enzima de restricción EcoRI;

la secuencia se obtuvo de NCBI. Posteriormente las secuencias fueron ingresadas en el programa en línea Primer-BLAST de donde se obtuvieron los oligos. Antes de mostrar los oligos, el programa realiza un alineamiento múltiple de la secuencia de cada posible oligo con el resto de las secuencias en la base de datos del genoma de humano de NCBI, lo que asegura que al momento de realizar las amplificaciones el producto sea específico del gen en cuestión.

Tabla 1. Parámetros de diseño de oligos dirigidos al gen hICAM

OLIGOS	hICAMEcoRIFW	HICAMEcoRIREV
Secuencia	CAG TGA ATT CGC TAT GGC TCC	CGA TGA ATT CGG TTC AGG GAG
Concentración	206.1 Pmol/uL	212.3 Pmol/uL
Temperatura de alineación.	Tm:72.8	Tm: 72.8

PCR por punto final

Se llevó a cabo la amplificación de una secuencia de ADN mediante un ciclo repetido de desnaturalización y replicación. Se añadieron 1µl de ADN PSR ∞ Puro/ICAM (94 ng/µl) a la mezcla de reacción que contenía 1µl del iniciador FW hICAMEcoRI (10 mM), 1µl del iniciador REV hICAMEcoRI (10 mM), 5µl del tampón PFU+ Mg 10x, 1µl de DNTPs, 1µl de Taq polimerasa PFU (2.5 u/µl) y agua destilada estéril, en una cantidad suficiente para completar un total de 50µl. La reacción se realizó en un termociclador Bioevopeak MINI PCR siguiendo las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1.6 minutos, y un paso final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 0,8 % durante 1.5 horas a 100 V.

Digestión

Se digirieron 3 μl del vector PSR ∞ Puro (94 ng/ μl) con 2.5 μl de enzima EcoRI (10 u/ μl) en presencia de 5 μl Buffer EcoRI 10x y agua destilada estéril en cantidad suficiente para completar 50 μl de reacción, durante 2 horas a 37°C.

Se digirieron 40 μl del inserto hICAM (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con 2.5 μl de enzima EcoRI (10 u/ μl) en presencia de 5 μl Buffer EcoRI 10x y agua destilada estéril en cantidad suficiente para completar 50 μl de reacción, durante 2 horas a 37°C.

Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al .8 % durante una hora y media a 100 V.

Ligación

El vector PSR ∞ Puro digerido con EcoRI se incubo con 1 U de la enzima CIAP y 5.5 μl del Buffer de fosfatación 10x durante 30 minutos a 37°C, a continuación, se agregó 1 U más de enzima CIAP y se incubo 30 minutos a 37°C.

Se incubo el inserto hICAM con el vector PSR ∞ Puro en presencia de 5 U con Enzima T4 DNA Ligasa (400,000 u/mL), Buffer T4 DNA Ligasa 10x durante 12 horas a 16°C.

Tabla 2. Esquema de reacción de ligación entre hICAM y PSR ∞ Puro con T4 DNA ligasa

	1	2	3	4
Vector	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
Inserto	0 μl	0 μl	5 μl	13 μl
H2O	14 μl	13 μl	8 μl	0 μl
Enzima	0 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Total	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl

Concentración vector PSR ∞ Puro (24 ng/ μl); Concentración inserto hICAM 20 ng/ μl

Transformación con bacterias competentes *E. Coli* cepa 1116

Se generaron previamente células competentes de *E. coli* cepa 1116, las cuales fueron transformadas con el plásmido PSR ∞ Puro/hICAM mediante el procedimiento de choque térmico (30 minutos sobre hielo, 2 minutos a 42 °C, 2 minutos sobre hielo). Las células transformadas se recuperaron en 1 mL de medio LB (10 g/L de NaCl, 10 g/L de Bacto Peptonas, 5 g/L de extracto de levadura), se cultivaron a 37 °C con agitación a 150 rpm durante 1 hora y se diluyeron 1:10. De esta suspensión se plaquearon 600 μ L sobre placas de LB-Agar (10 g/L de NaCl, 10 g/L de Bacto Peptonas, 5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de agar), suplementado con ampicilina (1 μ L del antibiótico a 100 mg/mL por cada 1 mL de medio). Las placas se incubaron en condiciones graduales, manteniéndose primero 5 horas a 37 °C y luego 7 horas a temperatura ambiente.

Miniprep

Se aislaron colonias de la cepa PSR ∞ Puro/hICAM y se inocularon en un medio de cultivo de 2 mL de LB suplementado con 2 μ L de ampicilina (100 mg/mL), incubándose a 37 °C con agitación continua a 180 rpm durante 12 horas. Posteriormente, se aisló el plásmido utilizando el kit GeneJet Plasmid Miniprep de Thermo Scientific. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 11.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente y el pellet obtenido se suspendió en 200 μ L de Solución de Resuspensión, que contiene ribonucleasa. Se añadieron 200 μ L de Solución de Lisis alcalina y se homogeneizaron por inversión durante cinco a diez veces. Se incorporaron 300 μ L de Solución de Neutralización, que contiene ácido acético, y se volvió a mezclar por el mismo método. La suspensión se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a una columna GeneJet. Se centrifugó la columna a 13.000 rpm durante 1 minuto y se desechó el flujo. Se añadieron 400 μ L de Solución de Lavado, que contiene etanol de grado biológico, y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 1 minuto, desechándose de nuevo el flujo. Se adicionaron 50 μ l de agua ultrapura (mili-Q, estéril y filtrada) al núcleo de la columna, se mantuvo la incubación durante 1 minuto a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos a la misma temperatura. El ADN resultante se conservó a 4 °C.

Digestión con EcoRI

Validación de la construcción mediante mapeo por restricción.

Para verificar la correcta obtención de la construcción PSR ∞ Puro/hICAM, se realizó un análisis de restricción en dos etapas. En un primer momento, se utilizó la enzima EcoRI como estrategia de tamizaje inicial para confirmar la integración del inserto en el vector, Tras identificar las clonas positivas, se procedió a realizar una segunda digestión diagnóstica con la enzima Nco I con el objetivo de determinar la orientación del inserto (sentido 5' 3'). Esta enzima se seleccionó debido a que su patrón de corte permite diferenciar inequívocamente entre una inserción funcional y una invertida.

Se digirieron 10 µl de la construcción vector PSR ∞ Puro (94 ng/ µl) inserto hICAM (1 µg/ mL) con 1 µl de enzima EcoRI (10 u/ µl) en presencia de 2.5 µl Buffer EcoRI 10x y agua destilada estéril en cantidad suficiente para completar 20 µl de reacción, durante 2 horas a 37°C.

El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al .8 % durante una hora y media a 100 V.

Se escogieron las construcciones positivas para construcción PSR ∞ Puro/hICAM.

Digestión con Nco I.

Se digirieron (200 ng) de la construcción 10 µl PSR ∞ Puro/hICAM de las colonias de bacterias aisladas con 2 µl del Buffer Tango 10x, 1 µl de la enzima Nco I (10 u/ µl) y agua destilada estéril en cantidad suficiente para completar 20 µl de reacción, durante 2 horas a 37°C.

Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa al .8 % durante 1 hora y media a 100 voltios (V).

Se escogió la construcción positiva y con dirección correcta (5' 3') y se realizó Maxiprep.

Maxiprep

Se seleccionó una colonia positiva, cuya dirección correcta había sido determinada previamente, y se inoculó en un matraz que contenía 300 mL de medio LB y 300 µL de ampicilina a 100 mg/mL. Posteriormente, se cultivó a 37 °C a 180 rpm durante 12 horas. La extracción de plásmidos se llevó a cabo utilizando el GeneJET Plasmid Maxiprep Kit de Thermo Scientific. Las células bacterianas del cultivo se recolectaron y se sometieron a centrifugación a 3800 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El pellet formado se suspendió cuidadosamente en 12 mL de Solución de Resuspensión, que contenía RNasa, y después se añadieron 12 mL de Solución de Lisis, que consiste en bicarbonato sódico y NaOH, mezclando suavemente por inversión. La incubación se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 minutos.

A la mezcla se incorporaron 12 mL de Solución de Neutralización agitándose de 5 a 10 veces y a continuación se añadieron 90 mL de Reactivo de unión a Endotoxina, debiendo promoverse la mezcla por inversión de 5 a 10 veces y manteniéndose la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras este paso, se adicionaron 45 mL de Solución de Lavado, repitiéndose una mezcla por inversión de 5 a 10 veces. Finalmente, se incorporaron 15 mL de Solución de Elusión, recolectando el eluyente en un tubo Falcon de 50 mL para posterior análisis.

Se incorporaron 0,7 volúmenes (10.5 mL) de isopropanol a la muestra. Posteriormente, la muestra recolectada se transfiere mediante una jeringa de 30 mL, utilizando un filtro de 0,2 µm, se centrifuga, se decanta el sobrenadante y el mismo se añade a la jeringa que contiene la solución de etanol endotoxina libre al 70%. Tras decantarse nuevamente el sobrenadante, se añade 1 mL de agua miliQ estéril y el conjunto se recoge en un tubo Eppendorf.

Expresión de moléculas en líneas celulares

Cultivo de línea celular HeLa parental

La línea celular HeLa parental se cultivaron en medio DMEM (Gibco™ Advanced DMEM Medium), enriquecido con 5 % de suero fetal bovino, L-glutamina, estreptomicina y penicilina. En una incubadora a 37 °C con atmósfera humidificada, 36 % de humedad relativa

y 5 % de CO₂. El recuento celular y el análisis de viabilidad se efectuaron en cámara de Neubauer, empleando la solución de azul de tripano al 0,4 % de Gibco.

Transfección directa con lipofectamina 2000 (Invitrogen™).

Para la expresión de hICAM en las células HeLa m. SLAMF7, se utilizó el vector retroviral PSR ∞ Puro, un constructo bicistrónico que incorpora un cassette de resistencia a puromicina. La secuencia codificante de hICAM fue insertada en el vector PSR ∞ Puro mediante digestión con la enzima EcoRI. Tras la obtención de la construcción, se verificó mediante análisis de restricción y, confirmado el resultado, el plásmido fue utilizado en la transfección de la línea HeLa m. SLAMF7.

En placas de cultivo de 60 mm, se sembraron 1,5 millones de células HeLa m. SLAMF7, las cuales se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante y se reemplazó por medio fresco. Se transfectaron con 10 µg de ADN plasmídico obtenido mediante el kit Maxi Prep, correspondiente a hICAM en PSR ∞ Puro, destinado a la sobreexpresión de hICAM. La transfección se llevó a cabo en medio OPTI-MEM (Gibco™) y se utilizó 10 µg de Lipofectamine 2000 (Invitrogen™) por cada condición.

Transfección directa con lipofectamina 2000 (Invitrogen™).

Para la expresión de hICAM en las células HeLa m. SLAMF7, se utilizó el vector retroviral PSR ∞ Puro, un constructo bicistrónico que incorpora un cassette de resistencia a puromicina. La secuencia codificante de hICAM fue insertada en el vector PSR ∞ Puro mediante digestión con la enzima EcoRI. Tras la obtención de la construcción, se verificó mediante análisis de restricción y, confirmado el resultado, el plásmido fue utilizado en la transfección de la línea HeLa m. SLAMF7.

En placas de cultivo de 60 mm, se sembraron 1,5 millones de células HeLa m. SLAMF7, las cuales se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante y se reemplazó por medio fresco. Se transfectaron con 10 µg de ADN plasmídico obtenido mediante el kit Maxi Prep, correspondiente a hICAM en PSR ∞ Puro, destinado a la

sobreexpresión de hICAM. La transfección se llevó a cabo en medio OPTI-MEM (Gibco™) y se utilizó 10 µg de Lipofectamine 2000 (Invitrogen™) por cada condición.

Las células HeLa m. SLAMF7 modificadas con SLAMF7 exhiben inhibición de la adhesión celular debido a la sobreexpresión de este receptor, que interfiere presumiblemente con vías de adhesión dependientes de ICAM (molécula de adhesión intercelular humana). Para probar si la transfección con el gen hICAM restaura esta función, se generaron líneas estables HeLa m. SLAMF7/hICAM mediante transformación bacteriana inicial para amplificar el plásmido recombinante, seguido de transfección en células eucariotas. Esta aproximación permite un control genético preciso y cuantificable de la expresión de hICAM.

Expresión m. SLAMF7 en línea celular YT-S

La línea celular YT-S es un modelo experimental de linfocitos NK humanos, que ha obtenido la inmortalidad celular por transfección de telomerasa, y que fue generada por el Dr. James L. Strominger y su grupo de investigación en Harvard en 1985. Su origen celular procede de una biopsia de médula ósea de un paciente diagnosticado con enfermedad de Hodgkin.

- Presentan el fenotipo NK **CD56+** CD16+.
- Exhiben citotoxicidad espontánea mediada por perforinas y granzimas.
- Expresan receptores clásicos de NK como NKG2D y DNAM-1, y **carecen del adaptador EAT-2.**
- Su fenotipo y actividad funcional pueden ser mantenidos en **cultivos de larga duración.**

Para evaluar la expresión de SLAMF7. La línea celular YT-S, se tiñeron con anticuerpo específico para SLAMF7 (anti- mouse CD319), acoplado con un fluorocromo PE (Fitoeritrina).

Expresión m. SLAMF7 en líneas celulares HeLa

Para analizar la expresión de SLAMF7. La línea celular HeLa, se tiñeron con anticuerpo específico para SLAMF7 (anti-mouse CD319), acoplado con un fluorocromo PE (Fitoeritrina).

Expresión GFP en líneas celulares HeLa

La línea celular HeLa parentales no expresan GFP sin embargo HeLa GFP es una línea celular transducida en el vector retroviral bicistrónico que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), no se marca con fluorocromo ya que en el citómetro la señal de GFP se puede analizar por la fluorescencia de la proteína. Al igual que la línea celular HeLa GFP, la línea celular HeLa GFP- m. CRACC tiene fluorescencia para GFP y así se puede detectar en el citómetro sin acoplar un fluorocromo.

Expresión ICAM en líneas celulares HeLa

Para evaluar la expresión de ICAM en líneas celulares HeLa. Las líneas celulares HeLa, se tiñeron con un anticuerpo específico para ICAM (anti-CD54) acoplado a un fluorocromo (pacific blue).

Análisis de expresión mediante citometría de flujo

Anticuerpos y citometría de flujo.

Los anticuerpos utilizados en este estudio incluyen anticuerpos de BioLegend: anti-mouse CD56 (mSLAMF7) (4G2, acoplado al fluorocromo alofocianina (APC), anticuerpo específico para SLAMF7, (anti- mouse CD319), acoplado con un fluorocromo PE (Fitoeritrina), anticuerpo específico para ICAM (anti-CD54) acoplado a un fluorocromo (pacific blue).

Las muestras fueron adquiridas en el citómetro BD FACSCanto II, IBT, UNAM. El análisis estadístico se realizó con el programa Flowjo y el programa GraphPadPrism versión 10.

Ensayos funcionales

Formación de conjugados celulares

Las células YT-S fueron marcadas con anticuerpo anti-CD56 conjugado con APC (aloficocianina), todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo y bajo protección de luz durante 30 min. Tras el marcado, se lavaron y se re-suspendieron a 5×10^5 células/mL. Para el ensayo, se tomaron 100 μ L de esta suspensión y se incubaron con 100 μ L (2×10^5 células) de líneas celulares HeLa SLAMF7- (HeLa GFP) o HeLa SLAMF7+. Justo después se centrifugaron a 500 rpm durante 3 min a 4 °C. Los co-cultivos fueron incubados a 37°C durante 0, 5, 10 o 20 min, transcurridos los cuales se recuperaron, se vortexearon durante 1 segundo a máxima velocidad y se añadió 300 μ L de paraformaldehído frío al 0.5 % para detener la reacción. A continuación, las muestras fueron almacenadas a 4 °C y protegidas de luz. La adquisición se llevó a cabo en un analizador de flujo (citómetro BD FACSCanto II, IBT, UNAM) y el porcentaje de células CD56⁺ GFP⁺ se empleó como parámetro para determinar la formación de conjugados celulares (YT-S: HeLa). Los datos se analizaron con el software FlowJo y el análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPadPrism versión 10.

6. Resultados

Presencia de SLAMF7 en línea celular YT-S.

La expresión del receptor de superficie m. SLAMF7 se determinó por citometría de flujo se realizó en la línea parental YT-S y en una línea derivada YT-S m. SLAMF7. La línea parental carece de m. SLAMF7, por lo que como se vé en la Figura X, izquierda, sólo el 1% de los eventos presentaron niveles de fluorescencia de PE dentro del rango de positividad. Por su parte, el 99.8% de las células YT-S m. SLAMF7 mostraron niveles de fluorescencia dentro de los niveles considerados positivos (Figura 15, derecha). Estas Figuras corresponden a experimentos representativos y, como se describirá después, esto permitirá evaluar las interacciones homotípicas entre células.

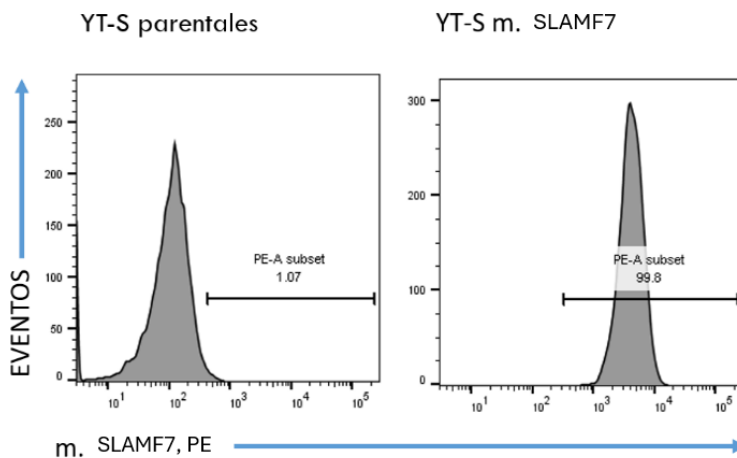


Figura 10. Comparación de la expresión de m. SLAMF7 en células YT-S nativas y transfectadas. Se muestran experimentos representativos.

El panel izquierdo (YT parentales) exhibe una expresión basal baja de SLAMF7, con un pico marcado en valores bajos de fluorescencia. En contraste, el panel derecho (YT-SLAMF7) muestra una sobreexpresión clara, con el pico desplazado hacia valores altos, confirmando la transfección exitosa.

Presencia m. SLAMF7 en líneas celulares HeLa.

De manera similar a lo descrito arriba, se evaluó la expresión de SLAMF7 en las líneas celulares HeLa: HeLa parental, HeLa GFP y HeLa m. SLAMF7. Mientras que las líneas celulares HeLa parental y HeLa GFP no expresan SLAMF7 (2% y 1% del total, respectivamente), la línea HeLa m. SLAMF7 presentó una presencia superior al 99% (Figura 16).

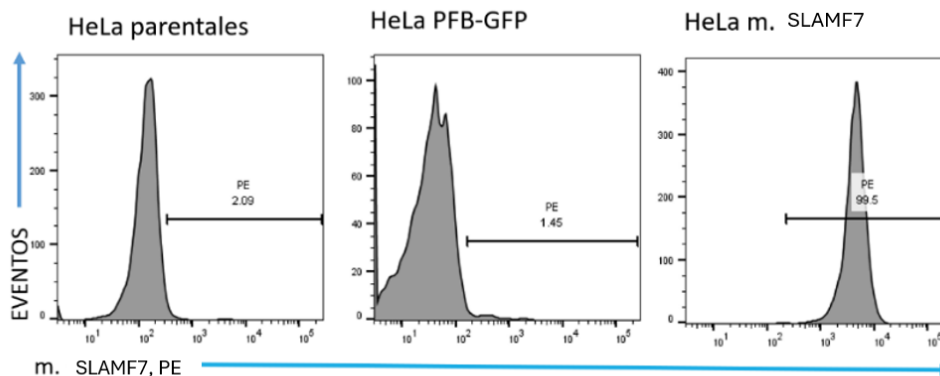


Figura 11. Evaluación de la presencia relativa de SLAMF7 en líneas celulares HeLa parentales y modificada (HeLa m.SLAMF7). Se muestran experimentos representativos.

HeLa parentales (Control negativo): Se observa una población con baja intensidad de fluorescencia, situada principalmente entre 10^1 y 10^2 . El marcaje para SLAMF7 es prácticamente nulo, con solo un 2.09% de eventos en la región delimitada como positiva.

HeLa PFB-GFP (Control de vector): Esta línea, que presumiblemente contiene un vector de control, muestra un comportamiento idéntico a la línea parental, con un 1.45% de positividad. Esto confirma que la inserción de otros marcadores (como GFP) no induce por sí sola la expresión de SLAMF7.

HeLa m. SLAMF7 (Línea modificada): Se observa un desplazamiento evidente de la curva hacia la derecha (hacia el orden de 10^4 en la escala de fluorescencia). El 99.5% de las células se encuentran dentro del marcador de positividad, lo que demuestra una expresión robusta y homogénea de SLAMF7 en esta línea celular modificada.

Presencia GFP en líneas celulares HeLa.

También por citometría de flujo se evaluó la presencia relativa de GFP en las líneas celulares HeLa: HeLa parental, HeLa GFP y HeLa m. SLAMF7. Como se observa en la Figura 16, la línea celular HeLa parental presenta insignificantes de GFP (<1%), mientras que las células HeLa GFP y HeLa m. SLAMF7 presentan niveles muy altos (85.5% y 88.9%, respectivamente).

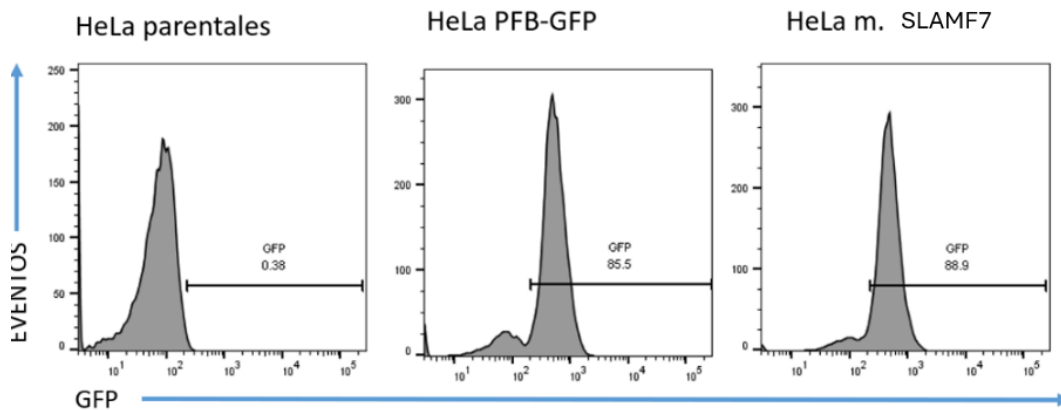


Figura 12. Comparación de la presencia relativa de GFP en líneas celulares HeLa por citometría de flujo. Figuras representativas de experimentos independientes. Análisis mediante programa FLOWJO. Se muestran experimentos representativos.

Panel izquierdo: HeLa parentales (Control negativo). El marcador (gate) establecido para la señal positiva de GFP indica que solo el 0.38% de las células parentales caen dentro de esta región, lo que confirma la ausencia de expresión de GFP.

Panel central: HeLa PFB-GFP (Control de transducción) Se evidencia un claro desplazamiento de la población celular principal hacia la derecha, el marcador muestra que el 85.5% de los eventos son positivos para GFP, demuestra una alta eficiencia de transducción/expresión del vector que contiene el gen de GFP.

Panel derecho: HeLa m. SLAMF7 (Línea de interés)

De manera similar al control PFB-GFP, la línea celular modificada para expresar SLAMF7 también muestra un desplazamiento significativo de la población hacia intensidades de fluorescencia más altas. Un 88.9% de las células resultaron positivas para GFP. Este resultado confirma que la línea generada no solo expresa el gen de interés (SLAMF7, como se vio en la Figura 11), sino que también co-exprime de manera eficiente el marcador reportero GFP, validando el éxito del proceso de modificación genética en esta población.

Expresión de ICAM en líneas celulares HeLa.

Adicionalmente, se evaluó la presencia relativa de ICAM en líneas celulares HeLa (Hela parental, HeLa GFP, HeLa m. SLAMF7). Como se observa en la Figura 17, las tres líneas celulares presentaron niveles altos del receptor ICAM: 99.3 %, 99.3 % 99.5 %. Las tres líneas celulares presentan un porcentaje de expresión muy similar, los cambios de expresión entre la línea celular HeLa parental y m. SLAMF7 no son significativos.

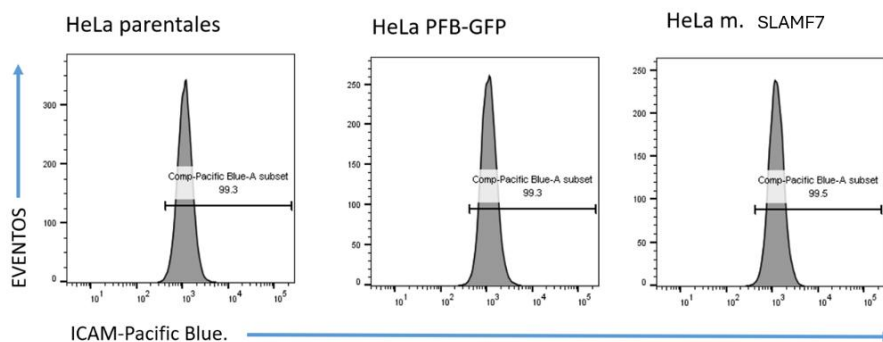


Figura 13. Expresión ICAM en líneas celulares HeLa. Análisis mediante programa FLOWJO. Se muestran experimentos representativos.

Conjugados celulares.

Se evaluó por citometría de flujo, la adhesión de la línea celular YT-S m. SLAMF7 vs HeLa GFP o línea celular HeLa m. SLAMF7 en tiempo, cero minutos, cinco minutos, diez minutos y veinte minutos, se observa que la línea celular YT-S vs HeLa GFP tiene una mayor formación de conjugados (interacción directa entre una célula efectora y una célula blanco, formando una sinapsis inmunológica que precede la citotoxicidad o liberación de gránulos) con respecto a YT-S m. SLAMF7 vs HeLa m. SLAMF7, se observa una disminución entre el 50 % cuando los receptores SLAMF7 están presentes en ambas líneas celulares, la línea YT-S no presenta el adaptador EAT-2 mediante el cual señala SLAMF7.

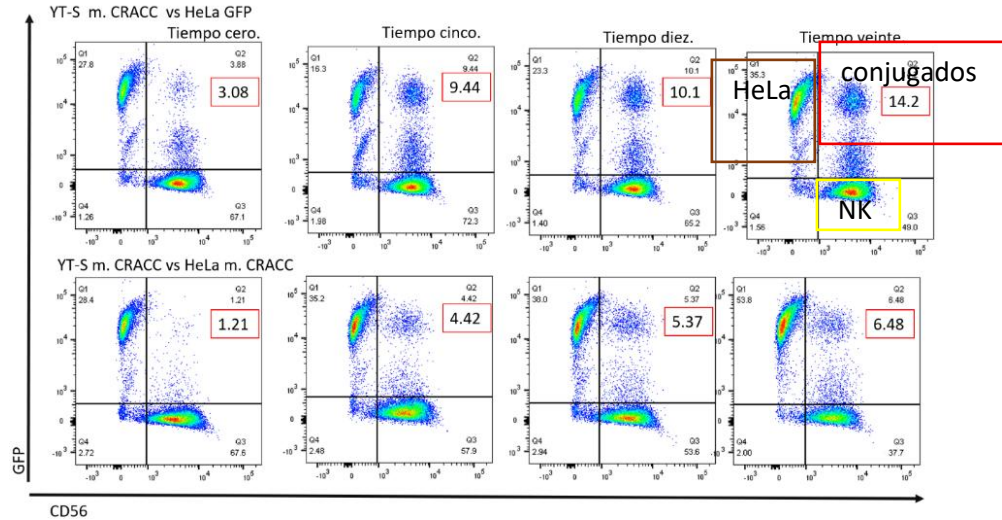


Figura 14. Cinética de formación de conjugados celulares entre YT-S m. SLAMF7 y líneas HeLa. Se muestran experimentos representativos.

Gráfico de citometría de flujo que cuantifica la formación de conjugados celulares entre células YTS (células NK) y HeLa (expresando SLAMF7 o no), en diferentes tiempos de incubación.

El panel superior compara conjugados entre YTS SLAMF7 vs HeLa GFP (controles), con valores medios como 3.08 al tiempo cero, subiendo a 10.4 en 20 minutos.

El panel inferior muestra YTS SLAMF7 vs HeLa SLAMF7, indicando inhibición, cuando el receptor se encuentra presente en ambas líneas celulares.

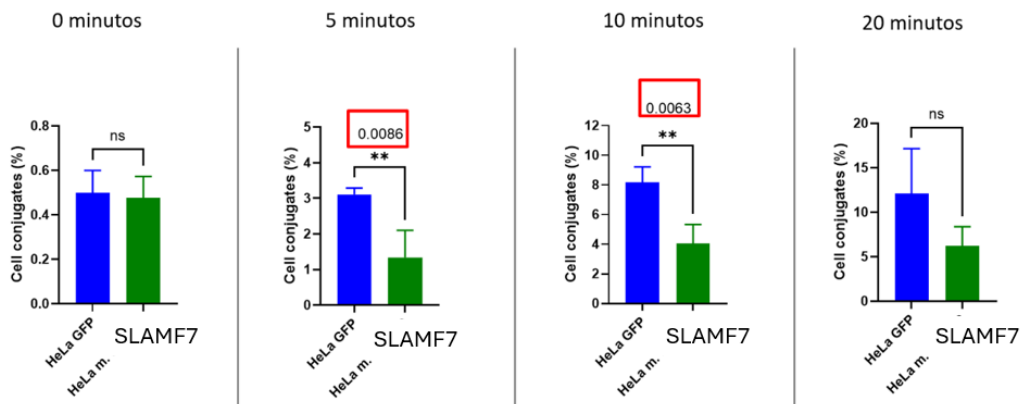


Figura 15. Análisis estadístico de la adhesión celular donde en el tiempo 5 minutos y 10 minutos, se

obtuvo un valor estadísticamente significativo, en el tiempo 0 y 20 minutos el valor que se obtuvo no fue significativo. Se muestran experimentos representativos.

Construcción PSR ∞ Puro/hICAM.

Con el objetivo de obtener el inserto correspondiente al DNA para hICAM, se obtuvieron oligos (Forward y Reverse) que incorporan un sitio de restricción para EcoRI. Se utilizó como vector PSR ∞ Puro, un vector retroviral bicistrónico que codifica para un casete de resistencia a la puromicina. El inserto se compone de 1600 pares de bases (pb), que se clonó en PSR ∞ Puro mediante el uso de sitios de restricción para EcoRI. Para efectuar la ligación del inserto en el vector, se emplea la ligasa (Ligasa IV), la cual se incubó en un volumen total de reacción de 20 µl, bajo dos condiciones diferenciadas: una en la que se establece una relación vectorial de 1 a 3 y la otra en la que se establece una relación vectorial de 1 a 9. La reacción fue incubada durante 12 horas a una temperatura de 16° centígrados.

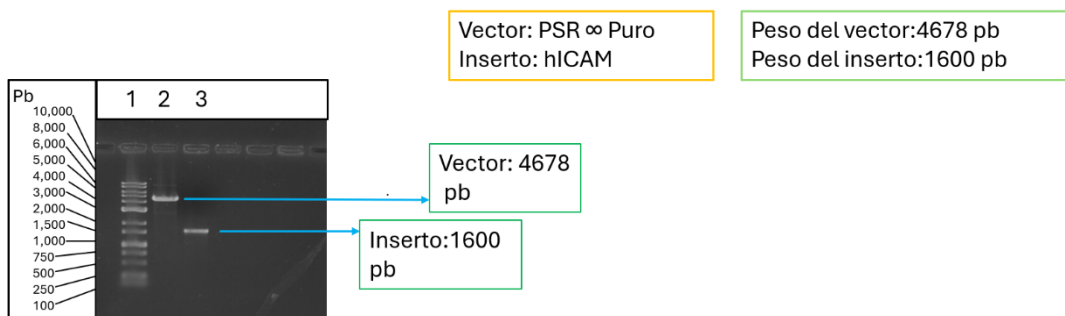


Figura 16. Verificación de la construcción PSR ∞ Puro/hICAM mediante digestión con EcoRI. La banda en el carril 2 confirma el tamaño esperado del vector PSR ∞ Puro (4678 pb) y la del carril 3 corresponde al inserto hICAM (1600 pb), corroborando la obtención correcta de ambos fragmentos para la construcción. Se muestran experimentos representativos.

Se llevó a cabo una transformación bacteriana con el objetivo de obtener clonas positivas en las que el vector contenía al inserto. Se llevó a cabo un mini-prep de cada una de las colonias con el objetivo de adquirir el plásmido. Los plásmidos pertinentes fueron digeridos mediante EcoRI para verificar la existencia del inserto. Se registraron nueve clonas positivas correspondientes al vector contenido dentro de su arquitectura.

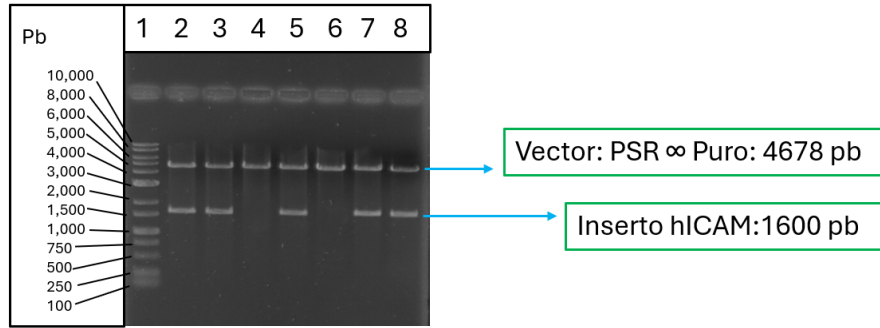


Figura 17. Digestión con EcoRI de clonas PSR ∞ Puro/hICAM: Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: colonia 1 positiva para transformación bacteriana. Carril 3: colonia 2 positiva para transformación bacteriana. Carril 4: colonia negativa para transformación bacteriana. Carril 5: colonia 3 positiva para transformación bacteriana. Carril 6: colonia negativa para transformación bacteriana. Carril 7: colonia 4 positiva para transformación bacteriana. Carril 8: colonia 5 positiva para transformación bacteriana. Se muestran experimentos representativos.

Digestión con ECoRI

Para corroborar la orientación adecuada de nuestro inserto y vector, se llevó a cabo la digestión utilizando la enzima Nco I (10 u/ μ l). La enzima corta en tres sitios y, en caso de una inserción en dirección correcta, debería resultar en la formación de tres bandas. La primera banda debería tener 2980 pb, la segunda banda 2415 pb y finalmente la tercera banda 988 pb. Se recolectaron cinco clonas positivas, de las cuales se seleccionó la seis para llevar a cabo un maxi-prep y obtener una cantidad adecuada de DNA plasmídico para llevar a cabo los procedimientos subsecuentes.

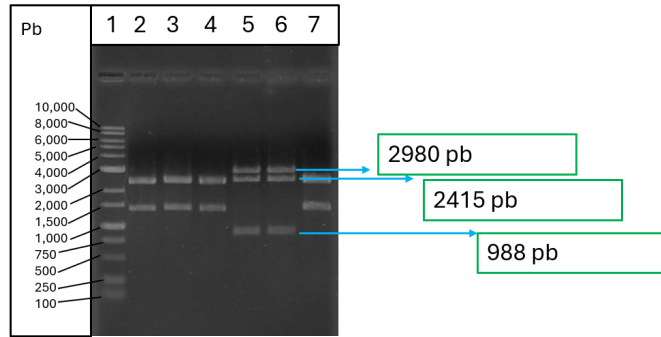


Figura 18. Digestión con Nco I para determinar la orientación de PSR ∞ Puro/h ICAM Nota: Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2–4 y 7: orientación incorrecta PSR/hICAM (3'→5'). Carriles 5–6: orientación correcta PSR/hICAM (5'→3'). Se observan fragmentos ~2980 pb, ~2415 pb y ~988 pb tras digestión con Nco I; el patrón en los carriles 5–6 corresponde a la orientación correcta. Fuente: elaboración propia Se muestran experimentos representativos.

Conjugados celulares.

Se evaluó por citometría de flujo, la adhesión de la línea celular YT-S m. SLAMF7 vs HeLa GFP, línea celular HeLa m. SLAMF7 y línea celular HeLa m. SLAMF7/h CAM en tiempo, cero minutos, cinco minutos y diez minutos se observa que la línea celular YT-S vs HeLa GFP tiene una mayor formación de conjugados con respecto a YT-S m. SLAMF7 vs HeLa m. SLAMF7, se observa una disminución entre el 50 % cuando los receptores SLAMF7 están presentes en ambas líneas celulares. En la tercera condición que tenemos donde está presente la línea celular YT-S m. SLAMF7/h CAM, la adhesión se vuelve a recuperar. la línea YT-S no presenta el adaptador EAT-2 mediante el cual señaliza SLAMF7. El receptor LFA-1 es el ligando para ICAM, estos están reportados ampliamente que participan en el proceso de adhesión dentro de la vía de citotoxicidad de la NK.

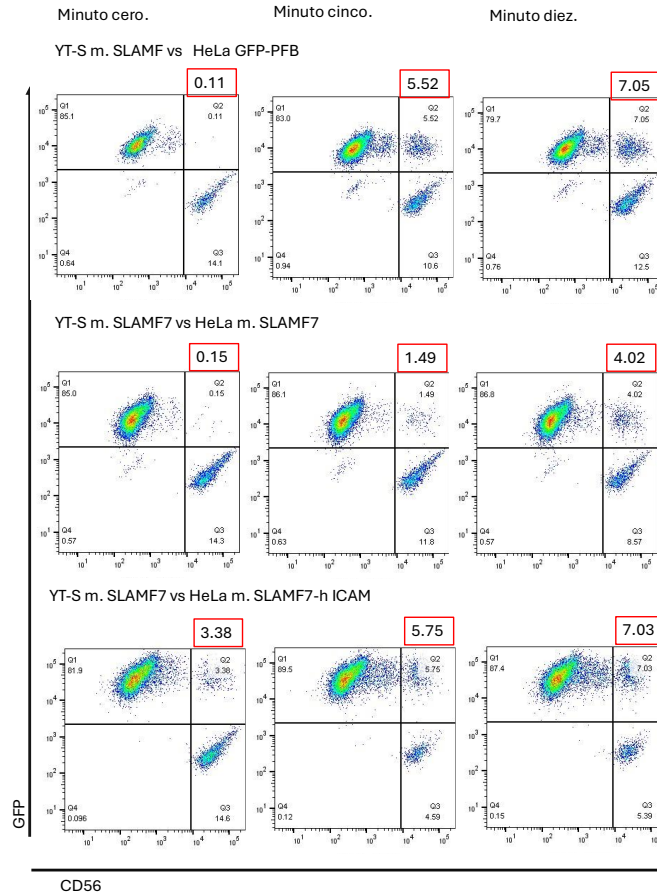


Figura 19. Análisis de conjugados celulares YT-S m. SLAMF7 con diferentes líneas HeLa. Conjugados celulares evaluados por citometría de flujo. En el eje X se representa CD56, marcador de células Natural Killer; en el eje Y, GFP, marcador de células HeLa. El cuadrante superior derecho muestra la proporción de conjugados celulares entre ambas líneas en diferentes tiempos de incubación: 0, 5 y 10 minutos. Fuente: elaboración propia. Se muestran experimentos representativos.

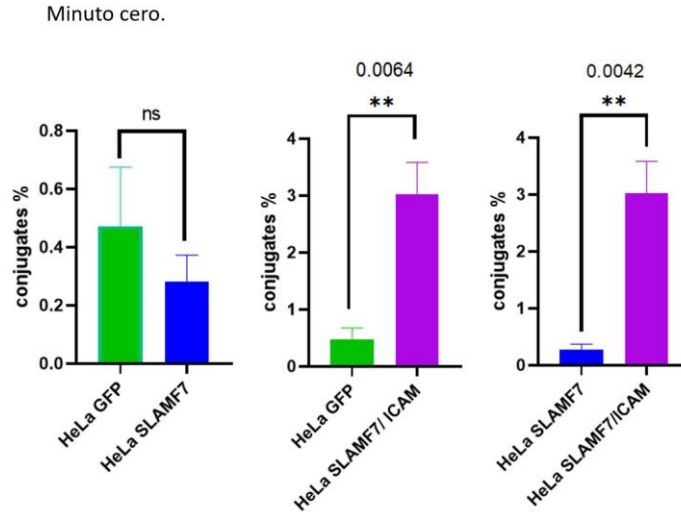


Figura 20. Análisis estadístico de la adhesión celular a minuto cero. Nota: Gráfica comparativa del porcentaje de conjugados celulares a minuto cero entre YT-S m. SLAMF7 y tres tipos de células HeLa (GFP, SLAMF7 y SLAMF7/hcAM). Los datos se analizaron mediante prueba t de Student (una cola) en GraphPad Prism 8.0; valores de p menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Fuente: elaboración propia

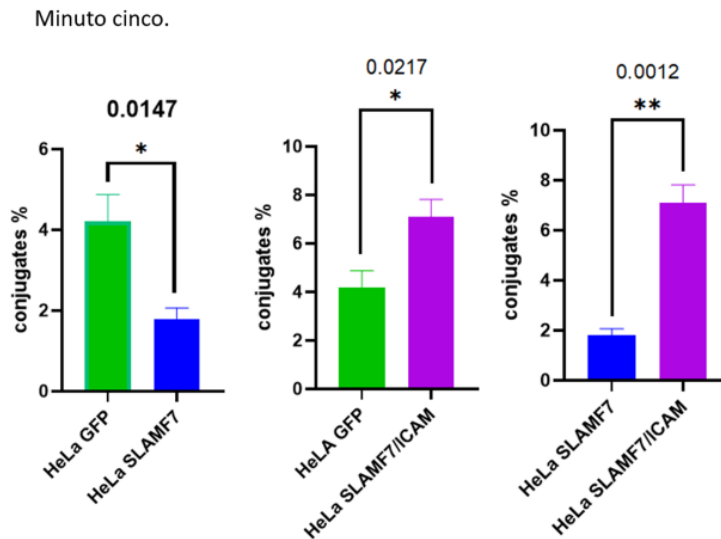


Figura 21. Análisis estadístico de la adhesión celular a minuto cinco. Nota: Gráfica comparativa del porcentaje de conjugados celulares a minuto cinco entre YT-S m. SLAMF7 y tres tipos de células HeLa (GFP, SLAMF7 y SLAMF7/hcAM). Los datos se analizaron mediante prueba t de Student (una cola) en GraphPad Prism 8.0; valores de p menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Minuto diez.

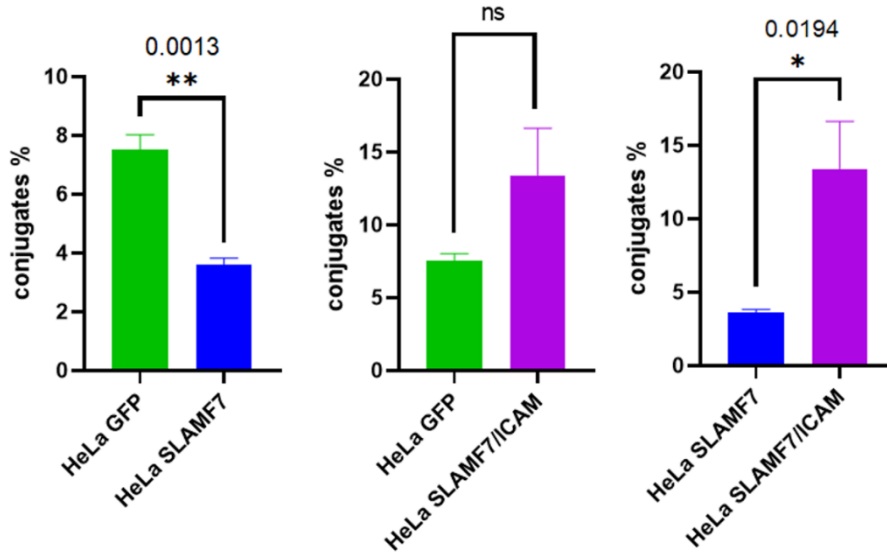


Figura 22. Análisis estadístico de la adhesión celular a minuto diez. Nota: Gráfica comparativa del porcentaje de conjugados celulares a minuto diez entre YT-S m. SLAMF7 y tres tipos de células HeLa (GFP, SLAMF7 y SLAMF7/hCAM). Los datos se analizaron mediante prueba t de Student (una cola) en GraphPad Prism 8.0; valores de p menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

7. Discusión

El estudio de los mecanismos que regulan la función de las células Natural Killer (NK) es de vital importancia para modular su respuesta en el ámbito clínico, especialmente en el contexto del diseño de nuevas estrategias terapéuticas de células tumorales y células infectadas (88). Como ya se dijo, las células NK son capaces de eliminar estas células sin activación previa, a través de la secreción de citocinas y la función citotóxica. Esta citotoxicidad se rige por un delicado equilibrio entre señales activadoras e inhibitoras mediadas por diversos receptores en la superficie de las células NK.

La familia de receptores SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) juega un papel significativo en la regulación de la función de las células inmunes. El receptor SLAMF7 (también conocido como CRACC, CS1 o CD319) es particularmente relevante, ya que se expresa en células NK y es capaz de modular su capacidad citotóxica. Un hallazgo clave en este estudio, y consistente con la literatura previa, es la naturaleza bimodal de SLAMF7, que puede promover señales tanto de activación como de inhibición (89).

Los resultados de los ensayos de conjugados celulares presentados en este trabajo revelan una disminución del 50% en la formación de conjugados entre las líneas celulares YT-S m. SLAMF7 y HeLa m. SLAMF7 en comparación con la interacción entre YT-S m. SLAMF7 y HeLa GFP. Esta observación sugiere que la presencia del receptor SLAMF7 en ambas células (NK y blanco) interfiere con la capacidad de formación de conjugados, lo que a su vez compromete la función citotóxica de las células NK. Un mecanismo plausible que explica esta inhibición es la ausencia del adaptador EAT-2 en la línea celular YT-S. La literatura ha establecido que, en ausencia de EAT-2, SLAMF7 promueve señales inhibitorias que reprimen la citotoxicidad de las células NK. El adaptador EAT-2 es indispensable para la señalización activadora del receptor SLAMF7, y su ausencia en las células YT-S se correlaciona directamente con la reducida capacidad de formación de conjugados y, por ende, con una menor adhesión a las células blanco (13).

La adhesión celular es un evento fundamental para la eliminación de células blanco por parte de las NK. La incapacidad para formar conjugados celulares de manera eficiente puede prevenir una respuesta inmune celular adecuada y llevar al desarrollo de infecciones. En el contexto de este estudio, la disminución en la adhesión observada cuando SLAMF7 está presente en ambas células y el adaptador EAT-2 está ausente en la célula NK, subraya la importancia crítica de EAT-2 en la modulación positiva de la interacción SLAMF7-SLAMF7 para una función citotóxica efectiva.

La expresión del receptor ICAM en las líneas celulares HeLa se mantuvo en porcentajes altos y similares entre las líneas parentales, GFP. y m. SLAMF7. Esto es relevante porque el receptor LFA-1 en las células NK interactúa con ICAM en las células blanco, y esta interacción es bien conocida por su participación en la adhesión celular y la vía de citotoxicidad de las NK (90). La recuperación de la adhesión en la condición donde la línea

celular YT-S m. SLAMF7 se co-cultiva con HeLa m. SLAMF7/ICAM, sugiere que la sobreexpresión de ICAM podría, hasta cierto punto, compensar el efecto inhibitorio observado debido a la ausencia de EAT-2 en las células YT-S m. SLAMF7, reforzando la importancia de la interacción LFA-1-ICAM en la adhesión de las células NK.

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la hipótesis de que el receptor SLAMF7 incide en el proceso de adhesión celular dentro de la vía de citotoxicidad de la NK a través de un mecanismo de inhibición aparentemente dependiente de la ausencia del adaptador EAT-2. La alta eficiencia de transducción de SLAMF7 en las líneas celulares YT-S y HeLa, así como la expresión de GFP, proporcionan herramientas robustas para futuras investigaciones. La comprensión detallada de estos mecanismos es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a modular la función de las células NK en diversas patologías.

Al analizar los hallazgos obtenidos en este estudio en comparación con los disponibles en la literatura, podemos destacar algunos aspectos que complementan la interpretación de los resultados. En primera instancia podemos hablar del estudio de Guo et al. (2014), quienes mostraron que en las células NK humanas que carecen del adaptador EAT-2 (como es el caso de la línea celular YT-S utilizada en nuestro modelo), el receptor SLAMF7 funciona como un regulador negativo de la citotoxicidad. Este efecto inhibitorio fue mediado por una vía de señalización intracelular desde SLAMF7 hasta el citoplasma que dependía de la fosforilación de la tirosina Y261 de SLAMF7 por quinasas de la familia Src, lo que permitía el reclutamiento del factor inhibidor SHIP-1. Además, este mecanismo requiere la acción de la fosfatasa CD45 para activar estas quinasas. Si bien nuestro estudio no abordó directamente los componentes moleculares de esta vía, medimos una reducción significativa (~50%) en la formación de conjugados celulares entre células NK YT-S m.SLAMF7 y células objetivo HeLa m.SLAMF7. Esta reducción en la adhesión sugiere que la interacción homotípica SLAMF7–SLAMF7, en ausencia de EAT-2, probablemente esté desencadenando una señal inhibitoria que interrumpe las etapas tempranas de la formación del sinapsis inmune.

Por lo tanto, nuestros datos, además de ser congruentes con los mecanismos descritos por Guo et al., los complementan al aportar evidencia funcional en la adhesión celular, que es la fase inicial y fundamental en la respuesta citotóxica de las células NK (90).

Del mismo modo, si comparamos nuestros resultados con los de Jeong et al. (2018) (90), el papel de las moléculas de adhesión en la eficacia citotóxica de las células NK emerge como altamente relevante. Esos autores demostraron que la irradiación de varias líneas de células tumorales humanas resultó en una sobreexpresión significativa de ICAM-1, mejorando la citotoxicidad mediada por células NK. Esta mejora en la función efectora se debió a una mayor adhesión célula-célula mediada por la unión de ICAM-1 en las células objetivo y LFA-1 en las células NK. De hecho, donde esta interacción fue bloqueada por anticuerpos monoclonales contra ICAM-1 o LFA-1, la citotoxicidad se redujo de manera significativa y notable, ilustrando el papel esencial de esta vía de adhesión en la activación funcional de las células NK. Estos hallazgos corroboran nuestras observaciones, donde la sobreexpresión de ICAM en las células HeLa m. SLAMF7 permitió parcialmente a las células NK YT-S m. SLAMF7 recuperar la adhesión. Este rescate parcial sugiere que la señalización inhibitoria que SLAMF7 invoca en ausencia de EAT-2 puede ser al menos, en cierto grado, preferiblemente sobrepasada por la mayor disponibilidad de ligandos de adhesión como ICAM-1. En este sentido, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la vía ICAM-1/LFA-1 no solo desempeña un papel crítico en la formación de sinapsis inmunológicas efectivas, sino que también proporciona un respaldo compensatorio a las señales inhibitorias de receptores como SLAMF7. Así, tanto nuestros hallazgos como los de Jeong et al. respaldan un modelo funcional donde la eficacia de la respuesta citotóxica de las células NK depende de un equilibrio dinámico de las señales inhibitorias que actúan en contraposición y la mejora mecánica de la adhesión celular (91)

En contraste, los resultados de nuestra investigación parecen diferir de los descubrimientos presentados por Pazina y colaboradores (2019), quienes evidenciaron que SLAMF7 tiene la capacidad de aumentar la capacidad citotóxica de células asesinas naturales hacia células cancerosas SLAMF7+ a través de interacciones del mismo tipo, incluso sin la presencia de CD16. En el estudio, el uso del fármaco elotuzumab (Elo), un anticuerpo monoclonal, estimuló la función de las células NK-92 CD16- que tenían la presencia de SLAMF7 con su forma completa en el dominio citoplasmático (SLAMF7-L). Esto indica la activación de una vía de señalización coestimuladora que requiere la presencia del adaptador EAT-2. La señalización generó un aumento en la presencia de moléculas como NKG2D, ICAM-1 y

LFA-1 activas, las cuales se relacionan con una función efectora más potente. Contrariamente a lo que se ha visto en nuestro modelo experimental, donde la presencia de SLAMF7 homotípico parece generar una señal de inhibición sin la presencia de EAT-2, en la investigación de Pazina y colaboradores, SLAMF7 funciona como un promotor de la capacidad citotóxica (92).

La divergencia observada se podría atribuir a variaciones estructurales y funcionales en los modelos celulares empleados. Nuestro trabajo utilizó únicamente células NK YT-S, completamente deficientes en EAT-2, mientras que el estudio de Pazina et al. se sirvió de NK-92 que expresan de modo transgénico SLAMF7-L, línea que aún podría conservar niveles residuales de EAT-2 o bien expresar adaptadores alternativos que medien en la transducción de señales. Además, la introducción de elotuzumab para amplificar la interacción homotípica SLAMF7–SLAMF7 podría inducir modificaciones en el epítipo conformacional del dominio intracelular o bien provocar el reclutamiento de moléculas adaptadoras que, de modo natural, no se asocian en los encuentros homotípicos evaluados en nuestro modelo. Por último, el estudio de Pazina et al. reporta que el efecto coestimulador de SLAMF7 se explicó, únicamente, en células NK previamente estimuladas con IL-2, lo que pone de relieve que el estado de alerta basal de la célula efectora ejerce una influencia decisiva sobre el potencial de Fosfh (92).

8. Conclusiones

Esta investigación evidencia que, en ausencia del adaptador EAT-2, el receptor SLAMF7 impide la adhesión celular en células NK humanas, lo que obstaculiza la formación de sinapsis inmunológicas. No obstante, la sobreexpresión de ICAM posibilita la reversión parcial de este efecto, destacando la existencia de rutas compensatorias de adhesión. A diferencia de investigaciones anteriores en las que SLAMF7 promueve funciones efectoras como la degranulación, nuestros datos indican un rol modulador y contexto-dependiente del receptor, que es influenciado por el repertorio de adaptadores intracelulares. Considerando que SLAMF7 se manifiesta extensamente en determinados tipos de cáncer hematológico, la comprensión de su papel dual podría tener repercusiones en las estrategias de inmunoterapia. Las investigaciones futuras deberían examinar la manera en que la coexpresión de adaptadores o el microambiente tumoral modulan la función de SLAMF7 en las células NK. receptor SLAMF7 inhibe aparentemente adhesión celular en la vía de citotoxicidad de la NK.

-Cuando se sobreexpresa el Receptor LFA-1 la adhesión se recupera en presencia del receptor SLAMF7.

9. Referencias Bibliográficas

1. Farhangnia P, Ghomi SM, Mollazadehghomi S, Nickho H, Akbarpour M, Delbandi AA. SLAM-family receptors come of age as a potential molecular target in cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2023 May 11;14:1174138. doi: 10.3389/fimmu.2023.1174138. PMID: 37251372; PMCID: PMC10213746.
2. Franks SE, Wolfson B, Hodge JW. Natural Born Killers: NK Cells in Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2020 Jul 31;12(8):2131. doi: 10.3390/cancers12082131. PMID: 32751977; PMCID: PMC7465121.
3. Ishibashi M, Morita R, Tamura H. Immune functions of signaling lymphocytic activation molecule family molecules in multiple myeloma. *Cancers (Basilea)* (2021) 13. doi: 10.3390/cancers13020279.
4. Iwai, Y., & Ishii, N. (2021). The role of inhibitory receptors in natural killer cell function. *Nature Immunology*, 22(1), 10-21.
5. Jennifer L. Cannons, Stuart G. Tangye, Pamela L. Schwartzberg. SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity. *Annual Review of Immunology.* (Bethesda, Maryland) 2011 29:1, 665-705
6. Shin E, Bak SH, Park T, Kim JW, Yoon SR, Jung H, Noh JY. Understanding NK cell biology for harnessing NK cell therapies: targeting cancer and beyond. *Front Immunol.* 2023 Jul 18;14:1192907. doi: 10.3389/fimmu.2023.1192907. PMID: 37539051; PMCID: PMC10395517.
7. Quatrini, L., & Colonna, M. (2021). Natural killer cell receptors: an update. *European Journal of Immunology*, 51(12), 2507-2525.
8. Merino, A., & Colonna, M. (2019). Natural killer cell receptors in cancer immunotherapy. *Nature Immunology*, 20(12), 1271-1281.
9. Kucuksezer UC, Aktas Cetin E, Esen F, Tahrali I, Akdeniz N, Gelmez MY, et al. The role of natural killer cells in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2021;12:622306. doi: 10.3389/fimmu.2021.622306.
10. Merino A, Zhang B, Dougherty P, Luo X, Wang J, Blazar BR, Miller JS, Cichocki F. Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J Clin Invest.* 2019 Jun 18;129(9):3770-3785. doi: 10.1172/JCI125916. PMID: 31211698; PMCID: PMC6715389.

11. Quatrini, L., della Chiesa, M., Sivori, S., Mingari, M. C., Pende, D., & Moretta, L. (2021). Human NK cells, their receptors and function. In *European Journal of Immunology* (Vol. 51, Issue 7, pp. 1566–1579). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/eji.202049028>.
12. Wu Y, Wang Q, Li M, Lao J, Tang H, Ming S, Wu M, Gong S, Li L, Liu L, Huang X. SLAMF7 regulates the inflammatory response in macrophages during polymicrobial sepsis. *J Clin Invest.* 2023 Mar 15;133(6):e150224. doi: 10.1172/JCI150224. PMID: 36749634; PMCID: PMC10014109.
13. Cruz-Muñoz, ME., Dong, Z., Shi, X. *et al.* Influencia de CRACC, un receptor de la familia SLAM acoplado al adaptador EAT-2, sobre la función de las células asesinas naturales. *Nat Immunol* **10** , 297–305 (2009). <https://doi.org/10.1038/ni.1693>.
14. Farhangnia P, et al. SLAM-family receptors come of age as a potential molecular target in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1174138.
15. Theorell J, Schlums H, Chiang SC, Huang TY, Tattermusch A, Wood SM, et al. Sensitive and viable quantification of inside-out signals for LFA-1 activation in human cytotoxic lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2011;366(1–2):106–18. Epub 2011/02/08. doi: 10.1016/j.jim.2011.01.014 . la formación de sinapsis inmunes.
16. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):713–25. Epub 2009/01/28. doi: 10.1038/nri2381 ; PubMed Central PMCID: PMC2772177.
17. Kabanova A, Zurli V, Baldari CT. Signals controlling lytic granule polarization at the cytotoxic immune synapse. *Front Immunol.* 2018;9:307. doi: 10.3389/fimmu.2018.00307.
18. isiCartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., & Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99(3), 754–758. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.754>
19. Brumbaugh KM, Binstadt B, Leibson P. Signal transduction during NK cell activation: balancing opposing forces. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;230:103-22. doi: 10.1007/978-3-642-46859-9_8.

20. Yokoyama W, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev.* 2006;214:143-54. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x.
21. Thomas LM, Peterson ME, Long EO. Cutting edge: NK cell licensing modulates adhesion to target cells. *J Immunol.* 2013;191(8):3981-5. doi: 10.4049/jimmunol.1301159.
22. Marçais A, Marotel M, Degouve S, Koenig A, Fauteux-Daniel S, Drouillard A, et al. High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors. *eLife.* 2017;6:e26423. doi: 10.7554/eLife.26423.
23. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:239-52. doi: 10.1038/nri3174.
24. Marçais A, Marotel M, Degouve S, Koenig A, Fauteux-Daniel S, Drouillard A, et al. High mTOR activity is a hallmark of reactive natural killer cells and amplifies early signaling through activating receptors. *eLife.* 2017;6:e26423. doi: 10.7554/eLife.26423.
25. Thielens A, Vivier É, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(2):239-45. doi: 10.1016/j.coi.2012.01.001.
26. Bléry M, Olcese L, Vivier É. Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum Immunol.* 2000;61(1):51-64.
27. Yusa S, Catina TL, Campbell KS. KIR2DL5 can inhibit human NK cell activation via recruitment of Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2). *J Immunol.* 2004;172(12):7385-7392.
28. Stebbins CE, Watzl C, Billadeau DD, Leibson PJ, Burshtyn DN, Long EO. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol.* 2003;23(17):6291-9.
29. Manser AR, Weinhold S, Uhrberg M. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev.* 2015;267(1):178-96. doi: 10.1111/imr.12316.
30. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:227-58. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005.
31. Bern MD, Beckman DL, Ebihara T, Taffner SM, Poursine-Laurent J, White J, et al. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-dependent functions of an MHC class I-

specific NK cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(41):E8440-E8447. doi:10.1073/pnas.1713064114.

32. Eissmann P, Beauchamp L, Wooters J, Tilton J, Long EO, Watzl C. Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood*. 2005;105(12):4722-9. doi: 10.1182/blood-2004-09-3796.

33. Li Y, Hofmann M, Wang Q, Teng L, Chlewicki LK, Pircher H, et al. Structure of natural killer cell receptor KLRG1 bound to E-cadherin reveals basis for MHC-independent missing self recognition. *Immunity*. 2009;31(1):35-46. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.019.

34. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2006;203(2):289-95. doi: 10.1084/jem.20051986.

35. Colonna M, Barchet W. The function of leukocyte immunoglobulin-like receptors in self-tolerance, viral recognition, and regulation of adaptive responses. En: Ahmed R, Chen Z, editors. *Viral immunology and immunopathology*. Washington (DC): ASM Press; 2004. p. 301-12. doi: 10.1128/9781555817671.ch16.

36. Yu K, Davidson CE, Burshtyn D. LILRB1 intron 1 has a polymorphic regulatory region that enhances transcription in NK cells and recruits YY1. *J Immunol*. 2020;204(11):3030-41. doi: 10.4049/jimmunol.2000164.

37. Peterson M, Long EO. Inhibitory receptor signaling via tyrosine phosphorylation of the adaptor Crk. *Immunity*. 2008;29(4):578-588. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.014

38. Park T, Boyd K, Curran T. Cardiovascular and craniofacial defects in Crk-null mice. *Mol Cell Biol*. 2006;26:6272-82. doi: 10.1128/MCB.00472-06.

39. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*. 1996;157(11):4741-5. doi: 10.4049/jimmunol.157.11.4741.

40. Ghasemzadeh M, Hosseini E, Schwarzer A, Pourfathollah A. NK cell maturation to CD56^{dim} subset associated with high levels of NCRs overrides the inhibitory effect of NKG2A and recovers impaired NK cell cytolytic potential after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res*. 2016;43:58-65. doi: 10.1016/j.leukres.2015.12.002.

41. Tomasello E, Bléry M, Vély E, Vivier E. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol.* 2000;12(2):139-47. doi: 10.1006/smim.2000.0216.
42. Imširović V, Wensveen FM, Polić B, Jelenčić V. Maintaining the balance: regulation of NK cell activity. *Cells.* 2024;13(17):1464. doi: 10.3390/cells13171464.
43. Cichocki F, Miller JS, Anderson S, Bryceson Y. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions. *Front Immunol.* 2013;4:55. doi: 10.3389/fimmu.2013.00055.
44. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:197-223. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197.
45. González S, Groh V, Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;298:121-38. doi: 10.1007/3-540-27743-9_6.
46. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee H-G, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood.* 2003;102(4):1389-96. doi: 10.1182/blood-2003-01-0019.
47. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol.* 2002;3(12):1150-5. doi: 10.1038/ni857
48. Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol.* 2016;38:45–51.
49. Caraux A, Kim N, Bell S, Zompi S, Ranson T, Lesjean-Pottier S, et al. Phospholipase C-gamma2 is essential for NK cell cytotoxicity and innate immunity to malignant and virally infected cells. *Blood.* 2006;107(3):994-1002. doi:10.1182/BLOOD-2005-06-2428.
50. Sauer K, Park E, Siegemund S, French A, Wahle J, Sternberg L, et al. Soluble IP4 limits NK cell effector functions by controlling PI3K signaling. *J Immunol.* 2013;190(Suppl 188.3). doi:10.4049/jimmunol.190.supp.188.3.
51. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, 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(12):2065-72. doi:10.1084/jem.187.12.2065.

52. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 1999;190(10):1505-16. doi:10.1084/jem.190.10.1505.
53. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease. *Front Immunol*. 2019;10:909. doi: 10.3389/fimmu.2019.00909.
54. Schlecker E, et al. *Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30*. *Cancer Res*. 2014;74(13):3429-40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3017.
55. Brusilovsky M, et al. *PCNA: a novel cancer-associated ligand for the NK cell receptor NKp44*. *J Immunol*. 2012;188(Suppl 1):162.10. doi:10.4049/jimmunol.188.supp.162.10.
56. Bloushtain N, et al. *Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycans Are Involved in the Recognition of Cellular Targets by NKp30 and NKp46*. *J Immunol*. 2004;173(4):2392-2401
57. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol*. 2002;3(12):1150-5. doi:10.1038/ni857.
58. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005;436(7054):1186-90. doi:10.1038/nature03884.
59. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):737-44. doi:10.1038/nri2144.
60. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006;214(1):73-91. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x.
61. Barber DF, Long EO. Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells. *J Immunol*. 2003;170(1):294-9. doi:10.4049/jimmunol.170.1.294.

62. Luis Martínez-Lostao, Alberto Anel, Julián Pardo; ¿Cómo matan los linfocitos citotóxicos las células cancerosas? *Clin Cancer Res* 15 de noviembre de 2015; 21 (22): 5047–5056. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>
63. Giordano C, Carlomagno S, Falco M, Cantoni C, Vitale M, Caruana I, et al. CD94-driven in vitro expansion of highly functional adaptive NKG2C+ NKG2A- CD57+ NK cells from CMV+ healthy donors. *Front Immunol.* 2025;1481745. doi:[10.3389/fimmu.2025.1481745](https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1481745)
64. Dahlvang JD, Dick JK, Sangala JA, Kennedy PR, Pomeroy E, Snyder K, et al. Ablation of SYK Kinase from Expanded Primary Human NK Cells via CRISPR/Cas9 Enhances Cytotoxicity and Cytokine Production. *J Immunol.* 2023;2200488. doi:[10.4049/jimmunol.2200488](https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200488)
65. Zhang H, Liu R, Zhang Y, Liu X, Chen L. [CD226, TIGIT and CD96 regulate NK cell function and participate in anti-tumor immunity]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2023;39(9):852-856.
66. Waggoner S, Kumar V. Evolving role of 2B4/CD244 in T and NK cell responses during virus infection. *Front Immunol.* 2012;3:377. doi:[10.3389/fimmu.2012.00377](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00377)
67. Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(3):200-218. doi:10.1038/s41573-019-0052-1.
68. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(4):243-254. doi:10.1038/nri3799.
69. Urlaub D, Hoefer K, Müller ML, Watzl C. *LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation.* **J Immunol.** 2017;198(5):1944-1951. doi:10.4049/jimmunol.1601004.
70. Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:339-62. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132554.
71. Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):495-507. doi: 10.1016/j.ceb.2007.08.002.
72. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2009;1790(6):431-44. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.007.

73. Ockfen E, Filali L, Pereira Fernandes D, Hoffmann C, Thomas C. Actin cytoskeleton remodeling at the cancer cell side of the immunological synapse: good, bad, or both? *Front Immunol.* 2023;14:1276602. doi: 10.3389/fimmu.2023.1276602.
74. Basu R, Whitlock BM, Husson J, Le Floc'h A, Jin W, Oyler-Yaniv A, et al. Cytotoxic T cells use mechanical force to potentiate target cell killing. *Cell.* 2016;165(1):100-10. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.021.
75. Veillette A, Cruz-Munoz ME, Zhong MC. SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends Immunol.* 2006;27(5):228-34. doi: 10.1016/j.it.2006.03.003.
76. Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual Review of Immunology* [Internet]. 2011;29(1):665–705.
77. Farhangnia P, Mollazadeh Ghomi S, Nickho H, Akbarpour M, Delbandi AA. SLAM-family receptors come of age as a potential molecular target in cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2023;14:1174138. doi:10.3389/fimmu.2023.1174138
78. Fouquet G, Marcq I, Debuysscher V, Bayry J, Singh AR, Bengrine A, et al. Signaling lymphocytic activation molecules (SLAM) and cancers: friends or foes? *Oncotarget.* 2018;9(22):16248-16262. doi:10.18632/oncotarget.24575
79. Latour S, Veillette A. *The SAP family of adaptors in immune regulation.* *Semin Immunol.* 2004;16(6):409-419. doi: 10.1016/j.smim.2004.08.020
80. Pérez-Quintero LA, Roncagalli R, Guo H, Latour S, Davidson D, Veillette A. EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase C γ , Ca $^{++}$, and Erk, leading to granule polarization. *The Journal of Experimental Medicine.* 2014 Mar 31;211(4):727–42.
81. Dułak NA, Stembalska A, Bernatowicz P, et al. *Haematological manifestations of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLPI).* *Hematol Clin Pract.* 2022;13(1):1–6.
82. Ayoub PG, Stocca A, Meneghini V, et al. *Lentiviral vectors for precise expression to treat X-linked lymphoproliferative disease (XLPI).* *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2024;32:101323. doi:10.1016/j.omtm.2024.101323
83. Wu N, Veillette A. *SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies.* *Curr Opin Immunol.* 2016;38:45–51. doi:[10.1016/j.coi.2015.11.003](https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.003)

84. Campbell KS, Cohen AD, Pazina T. Mechanisms of NK Cell Activation and Clinical Activity of the Therapeutic SLAMF7 Antibody, Elotuzumab in Multiple Myeloma. *Front Immunol.* 2018;9:2551.
85. Chu E, Wu J, Kang SS, Kang Y. *SLAMF7 as a Promising Immunotherapeutic Target in Multiple Myeloma Treatments.* *Curr Oncol.* 2023;30(9):7891–7903. doi:10.3390/curroncol30090573
86. Romano, A., Conticello, C., Cavalli, M., Vetro, C., La Fauci, A., Parrinello, N. L., & Di Raimondo, F. (2021). The immunological role of SLAMF7 and the clinical efficacy of elotuzumab in multiple myeloma. *Frontiers in Oncology*, 11, 684561. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.684561>
87. Strauss-Albee, D. M., Horowitz, A., Parham, P., & Blish, C. A. (2014). Coordinated regulation of natural killer receptor expression in the maturing human immune system. *The Journal of Immunology*, 193(10), 4871–4879. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401821>
88. Portale, F., & Di Mitri, D. (2023). NK cells in cancer: Mechanisms of dysfunction and therapeutic potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9521. <https://doi.org/10.3390/ijms24119521>
89. 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.* 2022 Jan;52(1):62-74. doi: 10.1002/eji.202149406. Epub 2021 Nov 14. PMID: 34693521.
90. Guo H, Cruz-Munoz ME, 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 Jan;35(1):41–51. doi:10.1128/MCB.01107-14.
91. Jeong JU, Uong TN, Chung WK, Nam TK, Ahn SJ, Song JY, et al. Effect of irradiation-induced intercellular adhesion molecule-1 expression on natural killer cell-mediated cytotoxicity toward human cancer cells. *Cytotherapy.* 2018;20(5):648–60. doi:10.1016/j.jcyt.2018.01.010.
92. 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 Oct;7(10):1633–46. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0579.



Cuernavaca, Morelos, 11 de febrero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Influencia del receptor SLAMF7 sobre la adhesión de células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Nataly López Garduño. 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. Juan José Acevedo Fernández





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2026-02-11 16:22:31 | FIRMANTE

Pd060aXR1qgCSStMUNoA1mfqFAAtLr39WF53McWonjwCz1cFHwc0zcHdp1Xzrhj+mjajSFpEzFECiGnxP9h6GsEjkCpEFTDXfyntoQDrbmcXlePUzoYS8uMKDzQe4TPDJ8ol0kN/EqHfb71xGO1P0bO+8C1Tx8pc0ongF2v4wfuTZ4n1SS+jmVwtlq8wr8bbBygp/ZgZHyqJRgGrWJDsgsb16gEhJWYDLOHabTL15TOvc2SaOEV+suVkvICdHOxc8zi2iBgiEIfCMIbBskcVDGgSZHrt0toL0SmstiU+X9sFY+awavxVdB7YcZldCs7zyaz19Cj5zXem6byWqTdR93g==

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



[7aQmCeBj8](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/74i5Z5mlCgEgttkZW1IHQ52pLiHgTthV>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de febrero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Influencia del receptor SLAMF7 sobre la adhesión de células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Nataly López Garduño. 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. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LUIS ENRIQUE ALBERTO CAÑEDO Y DORANTES | Fecha:2026-02-19 16:48:42 | FIRMANTE

JT0vrOzsjPkdASMY0MHK9kE20hkWmFHp6up5G1Xob/pCMnIVTiVWVHjHc1UQQTt+5Tiaw/Sn14PQgLX+JwncrdfHMeKaR3WEik5ng16NeotmWRCCLkGuOyFeVCVO7h1D91NcV6o+fidWmKnE2VmruAz9LHzGP5PkKrOCKE55V4YGEAAo5zKr+Q1ebob4g42SgTWXvo5Lkcg3ywKUZfVsgKqnlpBK5k8mzss0R6AqL8MI4pSMWN71K0oPhOmHTH8wYfWBN++jmQ9L7KhxMB2TttE7T21r+twiNrbGhuz+EXycb15lYrVoozeEpRdcERERmZAKEog0lrBqYoOQsCjyK2A==

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



[wn0eLrTlx](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hXLaTRdXGqNrbQbst5kkYqP86R40io3A>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de febrero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Influencia del receptor SLAMF7 sobre la adhesión de células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Nataly López Garduño. 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 con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2026-02-12 12:38:29 | FIRMANTE

AebqRuwDaztd04NEJOW6w+Lseg/TYSN29lBf7JGG7ucEye2d/avES8owHuXC15sgu4xtW6tteOJdl2L4atZKkhgOid4TGcXq6dMq1aOJnhS96QaCHUqVXCOgBICDTMo08qQlq
EeVLUTZXSpi4j9xPD2DpkcYtxlGShGlXuOfCC9HjWH8qsOQOusXxU7fU946KB/alNykaXDnQgielXLvdsjJbr7mJRQHaxpOgriEXE5sYV5pOiWZBACUCakj+ARayCHkA9oIHOS/
WQ8jmiQN0abwbWu4UprqjXx/4xGGVA4j42gSQ2R2EJ2BTdh5ux30AOzx04qQdDefYNRVREQ==

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



[GUWAwo6Lu](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QjyzPFw9Swr9y6jTCrn1EKlgQNDRD1vd>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de febrero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Influencia del receptor SLAMF7 sobre la adhesión de células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Nataly López Garduño. 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. Arturo Gutiérrez Guerrero





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ARTURO GUTIERREZ GUERRERO | Fecha:2026-02-26 12:46:27 | FIRMANTE

mRZIEkVroE7lyDoy20ZnYE3zuObP1YB0Uymi+c+LI6OWhr6Ys1BVE43cKgtqhDQRP50zd8KTv2VSha4luAjSW7dgFVN7M7tUvg3LPpL2TFcgTPLzbuE6wdXTZjAeEDLH0jdfV
KKvyvAFKnO1/0IHCp72AyTHpdoyrQXufqoNEYkRt3ILRtM5b8YVDOypD7CykOtcX6EbFm+tnZjuVpfasRyIVnwCB53zd5FIIZ0Ktum3q3d9h66ECCgswJ8dJqzsKF9QaGneqk8d4fW
44ym4wRpqymdGexYZ89hZc6ePwJjk9I5cLa19Y0z5T1TxAIzfGqoDpvULnqn4Sp95NpBYQ==

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



[0toPr3fQ8](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/m6WpiHeuRKVzmy1LOvdeL0UGKZ2EEIq>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de febrero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"Influencia del receptor SLAMF7 sobre la adhesión de células NK"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Nataly López Garduño. 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. José Luis Montiel Hernández





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2026-04-20 19:48:53 | FIRMANTE

RD6yXAYk8Mtz38w43wBuWSatnGLekcJ3JGln4Z/VC2vp+W1zDrbsb+3TMXOOaTNQoowHmQA7G9lZa1RUdVTbERNbOdkYP6Ymwqueh8/yPUtJMFq1Q2hXxuXWvJ47uCDBZo83z24l4uz6+acawp6giC+noe18oz6xrhD3EX3OowhcentzC/SocFz105lI5HifySdVDC9gkZ+xJVIOiM/GtJxsn9UKDvF6t6E/Qqg096/ewtTF4JNi7Cub+uPSD2tYXYGraH8sPeoo/ZhpxAuAMYKsQLOfAno2q1ivlEhNyaTLjll3mTBanJiE8lW/o6lfls7QsXlcQkzQgAgDZhsqYQ==

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



JB30XZ2I5

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nALfrRHRw8WcV7ZC6miTNY9PPzLzAoP>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029