



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

Verónica Andrea Somaglia

Genética y expresión de los genes KIR y funcionalidad de las células Natural Killer en un panel de individuos normales

**Tesis presentada para obtener el título de
“Licenciada en Genética”**

Director

Leonardo Fainboim

Posadas, Misiones 2009



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

TESIS DE GRADO PARA ACCEDER AL TÍTULO DE LICENCIADO EN GENÉTICA

**GENÉTICA Y EXPRESIÓN
DE LOS GENES KIR Y FUNCIONALIDAD DE
LAS CÉLULAS NATURAL KILLER EN UN
PANEL DE INDIVIDUOS NORMALES**

TESISTA

Verónica Andrea Somaglia

DIRECTOR

Leonardo Fainboim

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas “José de San Martín”. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. CONICET

Cátedra de Planeamiento de Trabajo Científico
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones

2009

*A mis abuelos,
Beto y Mavel*

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi mamá Fabiana, mi papá Gerardo y mi hermanito Julián, que son la base de mi vida y sin ellos no sería nada de todo lo que hoy soy.

A mis abuelos, por los rezos incesantes de mi abuela, la presencia incondicional de los dos y el amor enorme que me brindan día a día.

A mi novio, Mario, por su amor, por su apoyo incondicional y por siempre alentarme a seguir adelante... Te AMO.

A Caro, Marcos, Emi, Seba, Romi, Chany y Carla, que son los mejores amigos que alguien pueda tener, y que a pesar de las distancias estuvieron y están conmigo SIEMPRE.

A mi jefe Leonardo, por brindarme la posibilidad de trabajar, aprender y crecer junto a él, por respetarme y demostrarme que todavía hay gente que se alegra por el crecimiento de los demás.

A Graciela, Mónica, Adriana, Lourdes, Cecilia, Ariel, Pachi, Natalia y Ana Claudia, por haberme hecho sentir tan bien en el laboratorio, por su enorme ayuda y por todo lo que me enseñaron estos meses, imprescindible para la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas que de manera indirecta o sin saberlo contribuyeron a que esto sea posible.

SUMARIO

Introducción.....	1
Objetivos.....	26
Materiales y Métodos.....	28
Resultados.....	42
Discusión.....	58
Referencias Bibliográficas.....	66

ÍNDICE

Agradecimientos.....	III
Sumario.....	IV
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
Lista de Figuras y Tablas.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Células Natural Killer (NK).....	2
1.1. Estimulación de las células NK.....	3
1.2. NK ^{bright} y NK ^{dim}	4
1.3. Receptores de las células NK.....	5
1.3.1. Receptores NK activadores.....	6
1.3.2. Receptores NK inhibidores.....	8
1.4. Mecanismo citotóxico de las células NK.....	10
2. Los receptores KIR.....	10
2.1. Nomenclatura de los genes KIR.....	11
2.2. Diversidad de los genes KIR.....	13
2.2.1. Organización del locus KIR.....	14
2.2.2. Haplotipos del grupo A y B.....	15
2.3. Especificidad de ligandos KIR.....	18
2.4. Organización de la estructura exón-intrón de los genes KIR.....	20
2.5. Expresión de los genes KIR.....	22
2.5.1. Regulación de la expresión.....	24
II. OBJETIVOS.....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Población en estudio.....	29
2. Líneas celulares.....	29
3. Metodologías.....	29
3.1. Tipificación de polimorfismos genéticos.....	29
3.1.1. Extracción de ADN genómico.....	29

3.1.2.	Tipificación de los genes KIR.....	30
3.1.3.	Identificación de alelos del KIR2DS4.....	32
3.1.4.	Tipificación de los genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C.....	34
3.1.5.	Técnica de sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia o <i>Sequence-specific oligonucleotide probing</i> (SSOP).....	34
3.2.	Citometría de flujo de los receptores de las células NK.....	35
3.2.1.	Obtención de PBMCs a partir de sangre periférica.....	35
3.2.2.	Marcación con anticuerpos monoclonales.....	36
3.2.3.	Doble marcación KIR/NKG2A.....	37
3.3.	Determinación de la funcionalidad en células NK.....	37
3.3.1.	Obtención de PBMCs a partir de sangre periférica.....	37
3.3.2.	Determinación de la función citotóxica de las células NK.....	38
3.3.3.	Determinación de la función secretora de las células NK.....	39
3.4.	Análisis citométrico.....	40
3.5.	Análisis estadísticos.....	40
IV.	RESULTADOS.....	42
1.	Frecuencias génicas en la población Caucásica.....	43
2.	Fenotipo de los receptores KIR en las células NK.....	44
2.1.	Expresión aleatoria de los genes KIR.....	45
2.2.	Expresión del heterodímero CD94/NKG2A.....	47
2.3.	Influencia del ligando en la expresión de los receptores KIR.....	49
3.	Funcionalidad de las células NK.....	52
3.1.	Estimulación con PMA/ionomicina.....	54
3.2.	Influencia de los receptores KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 en la funcionalidad.....	56
V.	DISCUSIÓN.....	58
1.	Conclusiones.....	63
2.	Perspectivas.....	65
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMEN

Las células NK forman parte de la primera línea de defensa contra patógenos intracelulares, virus o tumores. Los genes KIR constituyen una familia de receptores expresados en la superficie de estas células y presentan como ligando a las moléculas HLA expresadas constitutivamente por células normales permitiendo a las células NK reconocer células aberrantes que han disminuido la expresión de dichas moléculas. El alto grado de polimorfismo y la expresión aleatoria que caracteriza a los receptores KIR, han sido asociados con el desarrollo de numerosas enfermedades. El objetivo de este trabajo fue estudiar en un panel de 20 individuos sanos el genotipo KIR, la expresión de estos genes en la superficie de las células NK y cómo el genotipo y el fenotipo de estos genes KIR puede influir en la funcionalidad de las células NK.

En el análisis genotípico el gen KIR2DS3 resultó el menos frecuente de la población Caucásica mientras que los genes KIR2DL1, KIR3DL1, KIR2DS4 y el pseudogen KIR2DP1 presentan las frecuencias más altas. Se demostró que los genes KIR no solamente no se encuentran expresados por todas las células NK, sino que también presentan variación en su grado de expresión. Por otro lado, la expresión del receptor KIR2DL4 fue muy baja en las células CD56^{dim} en contraste con su alta expresión en las células CD56^{bright}. El estudio del heterodímero CD94/NKG2A mostró que ambas moléculas se encuentran expresadas en casi la totalidad de las células CD56^{bright}, mientras que mostraron una expresión diferente en lo que respecta a las células CD56^{dim}. Este estudio también demostró la co-expresión de la molécula NKG2A y el receptor KIR2DL3. El análisis de la relación KIR/HLA mostró que la homocigidad de la molécula HLA-C2 aumentaría el porcentaje de células NK que expresan el KIR2DL1, (receptor de HLA-C2), implicando una influencia del HLA sobre la expresión de los receptores KIR. La técnica utilizada para el estudio de la funcionalidad de las células NK a través del estímulo con la línea celular K562 mostró una alta especificidad al resultar activadas sólo las células CD56^{dim}, únicas portadoras de receptores KIR. No se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a la actividad citotóxica ni secretora de las células NK. Se observó una importante asociación existente entre los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/L3 con la respuesta citotóxica de las células NK que puede deberse a las diferencias que presentan estos receptores en cuanto a la afinidad por sus ligandos.

ABSTRACT

NK cells are part of the first line of defense against intracellular pathogens, viruses and tumors. KIR genes are a family of receptors expressed on the surface of NK cells and have as ligands HLA molecules expressed constitutively by normal cells, allowing NK cells to recognize aberrant cells that have lost or down-modulated the expression of HLA molecules. The high degree of polymorphism and the random expression that characterize KIR receptors have been associated with the development of numerous diseases. The aim of this study was to investigate on a panel of 20 healthy individuals the KIR genotype, the expression of these genes on the surface of NK cells and how the genotype and phenotype of these KIR genes may influence the function of NK cells.

The analysis of KIR genotypes showed that in Caucasian individuals the KIR2DS3 gene was poorly represented whereas KIR2DL1, KIR3DL1, KIR2DS4 and KIR2DP1 have the highest frequencies. Our analysis of how KIR genes are expressed on the surface of NK cells revealed that KIR genes are both not expressed by all NK cells but also exhibit variation in their degree of expression. Furthermore, the expression of the KIR2DL4 receptor was very low in CD56^{dim} cells in contrast to its high expression in CD56^{bright} cells. The study of the CD94/NKG2A heterodimer showed that both molecules are expressed in almost all CD56^{bright} cells, while showing a different expression in terms of CD56^{dim} cells. This study also demonstrated the co-expression of the molecule NKG2A and the KIR2DL3 receptor. The analysis of the relationship KIR/HLA showed that the homozygosity of HLA-C2 would increase the percentage of NK cells expressing KIR2DL1 (HLA-C2 receptor), implying an influence of HLA on the expression of KIR receptor. The technique used to study the function of NK cells by stimulating them with the cell line K562 showed high specificity because CD56^{dim}, the cells that almost exclusively express KIR genes, were the only ones responding to them. There were no significant differences between men and women in terms of cytotoxic or secreting function of NK cells. There was a significant association between the KIR2DL1 and KIR2DL2/L3 receptors with the cytotoxic response of NK cells that may be due to the differences in these receptors's affinity for its ligands.

ABREVIATURAS

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNc: Ácido Disoxirribonucleico copia
APC-Cy7: Allophycocyanin-Carbocyanin 7
ARN: Ácido Ribonucleico
CD: Antígenos de Diferenciación
CTL: Linfocitos T Citotóxicos
EDTA: Etilendiaminotetraacético
Fig.: Figura
FITC: Fluorescein isothiocyanate
GL: Ganglio Linfático
HCV: Virus de la Hepatitis C
HLA: Antígeno Asociado a Leucocitos Humanos
IFN: Interferón
Igs: Inmunoglobulinas
IL: Interleuquina
ILT: Transcritos del tipo Inmunoglobulinas
IMF: Intensidad Media de Fluorescencia
ITAM: Motivo Activador del Inmunoreceptor basado en Tirosina
ITIM: Motivo Inhibidor del Inmunoreceptor basado en Tirosina
KIR: *Killer cell Immunoglobulin-Like Receptor* (Receptores del tipo Inmunoglobulinas de las células Asesinas)
LAIR: Receptor Inhibitorio Asociado a Leucocitos
LIR: Receptor Leucocítico del tipo Inmunoglobulinas
LRC: Complejo Receptor Leucocítico
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK: *Natural Killer* (Asesinas naturales)
NKC: Complejo NK
OLS: Órganos Linfáticos Secundarios
Pb: Pares de bases

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PE: Phycoerythrin

PE-Cy5: Phycoerythrin-Carbocyanin 5

PerCP: Peridinin Chlorophyll Protein Complex

PMA: Phorbol 12-Myristato 13-acetato

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SSOP: Sondas de Oligonucleótidos Específicos de Secuencia

TCR: Receptor de Células T

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

UV: Ultravioleta

En este trabajo de tesina se utilizaron algunos vocablos o abreviaturas en inglés, de uso frecuente en el laboratorio, que no tiene traducción al español.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Expresión de receptores CD56 y CD16 en células NK. Células mononucleares de sangre periférica marcadas con anticuerpos anti-CD56 conjugado con PE y anti-CD16 conjugado con FITC, analizadas por citometría de flujo. El dot plot muestra las poblaciones de células NK que pueden distinguirse fenotípicamente por la expresión en membrana de CD56 y CD16.

Figura 2. Mapa del Complejo Receptor Leucocítico (LRC). Al menos 40 miembros pertenecientes a la superfamilia de las Ig mapean en el cromosoma 19q13 dentro del LRC. Los genes KIR mapean específicamente en la región 19q13.4. Adaptado de Fainboim L., Geffner J., 2005.

Figura 3. Estructura de los receptores KIR. Los genes KIR codifican proteínas con dos o tres dominios Ig extracelulares y con colas citoplasmáticas largas o cortas. El dominio citoplasmático de los receptores inhibitorios contiene secuencias ITIM (I/VxYxxL/V) mientras que un residuo aminoacídico cargado se localiza en la región transmembrana de los receptores activadores. KIR2DL4 contiene características de ambos tipos de receptores (Adaptado de www.chori.org).

Figura 4. Organización del locus KIR humano. El primer haplotipo ejemplifica al grupo A y el segundo al grupo B. El cuadrado que representa cada gen contiene a su vez el número de alelos identificados para cada uno. Los genes conservados se encuentran en marrón. Los genes que pueden estar presentes en ambos grupos son de color amarillo. Y en azul se observan los genes solo presentes en haplotipos del grupo B. (Parham P., 2005)

Figura 5: Haplotipos de los receptores KIR. Se representan el haplotipo A y los 9 haplotipos B más comunes presentes en la población caucásica. La casilla coloreada indica la presencia del gen: los genes conservados están representados en verde, los genes que pueden estar presente tanto en el haplotipo A como B se muestran en amarillo y los genes y/o alelos específicos de los haplotipos B figuran en celeste. En la fila de los

receptores KIR3DL1/3DS1, la letra “L” significa que el haplotipo presenta el KIR3DL1 y la “S” que posee el KIR3DS1. Para los genes KIR2DL2/2DL3, el “2” implica la presencia del KIR2DL2 y el “3” del KIR2DL3 (Parham P., 2005)

Figura 6. Especificidad de ligandos de los receptores KIR. Las interacciones receptor-ligando más débiles se representan por flechas rosadas punteadas y las más fuertes con flechas azules. La interacción entre KIR3DL1 con alotipos Bw4-80I (isoleucina en posición 80) parece ser más fuerte (flecha azul) que con Bw4-80T (treonina en posición 80) (flecha celeste). Los ligandos para KIR2DL5, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 y KIR3DL3 permanecen sin definirse (Kulkarnia S. y col., 2008)

Figura 7. Estructura exón – intrón de los genes KIR. Los exones 1 y 2 codifican para el dominio de la secuencia líder (señal) (amarillo); los exones 3–5 codifican los dominios Ig D0, D1, y D2, respectivamente (violeta, verde, y azul); los exones 6 y 7 lo hacen para el dominio de unión y las regiones transmembrana, respectivamente (rosado y turquesa); y los exones 8 y 9 codifican para el dominio citoplasmático (azul oscuro). Tanto en los genes KIR de dos dominios Tipo 1 como en el pseudogen KIR2DP1, el exón 3 (que codifica D0) en las moléculas con tres dominios Ig, es un pseudoexón (lila). KIR2DP1, también contiene el pseudoexón 4 (verde claro). Los genes KIR de dos dominios del Tipo 2 presentan ausencia completa del exón 4. (Carrington M., Norman P.J.; 2003)

Figura 8. Diseño de la técnica de PCR-SSOP para la tipificación de los genes KIR.

Figura 9. Producto de PCR de genes KIR. Calle 1-3 PCR para dominios 1 y 2, calles 4-6 PCR para dominio transmembrana – citoplasmático, calle 7, ladder 100 pb.

Figura 10. Patrón de reactividad de sondas del KIR2DS4. Combinación de sondas que resultan positivas (casilleros coloreados) para cada uno de los alelos del gen KIR2DS4.

Figura 11. Expresión aleatoria de los genes KIR en las células NK. Porcentaje e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de cada uno de los anticuerpos anti KIR

dentro de la población de células CD56 en el panel de estudio completo. En A el valor gráfico corresponde al porcentaje de células NK. En B y C el valor gráfico corresponde a la IMF de cada anticuerpo. Mientras que en B están incluidos todos los individuos analizados marcados con los anticuerpos que reconocen varios receptores a la vez, en C están representados sólo aquellos individuos portadores del gen que cada anticuerpo específico reconoce, además del KIR3DL2 calculado a partir de individuos KIR3DL1–3DL2+. Se observa variación tanto en los porcentajes de células que expresan cada gen KIR como en la IMF de los distintos receptores. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Test de Bonferroni.

Figura 12. Expresión diferencial del receptor KIR2DL4. *Dot plot* representativo de la expresión del receptor KIR2DL4 utilizando anticuerpos anti-KIR2DL4. La región representada en azul corresponde a las células NK CD56^{bright}, y la región en verde a las células NK CD56^{dim}. La expresión del KIR2DL4 se observa prácticamente restringida a las células CD56^{bright}, con muy poca o nula expresión en las células CD56^{dim}. La región en rojo representa a la población KIR negativa.

Figura 13. Expresión de las moléculas CD94 y NKG2A. *Dot plot* representativo utilizando anticuerpos anti-CD94 (A) y anti-NKG2A (B). Porcentaje de células CD56^{dim} y CD56^{bright} que expresan cada receptor. La región representada en azul corresponde a las células CD56^{bright}, la verde a las CD56^{dim} y la roja a la población negativa para la molécula respectiva. Ambos receptores muestran una expresión de casi el 100% en las células CD56^{bright}. CD94 se expresa también en prácticamente todas las células CD56^{dim}, mientras que NKG2A se expresa en menos del 50% de dichas células.

Figura 14. Co-expresión de los receptores NKG2A y KIR2DL3. *Dot plot* representativo de los individuos que presentan el gen KIR2DL3 en su genotipo (A) e individuos que no lo presentan (B). En A se observa co-expresión de los dos receptores mientras que en B no.

Figura 15: Influencia del ligando HLA-C2 en la expresión del receptor KIR2DL1. Se observa el porcentaje (A) de células NK que expresan el receptor KIR2DL1 y la IMF (B) de este receptor en individuos homocigotas para HLA-C2 (HLA-C2/C2),

heterocigotas (HLA-C1/C2) y. homocigotas para HLA-C1 (HLA-C1/C1). Estos últimos carecen de ligando para el KIR2DL1. *p* no significativo.

Figura 16. Influencia del ligando HLA-C1 en la expresión del receptor KIR2DL2/L3. Se observa el porcentaje (A) de células NK que expresan el receptor KIR2DL2/3 y la IMF (B) de este receptor en individuos homocigotas para HLA-C1 (HLA-C1/C1), heterocigotas (HLA-C1/C2) y. homocigotas para HLA-C2 (HLA-C2/C2). Estos últimos carecen de ligando para el KIR2DL2/3. No se observaron diferencias en los porcentajes ni en la IMF. Los valores representan la media calculada entre todos los individuos de cada grupo (HLA-C1/C1=3, HLA-C1/C2=11, HLA-C2/C2=2). *p* no significativo.

Figura 17. Influencia del ligando HLA-Bw en la expresión del receptor KIR3DL1. Se observa el porcentaje (A) de células NK que expresan el receptor KIR3DL1 y la IMF (B) de este receptor en individuos que portan el ligando HLA-Bw4 e individuos que portan el ligando HLA-Bw6. Estos últimos carecen de ligando para el receptor KIR3DL1. No se observaron diferencias en los porcentajes de células NK ni en la IMF. Los valores representan la media calculada entre todos los individuos de cada grupo (HLA-Bw4=7, HLA-Bw6=4). *p* no significativo.

Figura 18. Capacidad citotóxica y secretora de las células NK estimuladas con la línea celular K562. Porcentaje de células NK que expresan las moléculas CD107a (A) e IFN gamma (B). Media CD107a= 18.21. Media IFN gamma: 3.63. El porcentaje de células NK CD107a+ fue mucho mayor que el porcentaje de células NK IFN gamma+.

Figura 19. Funcionalidad de las células NK en mujeres y hombres. Porcentaje de células NK que expresan las moléculas CD107a (A) e IFN gamma (B) en mujeres (■) y hombres (▲). No se encontraron diferencias significativas entre las medias en ninguno de las dos situaciones estudiadas. Mujeres=13, Hombres=9. *p* no significativo.

Figura 20. Estimulación con PMA/ionomicina versus estimulación con K562. Porcentaje de células NK que mostraron actividad citotóxica (A) y secretora (B) en condición de no estimulación (■), estimulación con K562 (▲) y estimulación con PMA/ionomicina (●). Los dos tipos de estimulaciones produjeron aumento en el

porcentaje de células NK CD107a+ e IFN gamma+. El estímulo con PMA/ionomicina produce la activación de más del doble de células NK en cuanto a citotoxicidad, y las activa aproximadamente once veces más en cuanto a su función secretora. $p < 0.0001$, Test de Bonferroni.

Tabla 1. Receptores y co-receptores de las células NK involucrados en la regulación de las funciones mediadas por dichas células (Biassoni R. y col., 2001).

Tabla 2. Nomenclatura de los genes KIR. Adaptación tomada de Marsh S.G.E. y col., 2003.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como primers en las PCR 1 y 2 realizadas para tipificar los genes KIR.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como sondas en la técnica de SSOP para tipificar los genes KIR.

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos utilizados como primers para la amplificación del gen KIR2DS4.

Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados como sondas para la tipificación alélica de KIR2DS4.

Tabla 7. Esquema experimental planteado para en estudio de la funcionalidad de las células NK.

Tabla 8. Frecuencia de los genes KIR en la población Caucásica expresada como porcentaje de la población analizada. Los genes KIR2DL4, KIR3DL2 y KIR3DL3 y el pseudogen KIR3DP1 no se exponen en la tabla ya que presentan una frecuencia de 1.

Tabla 9. Influencia de los receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en la citotoxicidad de las células NK. $p > 0.05$. Test de Fisher

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Células Natural Killer (NK)

Las células Natural Killer (NK) son una estirpe celular linfocitaria que constituye entre el 5% y el 20% de las células mononucleares presentes en la sangre. Una proporción importante de las células NK se ubican en los órganos linfáticos secundarios (OLS). En los ganglios linfáticos (GL) inflamados constituyen alrededor de 5% de las células mononucleares, contra un 05-1% en GL no inflamados (Fehniger y col., 2003; Ferlazzo y col., 2004a).

Sus precursores están en la médula ósea, comparten un progenitor común con los linfocitos T, y se diferencian morfológicamente de estos últimos y de los linfocitos B por ser de mayor tamaño y poseer numerosos gránulos citoplasmáticos prominentes. Las células NK se caracterizan por ser CD3⁻ y CD56⁺ (Robertson y col., 1990; Trinchieri, 1989) y son componentes cruciales del sistema inmune innato donde constituyen la primera línea de defensa. Son capaces de reconocer células “anormales” como las células tumorales transformadas, células infectadas por virus y células que están bajo “stress”. Las células NK actúan a través de su actividad citotóxica contra estas células y mediante la secreción de citocinas y quemocinas que modulan los pasos siguientes en la respuesta inmune adaptativa (como la secreción de IFN-gamma que activa a los macrófagos y TNF que induce la expresión de moléculas co-estimuladoras en las células dendríticas. (Biron y col., 1999; Ferlazzo y col., 2004b; Gerosa y col., 2002; Piccioli y col., 2002; Trinchieri, 1989).

Las células NK, a diferencia de los linfocitos T citotóxicos (LTC), no presentan rearreglo de genes ni expresan receptores para el antígeno (TCR), en cambio, poseen un complejo sistema de receptores de superficie de activación y de inhibición cuyas señales ayudan a balancear la respuesta de las células NK entre tolerar a las células sanas y destruir a las infectadas o transformadas (Biassoni y col., 2001; Bryceson & Long, 2008; Lanier, 1998a; Moretta y col., 2001; Parham, 2005; Trinchieri, 1989). Cuando una célula NK interactúa con otra célula, el desenlace viene determinado por la integración de las señales generadas a partir de toda una colección de receptores inhibidores y activadores que pueden expresarse en la célula NK y entrar en contacto

simultáneamente con sus ligandos expresados en la célula blanco. A su vez, el resultado final también se encuentra influenciado por aspectos cuali y cuantitativos.

En condiciones fisiológicas, la función de los receptores inhibitorios predomina sobre la de los receptores activadores, de manera que las señales activadoras queden bloqueadas con el fin de impedir la estimulación de las células NK y su ataque contra las células normales propias (Lanier, 1998a; Long, 1999; Parham, 2005).

Como se verá más adelante, muchos de los receptores activadores e inhibidores de las NK también se expresan en subpoblaciones de linfocitos T, como las $\gamma\delta$ y los $CD8^+$, una vez que fueron activadas por un antígeno. Esta expresión contrasta con la expresión constitutiva de estos receptores en las células NK. Esto pone de relieve una distinción importante entre la inmunidad innata y la adaptativa: las células efectoras de la inmunidad innata, como las células NK, están absolutamente diferenciadas y listas para responder de inmediato a las infecciones, mientras que las pertenecientes a la inmunidad adaptativa se generan a partir de unos precursores indiferenciados sólo después de la exposición al antígeno.

1.1. Estimulación de las células NK

Uno de los principales estímulos que produce la activación de las células NK es la reducción o ausencia de expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC o HLA) de clase I en la superficie de las células blanco. Este mecanismo fue propuesto por Ljunggren & Kärre como “The Missing self hypothesis”. Esta hipótesis propone que las interacciones entre una célula NK y una célula blanco conducen a la lisis de esta última a menos que la célula blanco exprese moléculas MHC clase I que se unan específicamente a receptores inhibitorios de las células NK. La unión a dichos receptores inhibitorios “apaga” la cascada de señalización que dispara la citólisis. Por el contrario, las células que han perdido la expresión normal de moléculas MHC clase I (Missing self) son incapaces de mandar señales inhibitorias a las células NK volviéndose susceptibles a la lisis. Muchos patógenos intracelulares han desarrollado mecanismos que impiden la expresión de moléculas MHC clase I y, por lo tanto, la presentación de antígenos a las células T CD8. Este mecanismo permite a las células infectadas evitar la detección por los linfocitos T, pero las convierte en blanco de las células NK. De manera similar ocurre con células

tumorales que sufren mutaciones que reducen la expresión del MHC clase I. Esta alteración en la expresión de las moléculas MHC lleva a la destrucción o lisis de las células afectadas por parte de las células NK (Brodsky y col., 1999; Garrido y col., 1997; Ljunggren & Kärre, 1990; Tortorella y col., 2000). Sin embargo, este modelo no explica por completo el mecanismo de activación de las células NK y la protección de algunas células normales propias con poca o nada de expresión de moléculas MHC. Por esta razón es que se planteo “The Induced self-recognition hypothesis” basada en la presencia de receptores activadores en las células NK y sus respectivos ligando en células infectadas o transformadas (Diefenbach & Raulet, 2001).

La expansión de las células NK y su actividad citotóxica y secretora también resultan estimuladas de manera inespecífica por citocinas y quemocinas secretadas por otras células, como por macrófagos. Entre las citocinas se encuentran la IL-15, IL-12, IL-18, IL-2, IFN tipo I (IFN- α , IFN- β). Las quemocinas tienen el potencial de regular la migración de las células NK y el desarrollo de sus funciones en tejidos específicos durante infecciones, y de inducir la producción de algunos de estos factores para la defensa contra distintos patógenos (Chan S.H. y col., 1991; Biron y col., 1999).

1.2. NK^{bright} y NK^{dim}

De acuerdo a la intensidad en la expresión de la molécula CD56 en la superficie de las células NK de sangre periférica se han definido dos subpoblaciones (*Figura 1*): las CD56^{bright} y las CD56^{dim}. Las CD56^{dim} representan más del 90% de las células NK, presentan bajo nivel de expresión de CD56 junto con elevados niveles de CD16, a su vez expresan altos niveles de receptores KIR (que, como se verá más adelante, son un tipo de receptores de las células NK) y tienen a su cargo principalmente la función citotóxica. Por otro lado, las células NK CD56^{bright}, que son las mayores secretoras de citocinas, representan el 10% de las células NK restantes. Además de los altos niveles de CD56, expresan baja o nula expresión de CD16, y bajos niveles de receptores KIR asociados con una alta expresión de las moléculas CD94-NKG2A (ver más adelante). Estudios realizados sugieren que las células CD56^{bright} serían precursoras de las células CD56^{dim} (Romagnani y col., 2007).

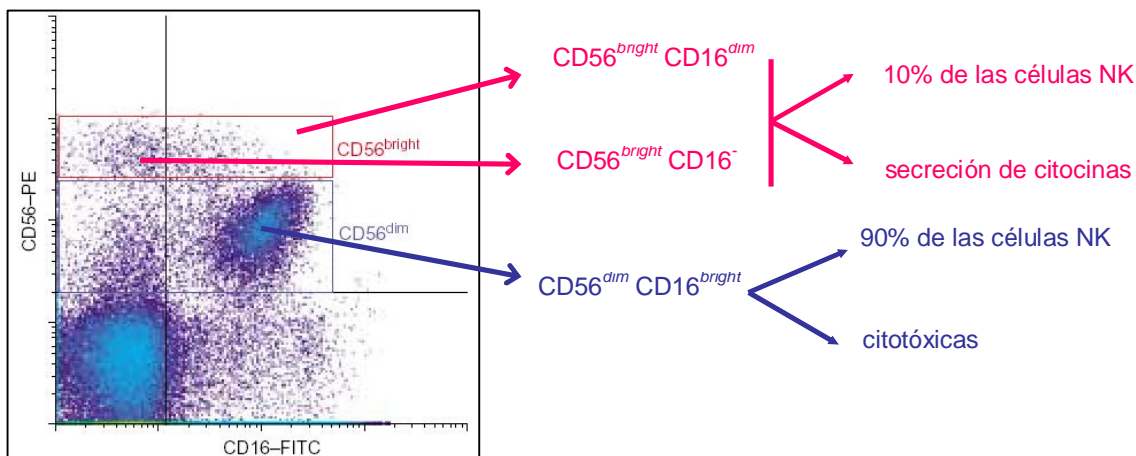


Figura 1. Expresión de receptores CD56 y CD16 en células NK. Células mononucleares de sangre periférica marcadas con anticuerpos anti-CD56 conjugado con PE y anti-CD16 conjugado con FITC, analizadas por citometría de flujo. El dot plot muestra las poblaciones de células NK que pueden distinguirse fenotípicamente por la expresión en membrana de CD56 y CD16.

1.3. Receptores de las células NK

Las células NK expresan una gran variedad de receptores, activadores e inhibidores, y co-receptores en su superficie celular (*Tabla 1*). Se han identificado dos familias génicas de receptores NK que comparten el reconocimiento de moléculas HLA (Antígeno Asociado a Leucocitos Humanos) de clase I: la **superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs)** y la **familia de las lectinas de tipo C**.

La superfamilia de las Igs forman parte del Complejo Receptor Leucocítico (LRC) ubicado en el cromosoma 19, que además de los genes KIR (Receptores del tipo Inmunoglobulinas asociados a las células asesinas) y LIR (Receptor Leucocítico del tipo Inmunoglobulinas) que reconocen moléculas HLA clase I, incluye a los genes LAIR (Receptor Inhibitorio Asociado a Leucocitos) y NKp. La familia de lectinas tipo C se encuentran en el complejo NK (NKC) ubicado en el cromosoma 12, e incluye el heterodímero NKG2/CD94 (Parham, 2005; Wilson y col., 2000; Yabe y col., 1993). Otros receptores activadores e inhibidores presentes en las células NK, se encuentran codificados en cromosomas distintos a los anteriores.

<i>Nombre del Gen</i>	<i>Localización cromosómica</i>	<i>Nombre del Receptor</i>	<i>Función</i>	<i>Especificidad de ligando</i>
KIR2DL1	19q13.42	p58.1	inhibitoria	HLA-Cw2, 4, 5, 6
KIR2DL2	19q13.42	p58.2	inhibitoria	HLA-Cw1, 3, 7, 8
KIR3DL1	19q13.42	p70	inhibitoria	HLA-Bw4
KIR3DL2	19q13.42	p140	inhibitoria	HLA-A3, -A11
KIR2DL4	19q13.42	p49	inhibitoria?	HLA-G
KIR2DS1	19q13.42	p50.1	activadora	HLA-Cw2, 4, 5, 6
KIR2DS2	19q13.42	p50.2	activadora	HLA-Cw1, 3, 7, 8
KIR2DS4	19q13.42	p50.3	activadora	desconocido
LIR1/ILT2	19q13.42	LIR1/ILT2	inhibitoria	HLA-G y varios HLA clase I
LIR2/ILT4	19q13.42	LIR2/ILT4	inhibitoria?	HLA-F
CD94	12p12-13	A	A	a
NKG2A	12p12-13	CD94/NKG2A	inhibitoria	HLA-E
NKG2C	12p12-13	CD94/NKG2C	activadora	HLA-E
LAIR1	19q13.42	p40/LAIR1	inhibitoria	desconocido
IRC1	17	IRp60	inhibitoria	desconocido
CMRF35	17q24	CMR35	?	desconocido
AIRM1	19q13.3	p75/AIRM1	inhibitoria	desconocido
NKp46	19q13.42	NKp46	activadora	desconocido
1C7/NK-A1	6p21.3	NKp30	activadora	desconocido
NKp44	6p21.1	NKp44	activadora	desconocido
NKG2D	12p12-13	NKG2D	activadora	MICA, MICB, ULBP
2B4	1q23.3	2B4	activadora	CD48
KLRF1	12p12-13	NKp80	activadora	desconocido

Tabla 1. Receptores y co-receptores de las células NK involucrados en la regulación de las funciones mediadas por dichas células (Biassoni y col., 2001).

1.3.1 Receptores NK activadores

Los receptores activadores de las células NK abarcan a varios grupos de moléculas distintos por su estructura, cuyos ligandos se desconocen para un gran número de ellos. En este grupo se incluyen los receptores KIR activadores (como por ejemplo KIR2DS, KIR3DS) y el heterodímero CD94/NKG2D. Los receptores KIR activadores reconocen específicamente moléculas HLA clase I clásicas (HLA-A, HLA-B y HLA-C), mientras que CD94/NKG2A reconoce la molécula HLA clase I no clásica, HLA-E. Estos receptores activadores comparten la misma especificidad con su contraparte de receptores inhibidores. Sin embargo, la unión a sus ligandos HLA ocurre con menor afinidad que la que poseen los receptores inhibidores. Esto último sugiere la existencia de un mecanismo que asegura que las señales inhibitorias invaliden la activación de señales activadoras cuando ambos tipos de receptores se encuentran expresados en la misma célula NK, de manera que las señales activadoras van a ser llevadas a cabo sólo

cuando las células blanco carezcan de moléculas HLA que se unan a receptores inhibidores (Moretta y col., 1995; 2001). Además de los receptores anteriormente mencionados, existen otros receptores que reconocen otro tipo de moléculas diferentes a las moléculas HLA clase I o cuyos ligandos aún no se conocen. Estos receptores de activación incluyen integrinas como LFA-1; receptores de la superfamilia de las Igs como CD2, CD16, 2B4, LAIR1, Receptores Citotóxicos Naturales (NKp30, NKp44 y NKp46); y receptores de la superfamilia de las lectinas como CD69, NKR-P1, NKG2D. También es importante mencionar que existen otras moléculas expresadas por las células NK que actúan durante su activación, como por ejemplo, 2B4 y NKp80. Sin embargo, estas moléculas actúan como co-receptores, ya que su función depende de la activación simultánea de otros receptores activadores principales, como NKp46. A través de todas estas moléculas, las células NK pueden reconocer a la mayoría de las células del organismo ya que los ligandos de los receptores de activación se hayan ampliamente distribuidos (Biassoni y col., 2001; Bottino y col., 2000; Bryceson & Long, 2008a; Lanier, 1998a; Moretta y col., 2001; Natarajan y col., 2002).

La unión del ligando a los receptores activadores de las células NK da lugar a la blastogénesis de las células NK, a la producción de citocinas, que potencian la migración de estas células hacia los focos de infección, y a la consiguiente lisis de las células blanco portadoras del ligando. Un rasgo común a los receptores activadores es la presencia del aminoácido lisina cargado negativamente en sus regiones transmembrana, lo que les permite la asociación con subunidades (por ejemplo: las proteínas KARAP y DAP12) a través de un enlace no covalente. Estas subunidades contienen en sus colas citoplasmáticas motivos ITAM (motivos de activación del inmunoreceptor basados en la tirosina) y captan las cinasas que participan en la transmisión de señales. Al unirse el ligando a la porción extracelular de estos receptores, las cinasas de la familia Src citoplasmáticas fosforilan los residuos de tirosina de los ITAM, y luego los ITAM fosforilados se unen a otras tirosina cinasas proteínicas desencadenando una cascada de transmisión de señales, que culmina con la activación de la célula NK (Lanier y col., 1998b; Wu y col., 2000). Algunos estudios sugieren que la citotoxicidad mediada por las células NK es el resultado de la combinación de señales distintas y sinérgicas provenientes de interacciones entre diferentes receptores activadores de las células NK y sus respectivos ligandos expresados en las células blanco (Biassoni y col., 2001, Bottino y col., 2000; Bryceson y col., 2006; Moretta y col., 2001). A su vez, las células

NK en reposo responderían de manera distinta a las células NK activadas (Rajagopalan y col., 2001). La mayoría de los ligando para los receptores activadores parecen ser expresados también por las células normales, por lo tanto para impedir que la interacción de los receptores activadores con sus respectivos ligandos conduzca a la destrucción de estas células normales, las células NK expresan receptores inhibitorios. Mediante el bloqueo muy temprano de las señales de activación, estos receptores inhibitorios también evitan que se agote el suplemento de gránulos citotóxicos en las células NK (Bottino y col., 2000; Long, 1999; Moretta y col., 2001).

1.3.2 Receptores NK inhibidores

Los receptores inhibidores de las células NK que reconocen moléculas HLA clase I pueden organizarse en varios grupos, y una característica común a todos ellos, es la presencia en sus colas citoplasmáticas de un motivo conservado denominado ITIM (motivos de inhibición del inmunoreceptor basados en la tirosina) (Bolland y col., 1999). Uno de estos grupos está conformado por los genes KIR que, como ya se mencionó, reconoce moléculas HLA clase I clásica (HLA-A, -B y -C). Un segundo grupo de receptores inhibidores lo componen los denominados LIR, también llamado ILT (Transcriptos del tipo Inmunoglobulinas) o CD85, que registra como uno de sus miembros a ILT-2/LIR1 que se une a muchos alelos HLA clase I, mientras que otro de ellos, ILT-4/LIR2, parece reconocer una molécula HLA de clase I no clásica, HLA-F. Todos estos receptores son proteínas transmembrana de tipo I y pertenecen a la superfamilia de las Ig caracterizados por poseer dos, tres o cuatro dominios Ig extracelulares del tipo C2. El tercer grupo de receptores inhibidores está integrado por heterodímeros compuestos por la molécula NKG2A unida por un enlace covalente a la molécula CD94, ambos pertenecientes a la superfamilia de las lectinas de tipo C. Los receptores CD94/NKG2A unen HLA-E, una molécula del HLA de clase I no clásica que une péptidos derivados de las secuencias líder de las HLA clásicas (HLA-A,-B y -C) y de la HLA no clásica HLA-G. Por lo tanto, los receptores inhibidores CD94/NKG2A cumplen una función de vigilancia ante la falta de las moléculas HLA-E, HLA clásicas de clase I y HLA-G (Biassoni y col., 2001; Bryceson & Long, 2008; Long, 1999; Moretta y col., 2001; Natarajan y col., 2002). Existe otro grupo de receptores inhibitorios involucrado en la regulación negativa de la citotoxicidad mediada por

células NK, pero que a diferencia de los analizados previamente, actúan mediante el reconocimiento de ligandos que no son moléculas HLA, aunque también presentan motivos ITIM en sus colas citoplasmáticas. Algunos de estos receptores son p40/LAIR-1, IRp60, p75/AIRM1, KLRG1 (Biassoni y col., 2001; Bryceson & Long, 2008).

Mediante el reconocimiento específico de su ligando, el residuo tirosina del ITIM del receptor inhibitor se fosforila y recluta fosfatasa específicas que contienen el dominio SH2 (SHP-1, SHP-2) que van a actuar sobre moléculas fosforiladas en la cadena de activación dependiente de ITAM, contrarrestando el efecto de las cinasas. El resultado final es una reducción de las señales a través de los receptores activadores acoplados a cinasas que incorporan fosfatos a varios sustratos intracelulares. Este bloqueo ocurre de forma temprana en la cascada de activación (Burshtyn y col., 1996; Campbell y col., 1996; Gupta y col., 1997). Para ejercer su acción inhibitoria, los receptores inhibidores que portan ITIM deben congregarse con receptores que portan motivos ITAM, es decir, se necesita una coordinación espacio-temporal entre receptores de activación e inhibición para que sea posible la regulación negativa (Renard y col., 1997; Tomasello y col., 2000).

La población de células NK consiste de varias subpoblaciones o clones que co-expresan de manera combinada múltiples receptores inhibidores y activadores que determinan la especificidad de cada uno de esos clones por células “enfermas”. Esto las diferencia de los linfocitos T y B donde todas las moléculas del receptor antigénico presentes en un único clon son idénticas. Esta característica confiere a cada clon de células NK un set único de receptores inhibitorios específicos para moléculas HLA clase I y, por lo tanto, un patrón de reactividad potencial distinto. Hasta hace unos años, se sostenía que todas las células NK expresaban al menos un tipo de receptor inhibitorio específico para una molécula HLA clase I propia asegurándose, de esta manera, que la totalidad de las células normales del organismo estuviesen protegidas de la citotoxicidad mediada por células NK (Brennan y col., 1994; Long, 1999; Valiante y col., 1997). Sin embargo, estudios recientes han reportado la presencia de células NK circulantes carentes de receptores inhibitorios para las moléculas HLA clase I propias, las cuales demostraron ser “hipo-respondedoras”. Estos estudios, a diferencia de lo expuesto anteriormente, sugieren que la tolerancia a células propias no requiere de al menos un receptor específico para HLA clase I. Para explicar este hecho, varios modelos han sido propuestos (Anfossi y col., 2006; Gasser & Raulet, 2006; Joncker & Raulet, 2008).

1.4. Mecanismo citotóxico de las células NK

Como se mencionó previamente, el mecanismo citotóxico de las células NK conduce a la apoptosis de la célula “blanco” y es mediado a través de la liberación de proteínas contenidas en gránulos especializados presentes en su citoplasma. Estos gránulos son lisosomas modificados que contienen dos clases distintas de proteínas, denominadas perforinas y granzimas.

Las células NK y los LTC, una vez que son activados, hacen uso del mismo proceso lítico para mediar la lisis de la célula blanco. Este proceso se caracteriza por la polarización de la secreción, es decir, luego del contacto con la célula a ser destruida, el citoesqueleto de la célula NK se reorganiza, se agrupan los receptores y los lisosomas se ubican en la zona de sinapsis (contacto receptor-célula blanco), de forma tal que se orienta la liberación de los gránulos a dicha zona. Así se evita que las proteínas con actividad citotóxicas destruyan células no infectadas, incluyendo a las propias efectoras. Luego, los gránulos se fusionan a la membrana de la célula NK y se liberan las enzimas en la zona de contacto (Djeu y col., 2002; Bryceson & Long, 2008).

Además de la lisis directa de las células blanco, las células NK también poseen la capacidad de mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante la expresión del receptor CD16, a través del cual las células NK pueden reconocer células recubiertas por anticuerpos IgG y proceder a la destrucción de las células blanco (Djeu y col., 2002; Trinchieri, 1989).

2. Los receptores KIR

Los genes KIR (CD158) codifican para una familia de glicoproteínas de membrana, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se expresan como proteínas monoméricas en la superficie de las células NK y en un subset de las células T activadas o de memoria (Colonna & Samaradis, 1995; Lanier, 1998a; Steffens y col., 1998; Vely y col., 2001; Young y col., 2001). Como muestra la *Figura 2*, la familia génica KIR humana se encuentra localizada en el cromosoma 19 en el locus q13.4 dentro del LRC (complejo receptor leucocítico) (Wilson y col., 2000) y presenta funciones análogas a la familia de los genes Ly49 murinos (Barten y col., 2001).

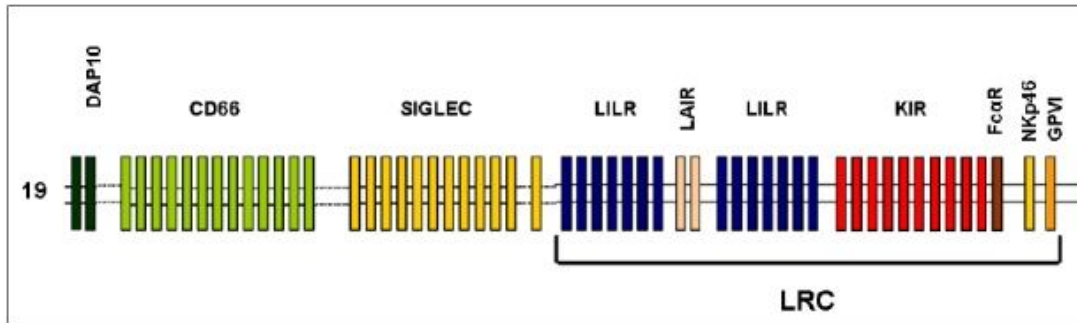


Figura 2. Mapa del Complejo Receptor Leucocítico (LRC). Al menos 40 miembros pertenecientes a la superfamilia de las Ig mapean en el cromosoma 19q13 dentro del LRC. Los genes KIR mapean específicamente en la región 19q13.4. Adaptado de Fainboim & Geffner, 2005.

Análisis de secuencias *Alu* revelaron que dentro del proceso evolutivo los genes KIR muestran un desarrollo reciente. Ha sido estimado que los eventos de duplicación génica que originaron la región genómica humana KIR ocurrieron hace 30-45 millones de años. Se cree que esta región ha evolucionado como una familia génica de muy rápida expansión durante la divergencia entre los primates y otros linajes de mamíferos (Vilches C & Parham, 2002; Wilson y col., 2000). Por esto, los genes KIR también se encuentran en primates no humanos, como chimpancé y bonobús. Posteriormente, el *locus* KIR habría cambiado dramáticamente en un lapso de tiempo de unos pocos millones de años (Khakoo y col., 2000; Rajalingam y col., 2001).

2.1. Nomenclatura de los genes KIR

Se han usado tres criterios para clasificar y nombrar a los genes KIR y sus respectivas proteínas codificadas (Marsh y col., 2003): El número de dominios extracelulares del tipo inmunoglobulinas (Ig), el largo de la cola citoplasmática y la similitud de secuencia (**Figura 3**). El número de dominios del tipo Ig puede ser dos (2D) o tres (3D). El largo de la cola citoplasmática se expresa como L para larga y S para corta, y “P” para pseudogen. Y por último, los diferentes genes KIR con una organización general similar pero con una divergencia de secuencia mayor al 2% son generalmente numerados en serie, donde el último dígito del nombre indica el número del gen que codifica para una proteína con esta estructura. Cuando dos o más genes

tienen estructuras y secuencias muy similares se les debe asignar el mismo número distinguiéndolos por una letra final, por ejemplo KIR2DL5A y KIR2DL5B. Como otras moléculas de superficie, las moléculas KIR recibieron una designación CD, siendo reconocidas como miembros de la serie CD158.

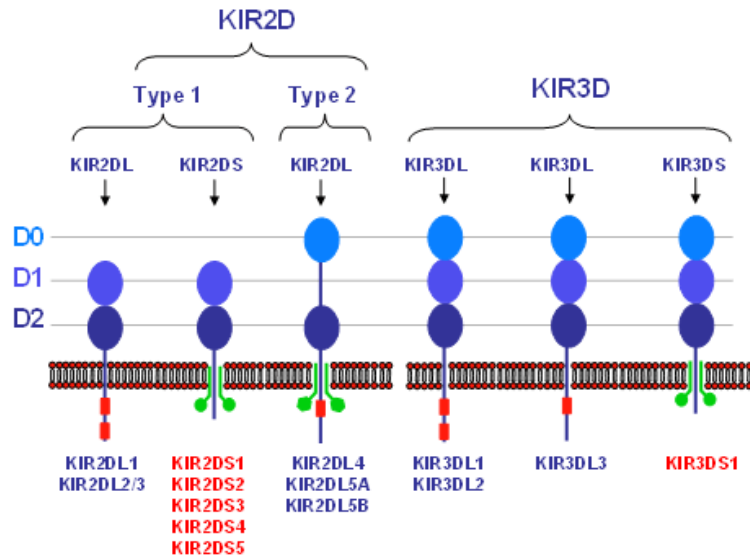


Figura 3. Estructura de los receptores KIR. Los genes KIR codifican proteínas con dos o tres dominios Ig extracelulares y con colas citoplasmáticas largas o cortas. El dominio citoplasmático de los receptores inhibitorios contiene secuencias ITIM (I/VxYxxL/V) mientras que un residuo aminoacídico cargado se localiza en la región transmembrana de los receptores activadores. KIR2DL4 contiene características de ambos tipos de receptores (Adaptado de www.chori.org).

Hasta el momento se han identificado 14 genes KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3 y 3DS1) y 2 pseudogenes (2DP1 y 3DP1) (*Tabla 2*).

Gen / Proteína	Descripción	Alias
KIR2DL1	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática larga, 1	cl-42, nkat1, 47.11, p58.1, CD158a
KIR2DL2	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática larga, 2	cl-43, nkat6, CD158b1
KIR2DL3	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática larga, 3	cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58, CD158b2
KIR2DL4	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática larga, 4	103AS, 15.212, CD158d
KIR2DL5A	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática larga, 5A	KIR2DL5.1, CD158f
KIR2DL5B	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática larga, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4
KIR2DS1	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática corta, 1	EB6ActI, EB6ActII, CD158h, p50.1
KIR2DS2	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática corta, 2	cl-49, 183ActI, CD158j
KIR2DS3	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática corta, 3	nkat7
KIR2DS4	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática corta, 4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i
KIR2DS5	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, cola citoplasmática corta, 5	nkat9, CD158g
KIR2DP2	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, dos dominios, pseudogen 1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6
KIR3DL1	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, tres dominios, cola citoplasmática larga, 1	cl-2, NKB1, cl-11, nkat3, NKB1B, AMB11, CD158e1
KIR3DL2	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, tres dominios, cola citoplasmática larga, 2	cl.5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158k
KIR3DL3	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, tres dominios, cola citoplasmática larga, 3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z
KIR3DS1	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, tres dominios, cola citoplasmática corta, 1	nkat10, CD158e2
KIR3DP1	Receptor del tipo inmunoglobulinas de las células NK, tres dominios, pseudogen 1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c

Tabla 2. Nomenclatura de los genes KIR. Adaptado de Marsh y col., 2003.

2.2. Diversidad de los genes KIR

La región genómica KIR es extremadamente variable y organizada. Los genes KIR están situados en un segmento de ADN que ha sufrido expansión y contracción a través del tiempo, y diferentes estudios de los haplotipos KIR sugieren una historia de duplicación de genes y crossing over desigual en esta región (Carrington & Norman, 2003; Wilson y col., 2000).

Los haplotipos KIR humanos están altamente diversificados, originando una vasta gama de genotipos que varían de individuo a individuo. Los haplotipos varían debido a varias características: 1) el polimorfismo alélico presente en varios genes KIR, generado por mutaciones puntuales sinónimas y no sinónimas y recombinación homóloga, y 2)

por la variabilidad en el número y tipo de genes presentes en cualquier haplotipo dado (Gardiner y col., 2001; Meenagh y col., 2008; Selvakumar y col., 1997a; Shilling y col., 1998; 2002; Steffens y col., 1998; Uhrberg y col., 1997; Valiante y col., 1997; Vilches y col., 2000a; Yawata y col., 2002). Así también, el número de copias de los genes KIR en los diferentes haplotipos puede ser variable contribuyendo con el aumento de la diversidad (Gassner y col., *in press*; Gómez-Lozano y col., 2002; Vilches & Parham P., 2002).

2.2.1. Organización del locus KIR

La región génica KIR se encuentra arreglada de una manera muy organizada, con los genes orientados de manera ascendente desde el centrómero hasta el telómero (**Figura 4**). Los genes KIR2DL4, KIR3DL2 y KIR3DL3 y el pseudogen KIR3DP1 están presentes en prácticamente todos los haplotipos, por lo que han sido denominados genes almacén o esqueleto (Hsu y col., 2002a; Uhrberg y col., 2002; Wilson y col., 2000). Los genes KIR3DL3 y KIR3DL2 definen los extremos de la región génica KIR mientras que el gen KIR2DL4 y el pseudogen KIR3DP1 definen la región media. A su vez, estos genes definen dos porciones en el *locus* KIR: la **porción centromérica** delimitada por el gen KIR3DL3 y el pseudogen KIR3DP1 y la **porción telomérica** delimitada por los genes KIR2DL4 y KIR3DL2. Entre estos genes conservados se encuentra, dependiendo de los diferentes haplotipos, un contenido de genes variable (7 a 12) donde cada gen está siempre confinado a una posición específica dentro de una región determinada (Hsu y col., 2002a; Parham, 2005; Uhrberg y col., 2002; Wilson y col., 2000). Los genes que codifican receptores inhibitorios que unen HLA-C (KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3) están situados en la parte centromérica del *locus*, mientras que los genes que codifican receptores inhibitorios para HLA-B (KIR3DL1) y para HLA-A (KIR3DL2) se encuentran en la porción telomérica (Hsu y col., 2002a; Parham, 2005; Yawata y col., 2002).

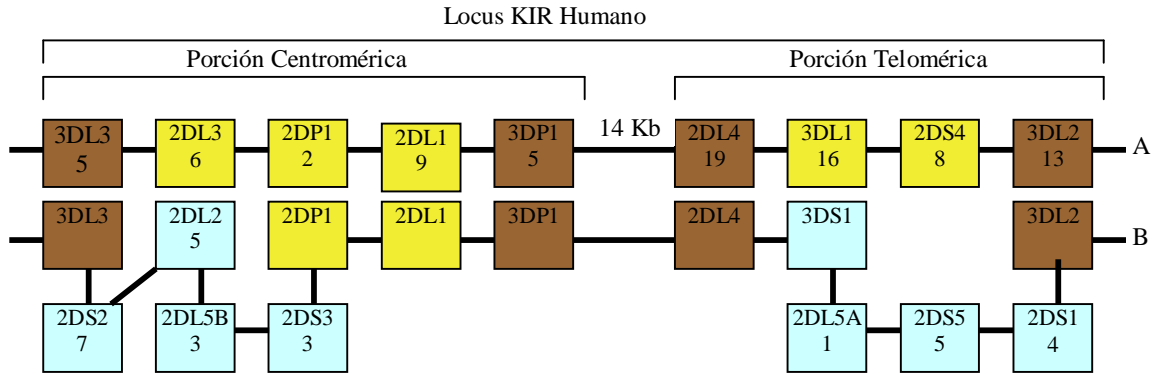


Figura 4. Organización del locus KIR humano. El primer haplotipo ejemplifica al grupo A y el segundo al grupo B. El cuadrado que representa cada gen contiene a su vez el número de alelos identificados para cada uno. Los genes conservados se encuentran en marrón. Los genes que pueden estar presentes en ambos grupos son de color amarillo. Y en azul se observan los genes presentes solo en haplotipos del grupo B. (Parham, 2005)

Una única secuencia de 14 Kb separa el KIR3DP1 del KIR2DL4 (región centromérica de la telomérica), y es el sitio preferido para la recombinación recíproca, un mecanismo que forma nuevos haplotipos reordenando nuevamente los motivos de contenido génico centromérico y telomérico. Por otro lado, los genes KIR altamente homólogos están separados por secuencias intergénicas homólogas cortas y de igual tamaño, 2.4 Kb. Este arreglo facilita la recombinación no recíproca, un mecanismo evolutivo que puede eliminar, duplicar o recombinar genes, lo que explica mucha de la diversidad de haplotipos (Hsu y col., 2002a; Parham, 2005; Uhrberg, 2005; Wilson y col., 2000; Yawata y col., 2002).

2.2.2. Haplotipos del grupo A y B

En la **Figura 4** también se puede observar que es posible distinguir dos grupos de haplotipos de acuerdo a los genes que ellos contienen (Uhrberg, 1997). Los haplotipos del grupo A tienen un menor número de genes (siete genes): 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2 y 3DL3, y dos pseudogenes: 2DP1 Y 3DP1. En los haplotipos del grupo A el KIR2DS4 sería el único receptor con función activadora. Sin embargo, este gen se encuentra con frecuencia corrompido lo que origina una delección en la región transmembrana y en la cola citoplasmática (Hsu y col., 2002b). Por otro lado, estudios recientes mostraron que el KIR2DL4 podría presentar tanto función inhibitoria como

activadora por poseer características de ambos receptores, un dominio ITIM en su cola citoplasmática y un residuo de arginina cargado en su dominio transmembrana, respectivamente (Faure y col., 2002; Kikuchi-Maki y col., 2003; Rajagopalan y col., 1999; 2001; 2006). Hsu K.C. y col. han planteado la posibilidad de dividir el grupo A en dos subgrupos, A-1D y A-2DS4, en base a si el alelo KIR1D o KIR2DS4, respectivamente, están presentes en el haplotipo (Hsu y col., 2002b). Los haplotipos del grupo A, contienen un mismo número de genes, pero se diferencian por el polimorfismo alélico (Valiante y col., 1997; Wilson y col., 2000).

A diferencia de los haplotipos del grupo A, los haplotipos del grupo B son más variables, diferenciándose principalmente por el número y tipo de genes presentes, variación que incluye la ausencia o presencia del KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR3DL1, y también por el polimorfismo alélico. Este grupo de haplotipos se caracteriza por la presencia de más de un gen KIR activador, conteniendo varias combinaciones de KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR3DS1 y KIR2DS4. Dentro del grupo B se han identificado al menos 20 haplotipos diferentes (Hsu y col., 2002a; Shilling y col., 2002; Uhrberg y col., 2002).

El estudio de ligamiento de los genes KIR ha sido muy importante para dilucidar las posibles relaciones entre los genes. Varios pares de genes y pseudogenes KIR exhiben desequilibrio de ligamiento negativo, implicando que pueden ser alelos: KIR2DL3 y KIR2DL2, KIR3DS1 y KIR3DL1, KIR2DS3 y KIR2DS5, KIR2DS1 y KIR2DS4/1D (Hsu y col., 2002a; Wilson y col., 2000; Uhrberg y col., 1997). Un desequilibrio de ligamiento positivo entre pares de genes implica una proximidad a lo largo del cromosoma y co-segregación. Distintos patrones de desequilibrio de ligamiento entre genes KIR se encuentran fijados para los haplotipos del grupo A y del grupo B. A su vez, algunos pares de genes presentan desequilibrio de ligamiento bastante fuerte exclusivamente en uno u otro grupo, pero no en los dos (Becker y col., 2003; Hsu y col., 2002a; 2002b; Shilling y col., 2002; Uhrberg, 1997).

Todas las poblaciones humanas tienen haplotipos del grupo A y del grupo B, aunque sus frecuencias varían. La selección balanceadora parece mantener la presencia de ambos haplotipos (Uhrberg y col., 2002; Yawata y col., 2002). En la población Caucásica los haplotipos del grupo A y los del grupo B se encuentran con frecuencias bastante similares (**Figura 5**) (Parham, 2005; Shilling y col., 2002).

	A	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	Haplo- tipos A + B	Haplo- tipos A	Haplo- tipos B
2DL4											100	100	100
2DL5											27,4	0	69,1
3DL1 3DS1	L	L	L	S	S	S	S	L	L	L	88,8 11,2	100 0	71,7 28,3
3DL2											100	100	100
2DL1											96,9	100	92,1
2DL2 2DL3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	36,6 63,4	0 100	92,1 7,9
2DS1											19	0	47,9
2DS2											36,6	0	92,1
2DS3											15,5	0	39
2DS4							?				88,8	100	71,7
2DS5											8,7	0	21,9
3DL3											100	100	100
Frecuencia del haplotipo (%)	58,1	11,8	8,1	3,4	2,4	2	3	4,1	2,4	1			

Figura 5: Haplotipos de los receptores KIR. Se representan el haplotipo A y los 9 haplotipos B más comunes presentes en la población caucásica. La casilla coloreada indica la presencia del gen: los genes conservados están representados en verde, los genes que pueden estar presente tanto en el haplotipo A como B se muestran en amarillo y los genes y/o alelos específicos de los haplotipos B figuran en celeste. En la fila de los receptores KIR3DL1/3DS1, la letra “L” significa que el haplotipo presenta el KIR3DL1 y la “S” que posee el KIR3DS1. Para los genes KIR2DL2/2DL3, el “2” implica la presencia del KIR2DL2 y el “3” del KIR2DL3 (Parham, 2005)

Numerosos haplotipos con diferente contenido génico segregan en las poblaciones humanas. El propósito de la variabilidad presumiblemente es la diversificación de la respuesta inmune en el contexto de un ambiente de patógenos que cambian rápidamente. La consecuencia de la variabilidad, tanto a nivel génico como a nivel haplotípico, es que individuos no relacionados raramente tengan idénticos genotipos KIR (Shilling y col., 2002) y que distintas poblaciones étnicas difieran marcadamente en la distribución de las frecuencias génicas y genotípicas de los genes KIR (Flores y col., 2007; Norman y col., 2001; Yawata y col., 2002). La diversidad de los genes KIR

tiene el potencial de contribuir con variabilidad tanto en la inmunidad innata (en las células NK) como en la adaptativa (linfocitos T) (Vilches & Parham, 2002).

2.3. Especificidad de ligandos KIR

Han sido identificados un gran número de receptores, (los KIR son de los más preponderantes) que inhiben a las células NK a través de la interacción con moléculas HLA clase I clásicas y clase Ib. Algunos isotipos de clase I, como HLA-C, HLA-E y HLA-G, habrían evolucionado para cumplir con funciones protectoras primarias. A diferencia de HLA-A y HLA-B, todos los alotipos HLA-C son reconocidos por receptores KIR, por lo que la expresión solamente de HLA-A y HLA-B sería claramente insuficiente para proteger, en cada individuo, a las células blanco de las células NK. Los genes KIR y su respectivos ligandos HLA clase I, son altamente polimórficos y debido a que sus genes mapean en cromosomas diferentes presentan segregación independiente.

Las características de los dominios intracitoplasmáticos de los receptores KIR determinan que puedan comportarse como moléculas inhibitoras o activadoras (Bashirova y col., 2006; Carrington & Norman, 2003; Long, 1999; Parham, 2005). Los receptores KIR con colas citoplasmáticas largas (KIR2DL1-3, KIR2DL5, KIR3DL1-3DL2) son inhibitorios en función de sus dominios ITIM presentes en sus regiones citoplasmáticas. Por otro lado, los receptores KIR con colas citoplasmáticas cortas (KIR2DS2-5 y KIR3DS1) transmiten señales activadoras a través de su interacción con la molécula adaptadora DAP-12. Como se mencionó previamente, el KIR2DL4 es una excepción, ya que cumpliría funciones tanto activadoras como inhibitoras.

Como se muestra en la **Figura 6** los receptores KIR reconocen diferentes alelos de las moléculas HLA-A, -B, -C y -G. La unión con las moléculas HLA clase I se caracteriza por una velocidad de asociación y disociación muy rápida, que encajaría con la capacidad de las células NK para “examinar” a gran velocidad y en poco tiempo la expresión de sus ligandos. Además, las señales inhibitoras generadas en una célula NK por el reconocimiento de una molécula HLA a través de un receptor KIR son breves y la misma célula NK puede pasar en seguida a destruir otro blanco celular que no exprese dicha molécula (Valés-Gomez y col., 1998). Por otro lado, las células NK recientemente activadas, que por ende sufrieron degranulación, no sufren alteración de la viabilidad y

mantienen la capacidad continua de lisis contra múltiples y diferentes células blanco, como así también, la capacidad de responder a citocinas proinflamatorias (Tomescu y col., 2009).

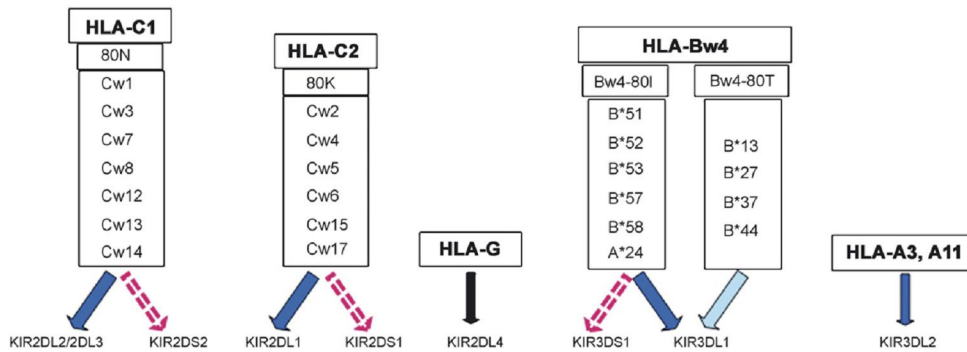


Figura 6. Especificidad de ligandos de los receptores KIR. Las interacciones receptor-ligando más débiles se representan por flechas rosadas punteadas y las más fuertes con flechas azules. La interacción entre KIR3DL1 con alotipos Bw4-80I (isoleucina en posición 80) parece ser más fuerte (flecha azul) que con Bw4-80T (treonina en posición 80) (flecha celeste). Los ligandos para KIR2DL5, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 y KIR3DL3 permanecen sin definirse (Kulkarnia y col., 2008).

Como se mencionó previamente, se han descrito siete KIR inhibitorios. Los receptores KIR2D inhibitorios reconocen subsets de alotipos HLA-C en función del aminoácido presente en las posiciones 77 y 80 en la hélice $\alpha 1$. Los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3 se unen específicamente a los alotipos HLA-C del grupo 1 (Ser77/Asn80) que incluyen a los alelos Cw1, 3, 5 y 6, mientras que el receptor KIR2DL1 se une a los alotipos HLA-C del grupo 2 (Asn77/Lys80), alelos Cw2, 4, 7 y 8 (Colonna y col., 1993; Colonna & Samaridis, 1995; Mandelboim y col., 1996). También se describió que la interacción entre el KIR2DL1 y su ligando, HLA-C2, es más fuerte que la observada para el par KIR2DL2/HLA-C1, mientras que la interacción KIR2DL3/HLA-C1 es más débil que las dos anteriores (Parham, 2005; Moesta y col., 2008). Por otro lado, los receptores KIR3DL1 se unen a un subset de alotipos HLA-B que comparten el motivo Bw4 en la posición 77-83 de la hélice $\alpha 1$, presentando diferencias en la afinidad dependiendo del aminoácido presente en la posición 80 de estos alotipos (D'Andrea y col., 1995; Gumperz y col., 1995). Por su parte, el receptor KIR3DL2 se une a algunos alotipos del HLA-A (HLA-A3, HLA-A11) pero los efectos en la inhibición en las células NK son menos pronunciados (Valiante, 1997; Döhning y col., 1996). Por último, el receptor KIR2DL4 se une a la molécula HLA-G (Rajagopalan y col., 1999; 2001),

aunque otros estudios sugieren que este KIR podría presentar otros ligandos alternativos (Kikuchi-Maki y col., 2003). El ligando del KIR2DL5 es, por el momento, desconocido (Vilches y col., 2000a).

Entre los seis receptores KIR activadores descritos, el KIR2DS1, el KIR2DS2 y el KIR2DS4 también unen alotipos de HLA-C, pero más débilmente que los receptores inhibidores KIR2DL1-3. (Biassoni y col., 1997; Valés-Gomez y col., 1998; Winter y col., 1998). Esto permitiría que ante la expresión simultánea en una misma célula de receptores activadores e inhibidores, predomine el efecto de estos últimos (Moretta y col., 1995). La especificidad de ligando de los otros receptores KIR activadores se desconoce (Uhrberg y col., 2002).

El efecto que tiene el péptido unido a la molécula HLA clase I en la interacción entre estas moléculas y su respectivo receptor, aún no está bien definido. Aunque algunos estudios han mostrado que las interacciones de las moléculas HLA con sus respectivos receptores KIR son independientes del péptido unido a la molécula HLA (Gumperz y col., 1995; Mandelboim y col., 1997), varios estudios indican que la unión en sí y la especificidad de esta unión, sí dependen de la presencia y de cuál sea el péptido unido, respectivamente (Kim y col., 1997; Peruzzi y col., 1996; Rajagopalan y col., 1997). Como consecuencia de esto último, se ha sugerido que los receptores activadores e inhibidores específicos para algunos HLA responderían de manera diferente dependiendo del péptido unido (Mandelboim y col., 1997).

Un número creciente de estudios epidemiológicos sugiere una influencia de distintos genotipos compuestos KIR/HLA en el resultado final de una variedad de enfermedades (Hiby y col., 2004; Martin y col., 2002; Nelson y col., 2004).

2.4. Organización de la estructura exón-intrón de los genes KIR

La organización de la estructura exón-intrón de los genes KIR en el cromosoma 19q13.4 sigue los siguientes arreglos básicos (*Figura 7*): la secuencia señal está codificada por los primeros dos exones, cada dominio Ig (D0, D1 y D2, empezando desde el extremo N-terminal) corresponden cada uno a un solo exón (exón 3-5 respectivamente), la región de unión está codificada por el exón 6, la región transmembrana por el exón 7, y el dominio citoplasmático está codificada por dos dominios finales (Wilson y col., 1997).

Los genes KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR2DS1-5 tienen una organización genómica idéntica a aquellos que codifican moléculas KIR con tres dominios Ig, a excepción de que el exón 3 es un pseudoexón que luego es eliminado durante el proceso de *splicing* (Vilches & Parham, 2002). Por lo tanto, la proteína producto de los genes KIR de dos dominios del Tipo 1 carece del dominio D0 (Vilches y col., 2000b). Los genes KIR de dos dominios Tipo 2, que incluyen al KIR2DL4, KIR2DL5A y KIR2DL5B, se caracterizan por la ausencia completa del exón 4, por lo tanto, la proteína traducida carece del dominio D1 (Selvakumar y col., 1997b). La estructura del gen KIR3DL3 es muy similar a la de los genes KIR3D, excepto que carece del exón 6 y que presenta un codón de paro antes del segundo dominio ITIM.

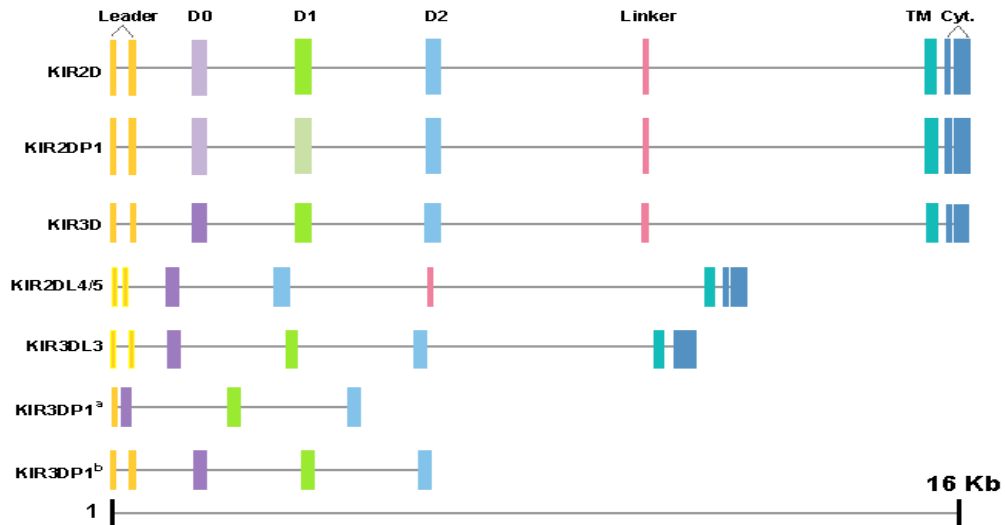


Figura 7. Estructura exón – intrón de los genes KIR. Los exones 1 y 2 codifican para el dominio de la secuencia líder (señal) (amarillo); los exones 3–5 codifican los dominios Ig D0, D1, y D2, respectivamente (violeta, verde, y azul); los exones 6 y 7 lo hacen para el dominio de unión y las regiones transmembrana, respectivamente (rosado y turquesa); y los exones 8 y 9 codifican para el dominio citoplasmático (azul oscuro). Tanto en los genes KIR de dos dominios Tipo 1 como en el pseudogen KIR2DP1, el exón 3 (que codifica D0) en las moléculas con tres dominios Ig, es un pseudoexón (lila). KIR2DP1, también contiene el pseudoexón 4 (verde claro). Los genes KIR de dos dominios del Tipo 2 presentan ausencia completa del exón 4. (Carrington & Norman; 2003)

En relación a los dos pseudogenes, KIR2DP1 y KIR3DP1, el primero está muy cercanamente relacionado al KIR2DL2/3 y KIR2DL1 (>97% de homología a nivel del

núcleo) y contiene dos pseudoexones, 3 y 4. El pseudogen KIR3DP1 está severamente truncado y formas alternantes del gen se diferencian por una delección de 1.5 Kb, que provoca la remoción del exón 2 (Gómez-Lozano y col., 2005; Wilson y col., 1997; 2000). Hasta el día de hoy no se han identificado transcritos del pseudogen KIR2DP1, a diferencia del pseudogen KIR3DP1, del cual estudios recientes demostraron que, en al menos una pequeña proporción de la población Caucásica, el KIR3DP1 es un gen funcional que se transcribe normalmente y codificaría para una proteína secretada (Gómez-Lozano y col., 2005).

2.5. Expresión de los genes KIR

De manera análoga a la expresión clonal de las inmunoglobulinas en los linfocitos B y de los receptores de las células T, las células NK expresan repertorios de los genes KIR distribuidos de manera clonal (Colonna & Samaradis, 1995). Mientras que los repertorios de las células B y T se generan por recombinación somática y luego se expresa un receptor clonal simple por células, los repertorios de las células NK se generan a través de la expresión de diferentes sets de genes KIR no rearrreglados en diferentes clones de células NK (Valiante y col., 1997). En general, todos los genes KIR que posee un individuo en su genoma se encuentran expresados en subsets superpuestos de células NK (Uhrberg y col., 1997; 2002; Valiante y col., 1997). Esta expresión incluye a los genes KIR para los cuales un individuo dado puede no presentar su ligando HLA clase I (Gumperz, 1996; Valiante y col., 1997; Young y col., 1998). Sin embargo, debemos enfatizar que los clones individuales de células NK expresan sólo algunos de los genes KIR, sin ningún tipo de restricción aparente en la cantidad expresada, aunque todas las células NK expresan al menos un KIR2D Tipo 1 (Watzl y col., 2000). La expresión de los genes KIR, como así también de sus respectivos alelos, en una célula NK dada parece ser altamente estocástica: todas las posibles combinaciones de dos o más genes KIR están expresadas en diferentes células NK (Gardiner y col., 2001; Vilches & Parham, 2002; Valiante y col., 1997; Wilson y col., 2000), y estas combinaciones estocásticas están predominantemente determinadas por el genotipo KIR, reguladas principalmente a nivel transcripcional y se mantienen de manera estable (Carrington & Norman, 2003; Gumperz y col., 1996; Uhrberg y col., 2002; Valiante, 1997).

Varios estudios revelan que el gen KIR2DL4 se expresa en todas las células NK de todos los individuos, mientras que todos los otros genes KIR se expresan de manera clonal (Rajagopalan S. y col., 1999; 2001; Valiante, 1997). Sin embargo, resultados obtenidos por Kikuchi-Maki y col. y Goodridge y col. indican que este receptor se expresa en una minoría de células NK CD56^{bright} y que parece alcanzar la superficie de las células CD56^{dim} sólo cuando éstas son activadas (Kikuchi-Maki y col., 2003; Goodridge y col., 2003). Por otro lado, los alelos del KIR2DL4 se expresan de manera codominante (Chan H.W. y col., 2003). La expresión del ARNm del gen KIR3DL3 está restringida a las células NK CD56^{bright}, aunque no se ha detectado la presencia de proteínas maduras (Trundle y col., 2006). Hasta hace unos pocos años se creía que cada célula NK expresaba al menos un receptor inhibitorio específico para un alotipo del HLA clase I propio (Valiante, 1997), aunque, como se mencionó previamente, algunos estudios revelaron la existencia de células NK carentes de todo tipo de receptores inhibidores.

Por otro lado, hay excepciones en cuanto a que todos los genes KIR presentes en el genotipo de un individuo dado se expresan, ya que varios alelos son siempre silenciosos. También es importante mencionar que mayoritariamente, los receptores KIR se expresan como proteínas de membrana. Sin embargo, algunos ADNc secuenciados presentan codones de paro temprano, sugiriendo la liberación de los receptores KIR como proteínas de secreción (Goodridge y col., 2007; Kikuchi-Maki y col., 2003). El impacto funcional de dichas proteínas secretadas aún no ha sido caracterizado.

En algunos genes KIR, el polimorfismo está directamente correlacionado con diferencias fenotípicas de las superficies de las células NK, donde la presencia de algunos alelos produce mayor expresión de proteínas mientras que la presencia de otros produce menor expresión. Asimismo se ha demostrado que células NK individuales de un mismo individuo presentan una expresión monoalélica, dialélica, o ausencia de expresión de los dos alelos de un mismo gen KIR, demostrando que no hay exclusión alélica (Chan H.W. y col., 2003; Gardiner y col., 2001; Gumperz y col., 1996; Uhrberg y col., 2002).

También hay que considerar, que la inhibición de las células NK por ligandos HLA clase I propios puede ser mediada no solo por receptores KIR inhibitorios, sino también por el receptor inhibitorio CD94/NKG2A. Este último, se expresa en todos los

individuos y puede compensar completamente la falta de un KIR inhibitorio apropiado (Uhrberg y col., 1997; Valiante y col., 1997). Algunos autores sostienen que estos receptores se expresan en aquellas células que no expresan un receptor KIR inhibitorio para un HLA clase I propio (Uhrberg y col., 2002; Vilches & Parham, 2002). Sin embargo, estudios anteriores aportan a favor de una co-expresión y que sólo hay algunas limitaciones en la expresión simultánea de ambos receptores (Valiante y col., 1997).

2.5.1. Regulación de la expresión

Aún no está bien establecido cuáles son los factores que controlan y regulan la expresión de los genes KIR en las células NK. La mayoría de los individuos presentan en sus genomas genes KIR para todos los ligandos HLA clase I (Du y col., 2007). Sin embargo, la expresión de los genes KIR en un individuo, no depende de la expresión de ligandos HLA clase I en ese mismo individuo. Aquellos que no expresan un determinado gen KIR es porque, simplemente, no portan el gen (Becker y col., 2003; Gumperz, 1996; Uhrberg y col., 2002). Esta situación contrasta con el repertorio de los receptores $\alpha\beta$ de las células T, el cual es resultado de una selección en el timo mediada por el MHC autólogo (Vilches & Parham, 2002). Otros estudios muestran que la expresión de ligandos HLA podría influir sobre el número de células NK que expresan los receptores KIR respectivos para dichos ligandos y sobre su nivel de expresión (Yawata y col., 2002; 2006). A pesar de que los genes HLA y KIR se encuentran en cromosomas diferentes, 6 y 19 respectivamente, y segregan independientemente, hay evidencia de que ambas familias génicas se encuentran potencialmente co-evolucionando. En un estudio reciente, Single y col. reportaron una correlación negativa muy fuerte entre la presencia de un KIR activador y su ligando en diferentes poblaciones, mientras que una correlación positiva fue observada entre genes que codifican KIR inhibitorios y sus respectivos ligandos (Single y col., 2007).

El mecanismo molecular que regula la expresión y la distribución celular de los genes KIR permanece sin conocerse. La metilación de la región promotora de estos genes se correlaciona con una expresión estable de los mismos una vez establecidos los patrones de expresión. Este mecanismo epigenético parece jugar un rol muy importante en el establecimiento y mantenimiento de patrones de expresión clonales de los genes KIR en las células NK humanas, pero no está todavía claro en cuál estadio del

desarrollo se establecen los patrones de metilación. Comparaciones de los patrones de metilación de las islas CpG que rodean el sitio de inicio de la transcripción de cada gen KIR reveló que el grado de metilación de los genes y alelos KIR se correlaciona consistentemente con la actividad transcripcional de cada uno de ellos en las células NK. En general, las islas CpG metiladas estaban asociadas a genes KIR silenciosos y las islas CpG no metiladas con genes KIR que se expresaban (Chan H.W. y col., 2003; Gao y col., 2009; Santourlidis y col., 2002; 2007).

Distintos polimorfismos en la región promotora también parecen explicar la expresión de los distintos genes KIR. La región promotora de la mayoría de los genes KIR comparten >91% de similitud de secuencia, y por lo tanto deben estar controlados por mecanismos similares. La región promotora del KIR3DL3 y KIR2DL4, por otro lado, son más divergentes (89% y 69% de similitud de secuencia, respectivamente) (Valiante y col., 1997; Vilches y col., 2000a; Wilson y col., 2000). Diferencias en los promotores distales y proximales de los diferentes genes, incluyendo sitios de unión de factores de transcripción, y la bi-direccionalidad del promotor distal, podrían explicar los patrones de expresión alternados y estocásticos (Stewart y col., 2003; Stuberg y col., 2007; Li y col., 2008). Así también, otros estudios mostraron que la actividad de los promotores KIR es tejido – específica (Chan H.W. y col., 2003).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Como primer objetivo de esta tesina, nos proponemos analizar el genotipo de los genes KIR en un panel de individuos normales. Para lo cual analizaremos las frecuencias génicas y genotípicas presentes en los individuos del panel.

2. Establecido el genotipo de los genes KIR y, debido a que su expresión en la membrana de las células NK es aleatoria, se investigará en el mismo panel de individuos normales el patrón de expresión de dichos genes en la membrana de estas células.

3. En el mismo panel se evaluarán las dos características que identifican a la actividad de las células NK: su capacidad citotóxica, utilizando la respuesta en células NK al estímulo con la línea K562 a través de la detección de la expresión de la molécula CD107a y la secreción de Interferón gamma (IFN-gamma). Posteriormente se intentará correlacionar la expresión de los genes KIR en la membrana de las células NK y la funcionalidad de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población en estudio

Para la realización del presente estudio retrospectivo se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de una población normal de 22 individuos adultos sanos no relacionados (55% mujeres, 45% hombres). Las muestras se obtuvieron del personal del laboratorio de forma voluntaria.

2. Líneas celulares

La línea celular K562 es una línea celular altamente indiferenciada obtenida a partir de una leucemia mieloide crónica humana. Dicha línea celular se cultivó siguiendo las recomendaciones de la ATCC (American Type Culture Collection) y fue utilizada como blanco en los ensayos de funcionalidad de las células NK.

3. Metodologías

3.1 Tipificación de polimorfismos genéticos

3.1.1 Extracción de ADN genómico

La sangre periférica de individuos sanos fue colectada en tubos estériles conteniendo EDTA. Para la extracción de ADN genómico se partió de 700 µl de sangre entera, los cuales fueron digeridos con proteinasa K (100 µg/ml) en 500 µl buffer pellet (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.4%) durante 3 hs a 56°C. Posteriormente, se realizó una extracción con 500 µl de fenol saturado en Tris y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. La fase acuosa (superior) obtenida se extrajo con 500 µl de cloroformo. Nuevamente se tomó la fase acuosa (superior) para precipitar el ADN con 1 ml de etanol puro y frío por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. Una vez secado el ADN genómico, éste fue resuspendido en 200-300 µl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

3.1.2 Tipificación de los genes KIR

El polimorfismo de los diferentes genes KIR fue analizado mediante la técnica de PCR-SSOP. Esta técnica consta de dos partes: La primera comprende la amplificación por PCR de el/los fragmentos que se desean analizar y la segunda, la siembra (*dot blot*) e hibridación de dichos fragmentos con sondas específicas de secuencia.

Como muestra la **Figura 8**, para la tipificación de los genes KIR se realizaron dos amplificaciones por PCR, una de ellas genera dos fragmentos correspondientes a los dominios 1 (240 pb) y 2 (302 pb), y la otra genera un fragmento correspondiente a la región transmembrana y citoplasmática del gen (930 pb), para dichas amplificaciones se utilizaron los *primers* que figuran en la **Tabla 3** (Middleton y col., 2005). Ambas PCRs fueron realizadas en un termociclador Perkin Elmer 9600 o 9700. Cada 50 µl de mezcla de reacción contuvo 200-600 ng de muestras de ADN genómico, Tris-HCl 67 mM pH 8.8, MgCl₂ 2 mM, Tween 1%, (NH₄)₂SO₄ 16 mM, 250µM de dNTPs; 0.05 µM de cada primer y Taq polimerasa 2 U (Inbio-Highway, Buenos Aires, Argentina). Luego de un ciclo inicial de *melting* de 5 min a 96°C, las muestras fueron sujetas a 39 ciclos de 60 seg a 96°C, 30 seg a 60°C y 90 seg a 72°C, con un paso final de extensión de 5 min a 72°C. El producto de amplificación fue monitoreada por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) (**Figura 9**).

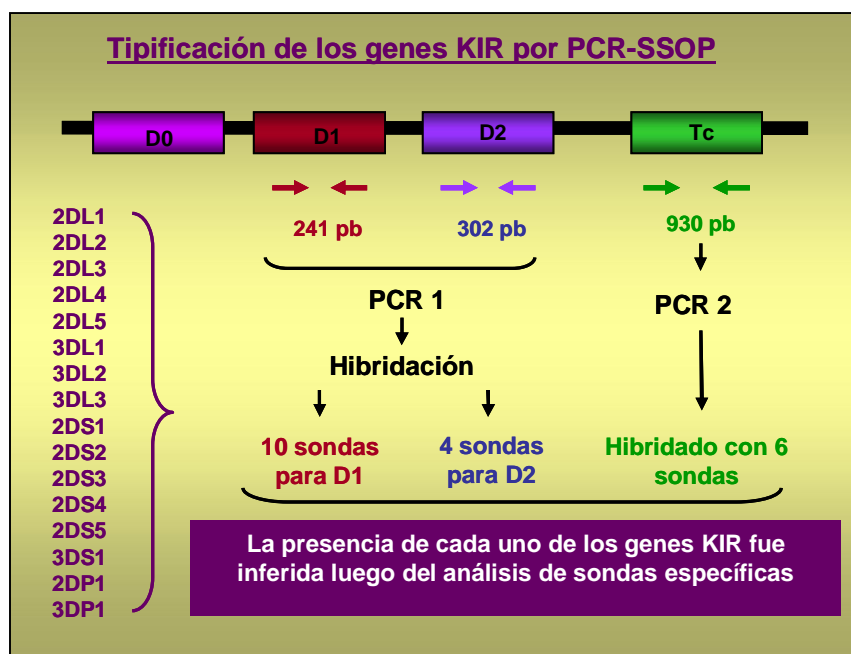


Figura 8. Diseño de la técnica de PCR-SSOP para la tipificación de los genes KIR.

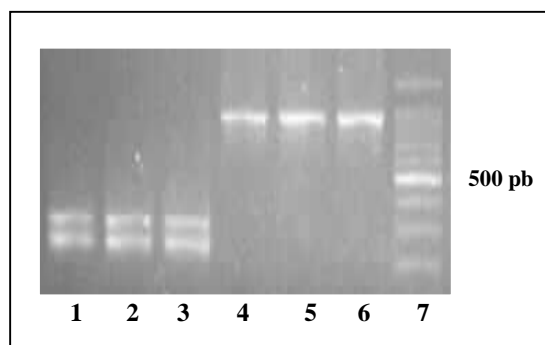


Figura 9. Producto de PCR de genes KIR. Calle 1-3 PCR para dominios 1 y 2, calles 4-6 PCR para dominio transmembrana – citoplasmático, calle 7, ladder 100 pb.

<i>Primer</i>		<i>Secuencia (5' → 3')</i>
D2F1 sentido		CTCCAGGTCYATATGAGAAACCTTC
D2R1 antisentido	D2	CTCACCTGTGACAGAAACRGGCAGTGG
D2F2 sentido		CTCCAGGTCTATKTGGGAAACCTTC
D2R2 antisentido		CTCACCTITGACRGAACAAGCAGTGG
D1F sentido		D1
D1R antisentido	GATCACIATGTCCAGRGGRTCACTGG	
TMF1 sentido		GCTGTGATTAGGTA CT CAGTGGCC
TMF2 sentido	Tc	GTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTC
TMF3 sentido		ATTCTGATTGGGACCTCAGTGGCT
DmcytR antisentido		TTGAGACAGGGCT(GA)TTGTCTCC

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como primers en las PCR 1 y 2 realizadas para tipificar los genes KIR.

Los productos de ambas PCR fueron hibridados con 20 sondas marcadas (**Tabla 4**) como muestra la **Figura 8** mediante la técnica de SSOP (ver más adelante) y la presencia de cada uno de los genes KIR fue deducida según las sondas que resultan positivas para cada dominio.

Genes KIR	Sonda específicas	Secuencia (5'→3')	Temperatura de lavado	Posición nucleotídica
2DL1	P20	CCTATCAGGTGTCAGCT	58°C	648-664
	P34	TCTGCAGGAAACAGAAC	49°C	1170-1186
2DL2	P30	CCATGAATGTAGGTTC	47°C	823-838
2DL3	P38	CTGGTGCTGCAACAAA	49°C	1126-1141
2DL4	P40	GCCTGCGGGACACAGAAC	60°C	1169-1186
2DL5	P35	CATTGCTGCTGCTAAC	47°C	1121-1136
3DL1	P41	CAGAACAGCCAACAGCGA	56°C	1181-1198
3DL2	P10	TACAGATGTTATGGTTCT	48°C	617-634
3DL3	P19	CACGATGCGGGTTCCCAG	60°C	554-571
2DS1	P22	CCATCAGTCGCATGAAGCAAG	66°C	582-602
	P31	TTGACCTTGGTCCCTGCAGG	61°C	858-839
2DS2	P11	GGGGAAGTATAAGGACA	47°C	514-530
2DS3	P14	CTATCAGTTTTTCAGCTCC	54°C	649-666
	P33	ATCTATCCACGGAGGG	50°C	801-816
2DS4	P12	TTCTCCATTGGTCCCAT	53°C	578-594
	P28	CTGCAGCT--22pb—CCATCTAT	47°C	769-806
2DS5	P17	ACGTTTAACCACACTTTG	50°C	518-535
3DS1	P36	GGAACAGAAGTGAACAG	51°C	1177-1195
2DP1	P15	CCATGCTGGAAGACCTG	54°C	591-607
3DP1	P18	GAAGTTTAATGACACTTTG	50°C	517-535

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como sondas en la técnica de SSOP para tipificar los genes KIR.

3.1.3 Identificación de alelos del KIR2DS4

La tipificación alélica del gen KIR2DS4 comprende una amplificación por PCR que genera dos fragmentos: uno deletado de 199 pb y otro no deletado de 221 pb (Maxwell y col., 2004). Cada 50 µl la mezcla de reacción contuvo 100-300 ng de ADN genómico en (NH₄)₂SO₄ 16 mM, Tris-HCl 67 mM pH 8.8, Tween 1%, dNTPs 250 µM, MgCl₂ 1.5 mM, 0.075 µM de cada primer (**Tabla 5**) junto con 1 U de Taq polimerasa (Inbio-Highway, Buenos Aires, Argentina). Luego de un ciclo inicial de *melting* de 5 min a 96°C, las muestras fueron sujetas a 25 ciclos de 1 min a 96°C, 30 seg a 62°C y 1

min a 72°C y 15 ciclos posteriores de 1 min a 96°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C, con un paso de extensión final de 5 min a 72°C.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Posición nucleotídica
2DS4Exón5F sentido	ACGGTTCAGGCAGGAGAGAA	Ex5 42-61
2DS4Exón5R antisentido	TTTGACCACTCGTAGGGAGC	Ex2 62-243

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos utilizados como primers para la amplificación del gen KIR2DS4. (Maxwell y col., 2004)

Los dos fragmentos obtenidos de la reacción de PCR del KIR2DS4 fueron hibridados por 10-30 seg con las 11 sondas específicas marcadas (**Tabla 6**), mediante la técnica de SSOP, que identifican a los alelos delecionados (*003, *0011 y *0012) y no delecionados (*00101, *00102, *002). La identificación de cada uno de los alelos del KIR2DS4 fue deducida según la combinación de sondas positivas ilustradas en la **Figura 10** (Maxwel y col. 2004).

Sonda	Secuencia (5'→3')	Temperatura de lavado	Posición nucleotídica
P1	ATCCAGGGAGGGGGAGG	59°C	110-126
P2	ATCCAGGGAAGGGGAGG	56°C	110-126
P3	GCAGCTCC--Δ22pb—ATCTATCCAGG	62°C	76-116
P4	GGAGCTCCTATGACATG	55°C	85-102
P5	CGCAGCATCCACGGAACA	61°C	153-170
P6	GCGCAGCATCAACGGAACA	63°C	152-170
P7	TCCGTGACGCTCCCTAC	62°C	235-251
P8	CTCC--Δ22pb—ATCTATCCAGGGAAGGGGA	68°C	80-124
P9	CTCC--Δ22pb-- ATCTATCCAGGGAGGGGGA	66°C	80-124
P10	ATGTGTCCCTTGTCCTG	53°C	61-76
P11	TGTGTCCTTGTCCTGCAGCTCC--Δ22pb--AT	74°C	62-107

Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados como sondas para la tipificación alélica de KIR2DS4.

Alelos de KIR2DS4	Sonda										
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
*00101 No *00102 delecionados											
*002											
*003 Delecionados											
*0011											
*0012											

Figura 10. Patrón de reactividad de sondas del KIR2DS4. Combinación de sondas que resultan positivas (casilleros coloreados) para cada uno de los alelos del gen KIR2DS4.

3.1.4. Tipificación de los genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C

La tipificación de los alelos de HLA-A, HLA-Cw y HLA-Bw fue realizada por el servicio de histocompatibilidad que funciona en nuestro laboratorio. La identificación se realizó como describe Cereb y colaboradores (1995) mediante la técnica de PCR-SSOP. Para distinguir los alelos de HLA-Cw del grupo C1 de los pertenecientes al grupo C2 se emplearon dos sondas marcadas con dioxigenina en su extremo 5' que reconocen los exones 2 y 3 de dicho gen. Para la tipificación de los grupos de alelos de HLAB, Bw4 y BW6, se utilizaron cuatro sondas marcadas que reconocen el exón 2 de este gen. Para el caso de HLA-A se emplearon 41 sondas marcadas que permiten distinguir 20 grupos de alelos de este locus (Cereb y col., 1995).

3.1.5. Técnica de sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia o *Sequence-specific oligonucleotide probing (SSOP)*

Sondas marcadas con dioxigenina en su extremo 5' fueron utilizadas para identificar positivamente los diferentes genes KIR (*Tabla 4*). Un total de 2 µl del producto de PCR fue sembrado en membranas de nylon Hybond N+ (Amersham International, Slough, UK). La doble cadena de ADN fue separada por incubación de las membranas en NaOH 0.4 N por 5 min y luego neutralizadas con solución SSPE 2X (NaCl 0.3 M, PO₄H₂Na 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7 por 5 min. Posteriormente el ADN fue inmovilizado por *cross-linking* en un UV Stratalinker (Stratagen Ltd, Cambridge,

UK) a 1200 mJ/cm^2 y las membranas incubadas en 5 ml de solución de prehibridación [SSC 5X (NaCl 0.75 M, citrato de sodio 2.2%), caseína 1%, N-lauryl sarcosina 0.1% y SDS 0.02%] por 30 min a 45°C . Luego, para la hibridación se agregaron 800 pmoles de cada una de las sondas específicas a sus respectivos tubos y se los incubó durante toda la noche a 48°C en hornos rotatorios. Las membranas fueron lavadas primero en solución A (SSPE 20X, SDS 20%) por 10 min a temperatura ambiente, luego en solución B (SSC 20X, SDS 20%) por 20 min a temperatura específica para cada sonda (*Tabla 4*) y, por último, en SSPE 2X por 10 min a temperatura ambiente. Después de 5 min de lavado en buffer 1 (Tris 1M, NaCl 5M, pH 7.5), las membranas fueron bloqueadas para reducir la unión no específica en buffer 1 conteniendo leche descremada al 1% (buffer 2) e incubadas con anticuerpo anti-dioxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1/10000. Roche Diagnosis, 62 Indianapolis, USA) en buffer 2 (por 30 min a temperatura ambiente). Las membranas fueron lavadas 1 vez en buffer 1 por 15 min, una vez en buffer 3 (Tris 1 M, MgCl_2 1 M, NaCl 5M, pH 9.5) por 5 min, incubadas con 25 mM del sustrato quimiolumincente CSPD (Roche Diagnosis, Indianapolis, USA) en buffer 3 por 20 seg a temperatura ambiente, e incubadas por 15 min a 37°C . Por último, las membranas fueron expuestas a placas radiográficas por 30 min y luego reveladas por incubación en revelador radiográfico (G-150 AGFA) por 10-30 seg, posterior incubación en fijador radiográfico (G-334AGFA) por 5 min y lavado con agua corriente.

3.2. Citometría de flujo de los receptores de las células NK

3.2.1 Obtención de PBMCs a partir de sangre periférica

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas de un panel de individuos sanos a partir de sangre entera colectada con Heparina mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque. Para la realización del gradiente, 10 ml de sangre fueron diluidos al medio con solución fisiológica estéril y sembrados suavemente sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque estéril. Luego de una centrifugación a 2000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, las células mononucleares forman una interfase opaca. Dicha interfase fue recolectada con pipeta pasteur, colocada en un tubo nuevo y lavada dos veces con 15 ml de solución fisiológica estéril, en cada lavado las células fueron

centrifugadas durante 5 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. La recuperación fue de aproximadamente $1-1.5 \times 10^6$ células/ml de sangre entera.

3.2.2 Marcación con anticuerpos monoclonales

Se colocaron 1×10^6 células en diferentes tubos y se las incubó con diferentes anticuerpos. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón no comerciales que reconocen los receptores KIR3DL1/3DL2 (10 μ l; clon 5.133), KIR2DL2/2DS2/2DL3 (10 μ l; clon CHL), KIR2DL1/2DS1 (10 μ l; clon HPMA4), KIR2DL1/2DS1/2DS3 (10 μ l; clon HP3E4), CD94 (10 μ l; clon 3D9) y NKG2A (10 μ l; clon Z199) obtenidos por gentileza del Dr. Bottet; y anticuerpos comerciales de ratón para detectar KIR3DL1 (5 μ l; clon DX9; BD Biosciences), KIR2DL4 (5 μ l; R & D Systems), KIR2DS4 (5 μ l; R & D Systems), KIR2DL3 (10 μ l; R & D Systems) y KIR2DL1 (10 μ l R & D Systems). El anticuerpo anti-3DL1 y el anti-2DL1 se encuentran conjugados con FITC (Fluorescein isothiocyanate) y el anti-2DL3 con PE (Phycoerythrin), el resto no tiene unido ningún fluorocromo. Adicionalmente se utilizaron 5 μ l de los correspondientes controles de isotipo de ratón no marcados IgG1 (para 3DL1/3DL2 y CD94, DakoCytomation), IgG2b (para 2DL2/2DS2/2DL3, 2DL1/2DS1 y NKG2A; Caltag), IgG2a (para 2DL4 y 2DS4; Caltag), e IgM (para 2DL1/2DS1/2DS3; DakoCytomation); así como IgG1-FITC (para 3DL1 y 2DL1; BD Biosciences) e IgG2a-PE (para 2DL3; BD Biosciences). La incubación de las células con todos los anticuerpos mencionados anteriormente se realizó a temperatura ambiente durante 30 min y luego las células fueron lavadas una vez con 1 ml de PBS A/A (PBS 1X, azida sódica 0.02%, albúmina sérica bovina 0.1%) y centrifugadas 5 min a 1800 rpm. En el caso de los anticuerpos no marcados se requirió una incubación posterior con 3 μ l de un anticuerpo anti-Inmunoglobulinas de ratón conjugado con FITC (DakoCytomation) durante 30 min a temperatura ambiente, luego de la cual se repitió el lavado con PBS 1X A/A. A estos últimos tubos se les adicionaron 5 μ l de suero normal de ratón (Sigma Aldrich) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Con el fin de analizar la inmunomarcación correspondiente a las células NK se realizó una incubación posterior con 3 μ l de anti-CD56 conjugado con PE (BD Biosciences) y 5 μ l de anti-CD3 conjugado con PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex, BD Biosciences), excepto en los tubos correspondientes al anti-2DL3 e IgG2a-PE en los cuales se utilizó anti-CD56 conjugado con PECy5 (Phycoerythrin-

Carbocyanin 5, BD Biosciences) y anti-CD3 conjugado con FITC (BD Biosciences), por 15 min a temperatura ambiente. Luego de ser lavadas nuevamente con PBS 1X A/A, las células fueron analizadas mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (BD).

3.2.3 Doble marcación KIR/NKG2A

Se colocaron 1×10^6 células en dos tubos y se las incubó con diferentes anticuerpos. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón no comercial que reconoce el receptor NKG2A (10 μ l; clon Z199) obtenido por gentileza del Dr. Bottet y 5 μ l del correspondiente control de isotipo de ratón IgG2b (Caltag). Ambos anticuerpos no se encuentran marcados. La incubación de las células con los anticuerpos mencionados se realizó a temperatura ambiente durante 30 min y luego las células fueron lavadas una vez con 1 ml de PBS A/A (PBS 1X, azida sódica 0.02%, albúmina sérica bovina 0.1%) y centrifugadas 5 min a 1800 rpm. Se realizó una incubación posterior con 3 μ l de un anticuerpo anti-Inmunoglobulinas de ratón conjugado con FITC (DakoCytomation) durante 30 min a temperatura ambiente, luego de la cual se repitió el lavado con PBS 1X A/A. Se adicionaron 5 μ l de suero normal de ratón (Sigma Aldrich) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 10 μ l del anticuerpo comercial monoclonal de ratón anti-2DL3 conjugado con PE al tubo marcado previamente con anticuerpo anti-NKG2A, y 5 μ l de su respectivo control isotípico IgG2a-PE (BD Biosciences) al tubo que había sido marcado con IgG2b. De igual manera que en el punto anterior, a fin de analizar la inmunomarcación correspondiente a las células NK, también se adicionaron 3 μ l de anti-CD56 conjugado con PE-Cy5 (BD Biosciences) y 5 μ l de anti-CD3 conjugado con APC-Cy7 (Allophycocyanin-Carbocyanin 7; BD Biosciences). Se incubó 15 min a temperatura ambiente, y luego de ser lavadas nuevamente con PBS 1X A/A, las células fueron analizadas mediante un citómetro de flujo FACS Aria (BD).

3.3. Determinación de la funcionalidad en las células NK

3.3.1. Obtención de PBMCs a partir de sangre periférica

Se obtuvieron los PBMC por gradiente de Ficoll-Hypaque a partir de sangre entera como se explica en el ítem anterior. Las células obtenidas se dejaron en medio RPMI

1640 (Sigma Aldrich) suplementado con Suero Fetal Bovino 10% (Natocor), gentamicina, L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich) a 4°C hasta el día siguiente para ser procesadas.

3.3.2. Determinación de la función citotóxica de las células NK

Se agregaron 1×10^6 células a cada uno de los pocillos de una placa de cultivo según el esquema experimental que se muestra en la **Tabla 7**.

	Paciente 1	Paciente 2
Condición A	control isotópico estímulo basal	control isotópico estímulo basal
Condición B	estimulación basal	estimulación basal
Condición C	control isotópico estímulo K562	control isotópico estímulo K562
Condición D	estimulación con línea celular K562	estimulación con línea celular K562
Condición E	estimulación con PMA/ionomicina	estimulación con PMA/ionomicina

Tabla 7. Esquema experimental planteado para en estudio de la funcionalidad de las células NK.

En la condición A se agregaron 5 µl de control isotópico IgG1 conjugado con FITC (BD Biosciences); en la condición B 20 µl de anti-CD107a conjugado con FITC (BD Biosciences); en la condición C 1×10^5 células de la línea celular K562 y 5 µl de control isotópico IgG1 conjugado con FITC (BD Biosciences); en la condición D 1×10^5 células de la línea celular K562 y 20 µl de anti-CD107a conjugado con FITC (BD Biosciences); y por último, en la condición E se agregaron PMA (Phorbol 12-Myristato 13-acetato; Sigma) en una concentración final de 2.5 µg/ml, ionomicina (sal cálcica de *Streptomyces globatus*; Sigma) en una concentración final de 0.5 µg/ml y 20 µl de anti-CD107a conjugado con FITC (BD Biosciences). Todas las condiciones se llevaron a 1000 µl finales con RPMI completo. La placa de cultivo se incubó en estufa durante 1 h a 37°C y 5% CO₂, se agregó a todas las condiciones experimentales 1 µl de Inhibidor

de transporte proteico (conteniendo monensina) (BD Biosciences) y se puso a incubar durante 5 hs más. El contenido de cada posillo de la placa de cultivo se pasó a tubos facs, se lavaron las células con 1 ml de PBS 1X A/A y se las centrifugó 5 min a 2000 rpm. Se realizó, en todas las condiciones, una marcación de superficie celular con los siguientes anticuerpos monoclonales: 6 μ l de anti-CD3 conjugado con PerCP (BD Biosciences) y 5 μ l de anti-CD56 conjugado con PE (BD Biosciences), se incubó durante 20 min a 4°C y se lavó dos veces con PBS 1X A/A. Finalmente, las células fueron analizadas mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (BD).

3.3.3. Determinación de la función secretora de las células NK

El esquema experimental realizado fue el mismo que en el punto anterior. Se agregaron 1×10^6 PBMCs a cada uno de los pocillos de la placa de cultivo. Las condiciones A y B fueron llevadas directamente a 1000 μ l finales con RPMI completo; en las condiciones C y D se agregaron 1×10^5 células de la línea celular K562 y fueron llevadas a 1000 μ l finales con RPMI completo; y en la condición E se agregaron PMA (Phorbol 12-Myristato 13-acetato; Sigma) en una concentración final de 2.5 μ g/ml, ionomicina (sal cálcica de *Streptomyces globatus*; Sigma) en una concentración final de 0.5 μ g/ml y se llevó a 1000 μ l finales con RPMI completo. De igual manera que en el punto anterior, la placa de cultivo se incubó en estufa durante 1 h a 37°C y 5% CO₂, se agregó a todas las condiciones experimentales 1 μ l de Inhibidor de transporte proteico conteniendo monensina (BD Biosciences) y se puso a incubar durante 5 hs más. El contenido de cada posillo de la placa de cultivo se pasó a tubos facs, se lavaron las células con 1 ml de PBS 1X A/A y se las centrifugó 5 min a 2000 rpm. La marcación de superficie celular se llevó a cabo con los siguientes anticuerpos monoclonales: 6 μ l de anti-CD3 conjugado con FITC (BD Biosciences) y 6 μ l de anti-CD56 conjugado con PE-Cy5 (BD Biosciences) y se incubó durante 20 min a 4°C. Se realizaron dos lavados con 1 ml de PBS 1X A/A centrifugando 5 min a 2000 rpm. Se trataron las células con 100 μ l de solución de fijación y permeabilización 1X (BD Biosciences) durante 20 min a 4°C, se lavó dos veces con 1 ml de Buffer Perm/wash 1X (BD Biosciences) centrifugando 5 min a 2000 rpm. Para la marcación intracitoplasmática se adicionaron 4.8 μ l de control isotópico IgG1 conjugado con PE (BD Biosciences) a las condiciones A y C y 20 μ l de anti-IFN gamma conjugado con PE (BD Biosciences) a las

condiciones B, D y E, se incubó 30 min a 4°C y se repitieron los lavados con Buffer Perm/Wash 1X. Finalmente, las células fueron analizadas mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (BD).

3.4. Análisis citométrico

El análisis de los resultados obtenidos de las inmunomarcaciones con anticuerpos monoclonales en los puntos 2 y 3 fue realizado con el programa informático WinMDI2.8, el cual nos arrojó los valores de porcentaje de células positivas e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para cada marcador en las poblaciones requeridas (población linfoide total; población CD56+CD3⁻ de alta intensidad o CD56^{bright}; y CD56+CD3⁻ de baja intensidad o CD56^{dim}).

3.5. Análisis estadísticos

La frecuencia de los genes KIR y HLA clase I se obtuvo dividiendo el número de individuos positivos para cada gen por el número total de individuos analizados (n). El análisis de frecuencias de genes KIR se realizó mediante tablas de contingencias 2 x 2 con el test de Fisher.

Las diferencias de medias de los experimentos de citometría de flujo fueron analizadas mediante test T de Student, cuando la comparación era entre dos grupos y los valores obtenidos presentaron una distribución normal, o por el test U de Mann-Witney cuando esto último no sucedía. Cuando la comparación era entre más de dos grupos los datos se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y el test de Bonferroni para comparación de las distintas medias entre si cuando los valores presentaban distribución normal, y el test de Kruskal - Wallis cuando esto no era así. La normalidad de los datos obtenidos fue evaluada mediante el test de Shapiro Wilks modificado.

El valor tomado para las comparaciones en las que se incluyó la intensidad media de fluorescencia (IMF) corresponde a la tasa entre la IMF obtenida para cada anticuerpo anti-KIR y la IMF obtenida para el control de isotipo correspondiente. El valor tomado para las comparaciones en las que se incluyó el porcentaje de células que se marcan con cada anticuerpo corresponde a la diferencia entre el porcentaje de células que se marcan con cada uno de los anticuerpos anti KIR y el control de isotipo correspondiente.

Los análisis estadísticos fueron realizados con los programas informáticos GraphPad InStat y GraphPad Prism 3.0. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, $p < 0.01$ muy significativos y $p < 0.001$ extremadamente significativos.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Frecuencias génicas en la población Caucásica

Como se comentó en la introducción, los receptores codificados por los genes KIR, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, son un grupo de receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NK que presentan como ligando a las proteínas codificadas por el HLA. Por esto, nos planteamos como primer objetivo de este trabajo el estudio del genotipo KIR.

Los resultados obtenidos de la frecuencia de los genes KIR en la población Caucásica en este estudio, realizado en un panel de nuevos individuos a los que se les estudio la función y la expresión de los genes KIR, se sumaron a los resultados obtenidos en el trabajo realizado previamente por Flores y col. en este mismo laboratorio (Flores y col., 2007). La frecuencia de los distintos genes KIR en la población Caucásica se muestra en la **Tabla 8**, a excepción de los genes KIR2DL4, KIR3DL2 y KIR3DL3 y el pseudogen KIR3DP1 que no se encuentran representados por estar presentes en todos los individuos estudiados. El gen KIR2DS3 fue el menos frecuente en la población Caucásica (29%), a diferencia de los genes KIR2DL1, KIR2DS4, KIR3DL1 y el pseudogen KIR2DP1 que fueron los más frecuentes (95-96%).

Genes KIR	Frecuencia	
	Caucásicos	
	n= 22 + n= 414 = n=436	
	Presencia	Ausencia
2DL3	87	13
2DP1	96	4
2DL1	96	4
2DS4	95	5
2DS2	56	44
2DL2	57	43
2DL5	56	44
2DS5	36	64
2DS1	45	55
2DS3	29	71
3DL1	95	5
3DS1	42	58

Tabla 8. Frecuencia de los genes KIR en la población Caucásica expresada como porcentaje de la población analizada. Los genes KIR2DL4, KIR3DL2 y KIR3DL3 y el pseudogen KIR3DP1 no se exponen en la tabla ya que presentan una frecuencia de 1.

2. Fenotipo de los receptores KIR en las células NK

Luego del análisis del genotipo KIR en nuestra población de estudio, el próximo paso fue estudiar la expresión de estos genes en la superficie de las células NK. Como se explicó en la introducción, las células NK no expresan todos los genes KIR presentes en su genoma, sino que esta expresión es de tipo clonal y aleatoria, por lo que diferentes clones expresan diferentes combinaciones de receptores KIR en su membrana.

En un panel de 22 individuos sanos se analizó la expresión de los receptores KIR en la población NK CD56+/CD3-. Se utilizaron anticuerpos monoclonales no comerciales que reconocen epítopes de las moléculas KIR3DL1/3DL2, KIR2DL2/2DL3/2DS2 y KIR2DL1/2DS1, y anticuerpos comerciales que reconocen KIR3DL1, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR2DL3 y KIR2DL1. También se analizó la expresión del heterodímero CD94/NKG2A, que como fue mencionado anteriormente, pertenece a una familia distinta a los receptores KIR. En los distintos gráficos se ilustra la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) y el porcentaje de células que expresan

cada uno de los receptores KIR, dentro de la población CD56+CD3-. El valor expresado en porcentajes corresponde a la diferencia entre el porcentaje de células que se marcan con cada uno de los anticuerpos y el control de isotipo, y el valor de IMF a la tasa entre la IMF obtenida para cada anticuerpo y la IMF obtenida para el control de isotipo.

2.1. Expresión aleatoria de los genes KIR

Como ya se mencionó, de acuerdo a la intensidad de expresión de la molécula CD56 expresada en la membrana de las células NK éstas se dividen en CD56^{dim} y CD56^{bright}. En concordancia con estudios previos, con excepción del KIR2DL4, la expresión de los genes KIR predomina fundamentalmente en las células CD56^{dim}. La **Figura 11 A** muestra con claridad la expresión clonal y aleatoria de los genes KIR en estas células, observándose que los distintos genes KIR son expresados por distintos porcentajes de células NK. Junto con diferencias en la frecuencia de expresión, se observan diferencias en las IMF de los distintos genes KIR (**Figura 11 B y C**). Los valores representan la media calculada entre todos los individuos del estudio (n=22).

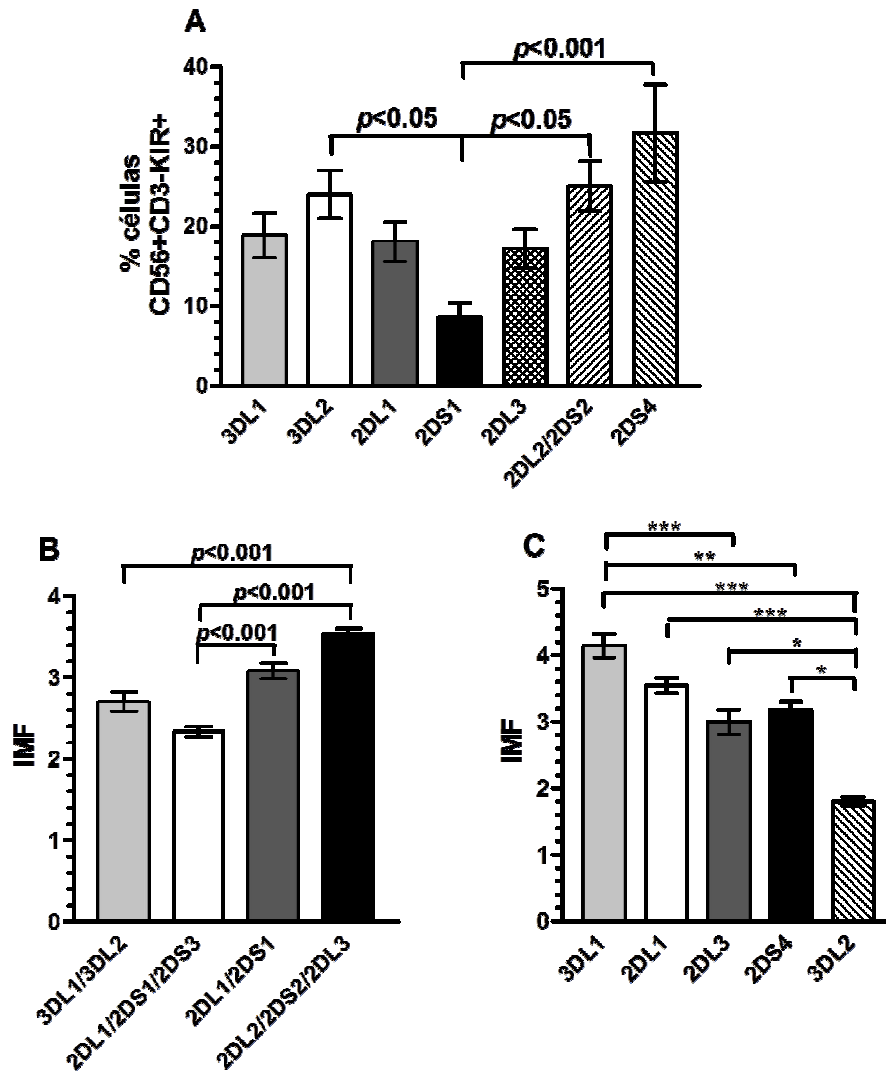


Figura 11. Expresión aleatoria de los genes KIR en las células NK. Porcentaje e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de cada uno de los anticuerpos anti KIR dentro de la población de células CD56 en el panel de estudio completo. En A el valor gráfico corresponde al porcentaje de células NK. En B y C el valor gráfico corresponde a la IMF de cada anticuerpo. Mientras que en B están incluidos todos los individuos analizados marcados con los anticuerpos que reconocen varios receptores a la vez, en C están representados sólo aquellos individuos portadores del gen que cada anticuerpo específico reconoce, además del KIR3DL2 calculado a partir de individuos KIR3DL1–3DL2+. Se observa variación tanto en los porcentajes de células que expresan cada gen KIR como en la IMF de los distintos receptores.
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Test de Bonferroni.

El producto del gen KIR3DL1 es el que se expresó con mayor IMF, mientras que el receptor KIR3DL2 fue el de menor IMF. Por otro lado, el receptor KIR2DS4 mostró la mayor frecuencia de expresión. El receptor KIR2DL4, no incluido en el gráfico

porque estuvo presente en solo un individuo del panel, fue el que mostró el menor porcentaje de expresión en las células NK. Sin embargo, en el análisis de la expresión en las células CD56^{bright}, el gen KIR2DL4 fue observado con gran frecuencia (**Figura 12**).

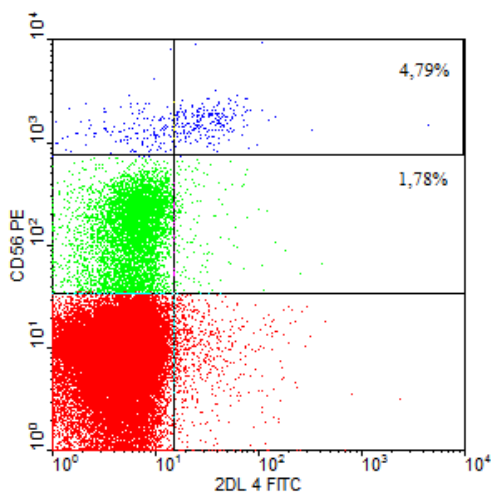


Figura 12. Expresión diferencial del receptor KIR2DL4. Dot plot representativo de la expresión del receptor KIR2DL4 utilizando anticuerpos anti-KIR2DL4. La región representada en azul corresponde a las células NK CD56^{bright}, y la región en verde a las células NK CD56^{dim}. La expresión del KIR2DL4 se observa prácticamente restringida a las células CD56^{bright}, con muy poca o nula expresión en las células CD56^{dim}. La región en rojo representa a la población CD56 negativa.

2.2. Expresión del heterodímero CD94/NKG2A

Las moléculas CD94 y NKG2A forman un heterodímero en la superficie celular constituyendo un receptor inhibidor de citotoxicidad. La expresión de la molécula CD94 se observó en prácticamente todas las células NK, tanto CD56^{dim} como CD56^{bright} (**Figura 13 A**). Sin embargo, NKG2A que se encuentra expresado en casi todas las células CD56^{bright}, solo se expresa en alrededor del 50% de las células CD56^{dim} (**Figura 13 B**).

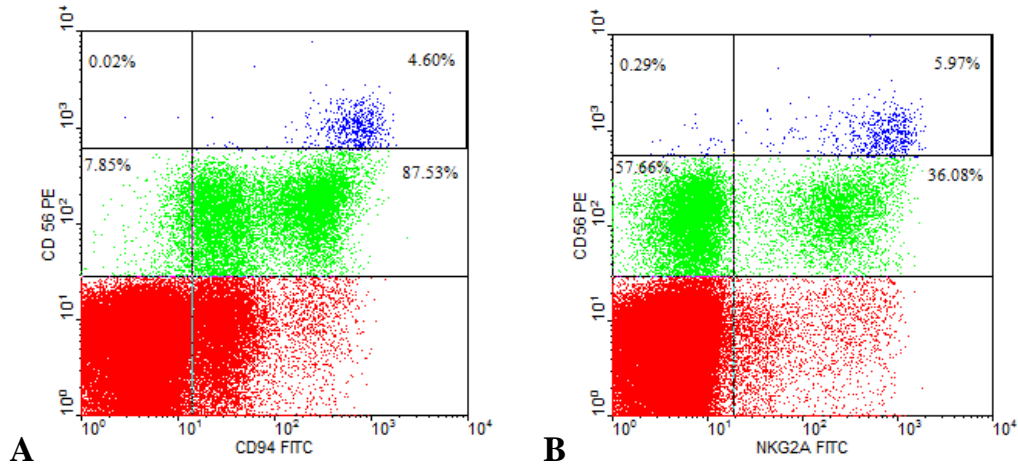


Figura 13. Expresión de las moléculas CD94 y NKG2A. Dot plot representativo utilizando anticuerpos anti-CD94 (A) y anti-NKG2A (B). Porcentaje de células CD56^{dim} y CD56^{bright} que expresan cada receptor. La región representada en azul corresponde a las células CD56^{bright}, la verde a las CD56^{dim} y la roja a la población negativa para la molécula respectiva. Ambos receptores muestran una expresión de casi el 100% en las células CD56^{bright}. CD94 se expresa también en prácticamente todas las células CD56^{dim}, mientras que NKG2A se expresa en menos del 50% de dichas células.

Como se planteó en la introducción, un punto que necesita ser elucidado es si la molécula NKG2A se co-expresa con receptores KIR en las células CD56^{dim}, o si la expresión es mutuamente excluyente. Para contestar esta pregunta, marcamos las células NK con anticuerpos anti-NKG2A y anti-KIR2DL3. La Figura 14 A, muestra un caso representativo de individuos portadores del gen KIR2DL3. En este individuo, más de un 10% expresan ambas moléculas, expresión que no se observó en los individuos no portadores del gen KIR2DL3 (**Figura 14 B**).

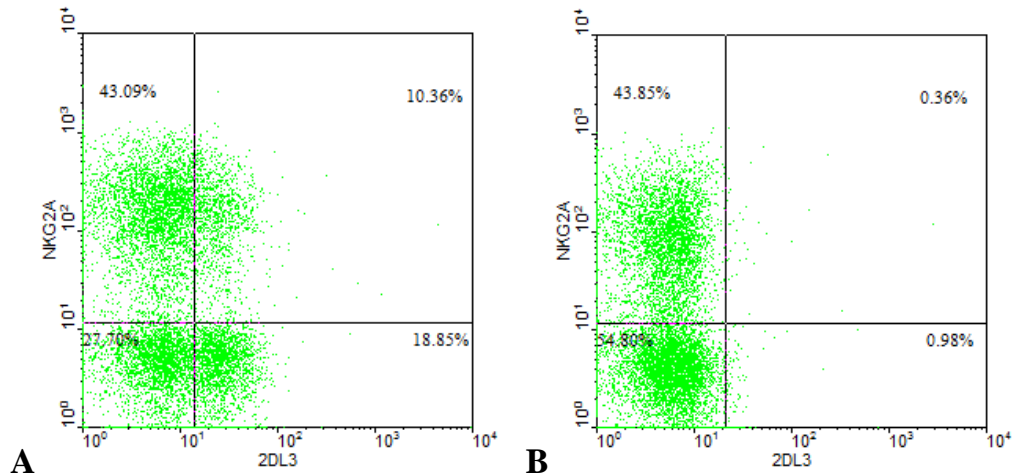


Figura 14. Co-expresión de los receptores NKG2A y KIR2DL3. Dot plot representativo de los individuos que presentan el gen KIR2DL3 en su genotipo (A) e individuos que no lo presentan (B). En A se observa co-expresión de los dos receptores mientras que en B no.

2.3. Influencia del ligando en la expresión de los receptores KIR

Como los receptores KIR tienen como ligando a moléculas HLA clase I, una de las preguntas consistió en analizar cómo la presencia de su ligando influye sobre el porcentaje de células que expresa el receptor KIR y sobre la IMF de dicho receptor. Analizamos la interacción entre el receptor KIR2DL1 y la molécula HLA-C2. En la **Figura 15 A** se observa que los individuos homocigotas para HLA-C2 muestran un mayor porcentaje de células NK que expresan el receptor KIR2DL1 en comparación con los individuos homocigotas para HLA-C1 (carecen del ligando para KIR2DL1) y los individuos heterocigotas (HLA-C1/C2). Sin embargo, el bajo número de individuos de cada uno de los grupos impide hacer un análisis estadístico que confirme esta observación. No se observan diferencias en la IMF del receptor KIR2DL1 entre los grupos (**Figura 15 B**). Los valores representan la media calculada entre todos los individuos de cada grupo (HLA-C1/C1=3, HLA-C1/C2=11, HLA-C2/C2=2).

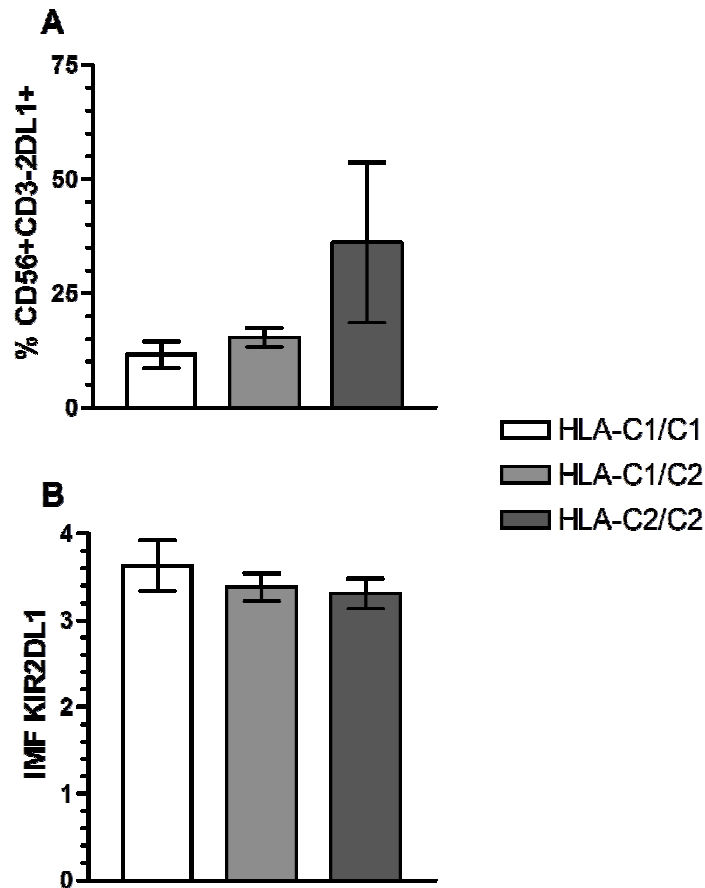


Figura 15: Influencia del ligando HLA-C2 en la expresión del receptor KIR2DL1. Se observa el porcentaje (A) de células NK que expresan el receptor KIR2DL1 y la IMF (B) de este receptor en individuos homocigotas para HLA-C2 (HLA-C2/C2), heterocigotas (HLA-C1/C2) y homocigotas para HLA-C1 (HLA-C1/C1). Estos últimos carecen de ligando para el KIR2DL1. *p* no significativo.

Otra de las interacciones receptor/ligando es la existente entre los receptores KIR2DL2/L3 con HLA-C1, los cuales a su vez presentan diferencias en la afinidad de unión con su ligando (**Figura 16**). No se encontraron diferencias en el porcentaje de células NK (A) ni en la IMF (B) del KIR2DL2/L3 entre individuos homocigotas para HLA-C1, heterocigotas, y homocigotas para HLA-C2 (carecen de ligando para el KIR2DL2/L3). Por último, la otra interacción receptor/ligando analizada fue la que se produce entre el KIR3DL1 y la molécula HLA-Bw4 (**Figura 17**), en la cual tampoco se encontraron diferencias entre los individuos portadores del ligando (HLA-Bw4) y los que no lo portan (HLA-Bw6) en cuanto a porcentaje de células NK (A) o IMF (B).

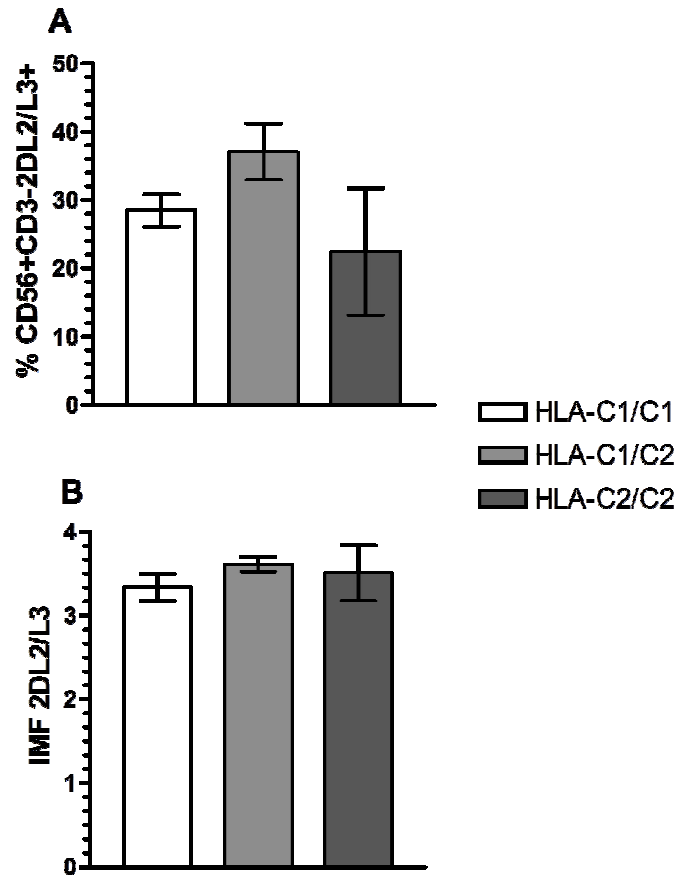


Figura 16. Influencia del ligando HLA-C1 en la expresión del receptor KIR2DL2/L3. Se observa el porcentaje (A) de células NK que expresan el receptor KIR2DL2/3 y la IMF (B) de este receptor en individuos homocigotas para HLA-C1 (HLA-C1/C1), heterocigotas (HLA-C1/C2) y homocigotas para HLA-C2 (HLA-C2/C2). Estos últimos carecen de ligando para el KIR2DL2/3. No se observaron diferencias en los porcentajes ni en la IMF. Los valores representan la media calculada entre todos los individuos de cada grupo (HLA-C1/C1=3, HLA-C1/C2=11, HLA-C2/C2=2). *p* no significativo.

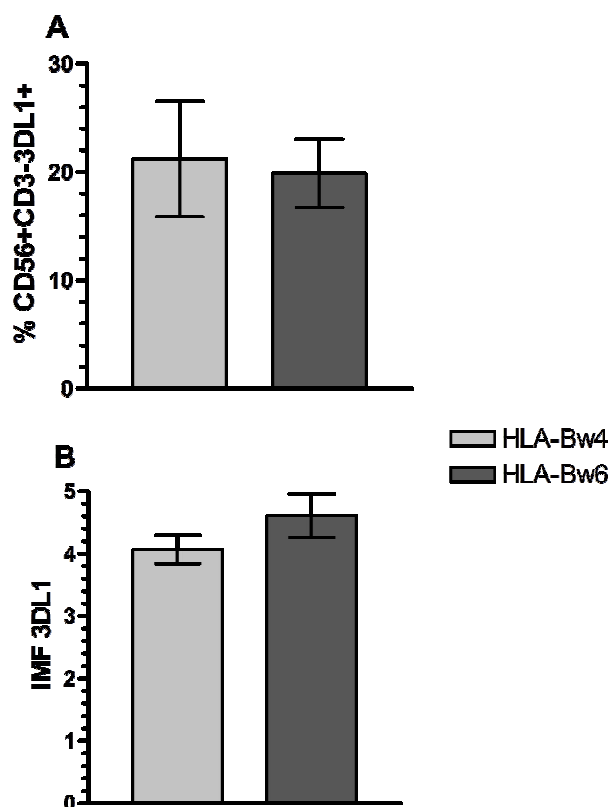


Figura 17. Influencia del ligando HLA-Bw en la expresión del receptor KIR3DL1. Se observa el porcentaje (A) de células NK que expresan el receptor KIR3DL1 y la IMF (B) de este receptor en individuos que portan el ligando HLA-Bw4 e individuos que portan el ligando HLA-Bw6. Estos últimos carecen de ligando para el receptor KIR3DL1. No se observaron diferencias en los porcentajes de células NK ni en la IMF. Los valores representan la media calculada entre todos los individuos de cada grupo (HLA-Bw4=7, HLA-Bw6=4). *p* no significativo.

3. Funcionalidad de las células NK

Otro de los objetivos de este trabajo fue estudiar la funcionalidad de las células NK. Para este propósito, se co-cultivaron PBMCs del panel normal en estudio con la línea celular K562. La carencia de moléculas HLA en la superficie de la línea K562 resulta en una falla en la inhibición de las células NK por la no unión de sus ligandos inhibidores, derivando en una mayor actividad de estas células. La funcionalidad de las células NK se estudió a través de dos parámetros: la secreción de interferón gamma (IFN gamma), una de las citocinas más importantes secretadas por las células NK, y su actividad citotóxica sobre las células blanco (K562). Para evaluar la capacidad secretora

de las células NK se usaron anticuerpos anti-IFN gamma, y para evaluar la capacidad citotóxica se estudió la expresión de la molécula CD107a en la superficie celular mediante anticuerpos anti-CD107a. La expresión de esta molécula en la superficie de las células NK se incrementa luego de la estimulación con células blanco (K562) que carecen de moléculas HLA, correlacionándose directamente con la degranulación de las células NK. A su vez, la expresión de CD107a se correlaciona también con la secreción de citocinas. Por esto, la molécula CD107a actúa como marcador que permite evaluar la actividad funcional de las células NK (Alter G. y col., 2004). En la **Figura 18** se observa el porcentaje de células NK que mostraron tener actividad citotóxica (A) y secretora (B) ante el estímulo con la línea celular K562 en la población en estudio (CD107a n=22, IFN gamma n=19). El porcentaje de células NK que mostró actividad citotóxica fue mucho mayor que el porcentaje de células con actividad secretora. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros entre hombres y mujeres (**Figura 19**).

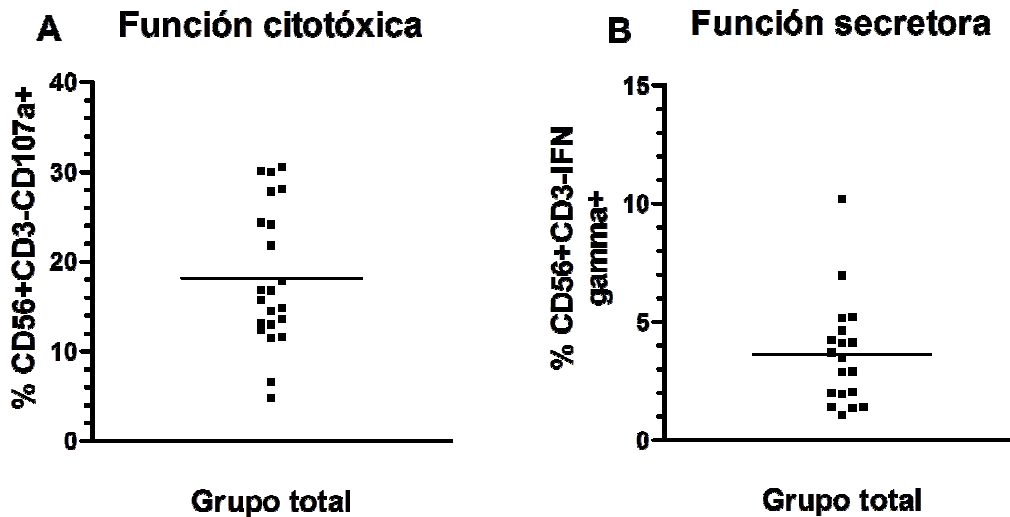


Figura 18. Capacidad citotóxica y secretora de las células NK estimuladas con la línea celular K562. Porcentaje de células NK que expresan las moléculas CD107a (A) e IFN gamma (B). Media CD107a= 18.21. Media IFN gamma: 3.63. El porcentaje de células NK CD107a+ fue mucho mayor que el porcentaje de células NK IFN gamma+.

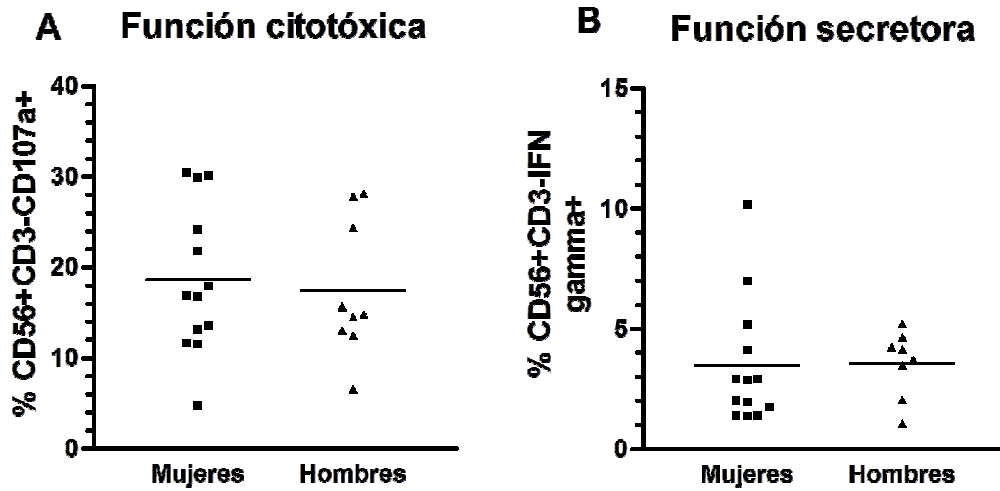


Figura 19. Funcionalidad de las células NK en mujeres y hombres. Porcentaje de células NK que expresan las moléculas CD107a (A) e IFN gamma (B) en mujeres (■) y hombres (▲). No se encontraron diferencias significativas entre las medias en ninguno de las dos situaciones estudiadas. Mujeres=13, Hombres=9. *p* no significativo.

El co-cultivo con la línea celular K562 no mostró estimulación de actividad citotóxica ni secretora en los linfocitos T como así tampoco en las células NK CD56^{bright}, a pesar de considerarse estas últimas como principales secretoras de IFN gamma. Estos resultados demuestran la especificidad de la técnica utilizada ya que sólo las células NKdim, portadoras de receptores KIR, resultaron estimuladas con células blanco carentes de moléculas HLA.

3.1. Estimulación con PMA/ionomicina

Como control positivo las PBMCs fueron estimuladas con PMA/ionomicina. El porcentaje de células NK que expresaron CD107a en su superficie fue más del doble del porcentaje obtenido cuando las células NK fueron estimuladas con la línea celular K562 (**Figura 20 A**). En el caso de la secreción de IFN gamma, el porcentaje de células NK secretoras de IFN gamma inducida con PMA/ionomicina resultó ser 11 veces más alta que la inducida por K562 (**Figura 20 B**).

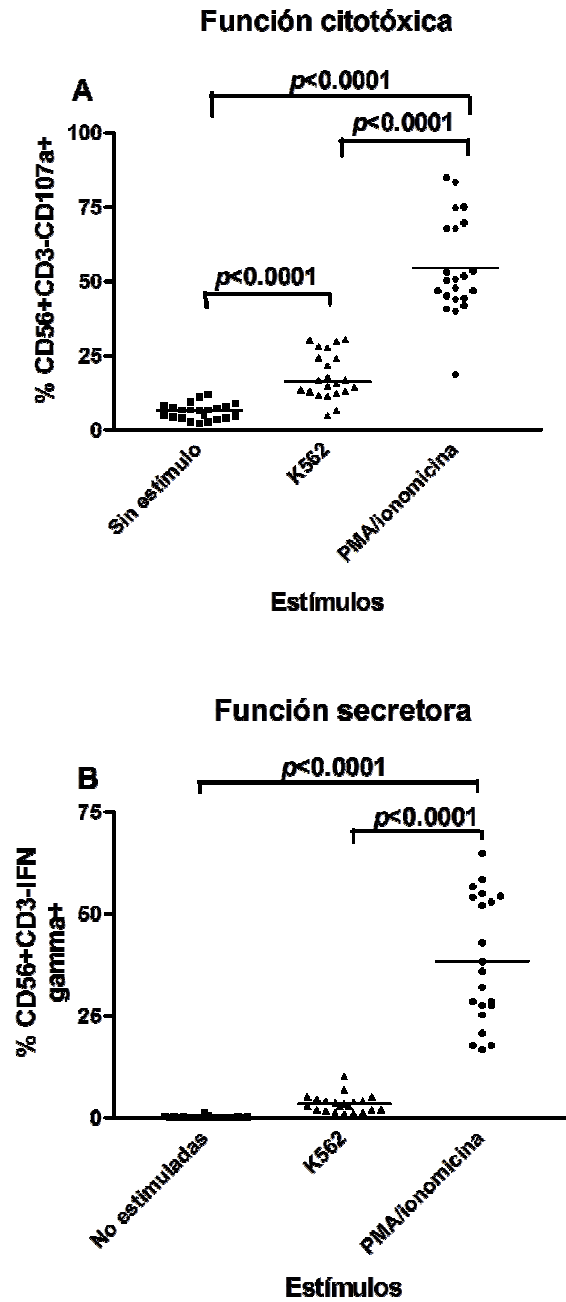


Figura 20. Estimulación con PMA/ionomicina versus estimulación con K562. Porcentaje de células NK que mostraron actividad citotóxica (A) y secretora (B) en condición de no estimulación (■), estimulación con K562 (▲) y estimulación con PMA/ionomicina (●). Los dos tipos de estimulaciones produjeron aumento en el porcentaje de células NK CD107a+ e IFN gamma+. El estímulo con PMA/ionomicina produce la activación de más del doble de células NK en cuanto a citotoxicidad, y las activa aproximadamente once veces más en cuanto a su función secretora. $p < 0.0001$, Test de Bonferroni.

Tanto en el porcentaje de células NK que expresan CD107a como en el porcentaje de células que secretan IFN gamma mostró una respuesta bimodal. En el primer caso se observan dos grupos con medias de 45.08% y 74.78%, y en el segundo caso dos grupos con medias de 22.75% y 56.64%.

3.2. Influencia de los receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en la funcionalidad

Como fue explicado en la introducción, el receptor KIR2DL1 presenta mayor afinidad por su ligando HLA-C2, en comparación con el receptor KIR2DL2 y su ligando HLA-C1. Por su parte, el receptor KIR2DL3 presenta menor afinidad por su ligando, HLA-C1, que los dos anteriores. En los individuos altos respondedores al estímulo con K562, medido a través de la expresión de CD107a (>20%), además de la presencia del receptor KIR2DL1, se observó que la mayoría eran homocigotas para el receptor KIR2DL3 (75%). Mientras que los bajos respondedores (<20%), además de también presentar al receptor KIR2DL1, eran en su mayoría homocigotas para el receptor KIR2DL2 u heterocigotas (75%) (*Tabla 9*). Los individuos KIR2DL1+ y homocigotas para el receptor KIR2DL3, al presentar este último la menor afinidad por su ligando, producirían en conjunto menor grado de inhibición (mayor activación) que los individuos que son KIR2DL1+ pero que portan el receptor KIR2DL2, tanto en homocigosis como en heterocigosis, generando en conjunto un mayor grado de inhibición (menor activación). El valor de p obtenido mediante el análisis en tablas de contingencias 2x2 con el test de Fisher si bien muestra una clara tendencia, no mostró significancia ($p=0.06$), debido al pequeño número de muestras hasta ahora analizados.

	2DL1/2DL2	2DL1/2DL3	Total
Respuesta >20%	2 (10%)	6 (30%)	8 (40%)
Respuesta <20%	9 (45%)	3 (15%)	12 (60%)
Total	11 (55%)	9 (45%)	20 (100%)

Tabla 9. Influencia de los receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en la citotoxicidad de las células NK. $p > 0.05$. Test de Fisher

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Las células NK forman parte de la respuesta inmune innata. Estas células participan en la defensa temprana contra patógenos intracelulares, virus y tumores, a través de mecanismos citotóxicos y de la secreción de citocinas y quemocinas. Las funciones desarrolladas por las células NK se encuentran reguladas por un fino balance entre señales opuestas generadas a la vez por receptores inhibidores y/o activadores. Los receptores KIR se unen a moléculas HLA expresadas constitutivamente por células normales, permitiendo a las células NK reconocer células aberrantes que han disminuido la expresión de dichas moléculas, hipótesis del “missing self”. El objetivo general del presente trabajo fue estudiar en un panel de 20 individuos sanos el genotipo KIR, la expresión de dichos genes en la superficie de las células NK y cómo el genotipo y el fenotipo de estos genes KIR puede influir en la funcionalidad de las células NK.

Hasta el momento se han identificado 14 genes KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3 y 3DS1) y 2 pseudogenes (2DP1 y 3DP1), los cuales se agrupan formando haplotipos (Uhrberg, 1997). Estos haplotipos pueden pertenecer al grupo A o B. En la población Caucásica, la frecuencia de cada grupo es de aproximadamente 0.5, pero el único haplotipo perteneciente al grupo A es el más frecuente si lo comparamos con cada uno de los distintos haplotipos pertenecientes al grupo B (Flores y col., 2007; Parham, 2005; Shilling y col., 2002). En este estudio se observa que el KIR2DS3 es el menos frecuente en la población Caucásica (0.29), mientras que los genes KIR2DL1, KIR3DL1, KIR2DS4 y el pseudogen KIR2DP1, presentan las frecuencias más altas (0.95-0.96).

Todos los genes KIR presentes en el genotipo de un individuo se encuentran expresados por las células NK. Sin embargo, esta expresión es de tipo clonal, lo que implica que diferentes clones de células NK presentan en su superficie celular distintas combinaciones de receptores KIR. Por otro lado, la expresión de estos genes parece ser altamente estocástica (Vilches & Parham, 2002). Nuestros resultados muestran variación de la expresión de los genes KIR en cuanto a dos parámetros: el porcentaje de células NK que expresa cada receptor y la IMF con la que se expresa cada uno de ellos en la superficie celular. El presente estudio demostró que las diferentes células NK no solamente no expresan todos los receptores KIR, sino que la frecuencia con la que se

expresan estos receptores en las células NK muestra diferencias cuando se analizan los diferentes genes KIR. Por ejemplo, el receptor KIR2DS4 se encontró expresado en un porcentaje mayor de células NK en comparación con el resto de los receptores KIR. En contrapartida, el receptor KIR2DL4 fue el receptor expresado por el menor número de células NK. Por otro lado, también se observó diferencias en las IMF de los distintos receptores, lo que implica que algunos genes KIR expresan un mayor número de receptores en la superficie celular. En este sentido, KIR3DL1 fue el receptor que presentó mayor IMF.

La expresión del KIR2DL4 en las células CD56^{dim} fue detectada solamente en un individuo, observándose en cambio una alta expresión en las células CD56^{bright}. Estos resultados concuerdan con una expresión diferencial del KIR2DL4 reportada por Kikuchi-Maki y col., 2003 y Goodridge y col., 2003.

Las células CD56^{dim} se caracterizan por concentrar la mayor expresión de los genes KIR mientras que las CD56^{bright} por la del heterodímero CD94/NKG2A (Romagnani y col., 2007). El análisis del receptor CD94/NKG2A en nuestra población, confirmó que ambas moléculas se expresan en casi la totalidad de las células CD56^{bright} mientras que, por el contrario, mostraron una expresión diferente en lo que respecta a las células CD56^{dim}. La molécula CD94 se expresa también en prácticamente todas las células CD56^{dim}, sin embargo NKG2A se encuentra expresado en aproximadamente el 50% de éstas. Esto concuerda con el hecho de que la presencia de CD94 en la superficie celular no depende exclusivamente de la presencia de NKG2A, ya que CD94 se encuentra también formando dímeros con otras moléculas, como NKG2C, lo que explica que su expresión sea mucho mayor.

La expresión conjunta de receptores KIR con el receptor CD94/NKG2A es un tema controvertido (Uhrberg y col., 2002; Valiante y col., 1997; Vilches & Parham, 2002). La marcación del receptor KIR2DL3 junto con la molécula NKG2A en los individuos estudiados en el presente trabajo, mostró que aquellos individuos portadores del gen KIR2DL3, presentaron un pequeño pero claro porcentaje de células NK^{dim} que expresaba tanto el receptor KIR2DL3 como la molécula NKG2A. Estos resultados apoyan la idea de la co-expresión de ambos tipos de receptores.

Las moléculas HLA clase I expresadas en la superficie de casi todas las células normales de nuestro organismo, constituyen los ligandos específicos de los receptores KIR. Se ha descrito que la expresión de los genes KIR no está determinada por las

moléculas HLA (Becker y col., 2003; Gumperz, 1996; Uhrberg y col., 2002), sin embargo, se ha planteado que estos ligandos sí podrían influir sobre el porcentaje de células NK que expresan determinado receptor KIR y sobre la cantidad de unidades de cada receptor que se expresa en la superficie celular (Yawata y col., 2002; 2006). En este estudio observamos que la homocigocidad de la molécula HLA-C2 aumentaría el número de células NK que expresan el KIR2DL1, (receptor de HLA-C2). Sin embargo será necesario aumentar el número de individuos en estudio para poder confirmar estadísticamente esta observación. No se observó influencia en la IMF del receptor KIR2DL1 por parte de HLA-C2, como así tampoco de otras moléculas HLA clase I sobre la expresión e IMF de sus respectivos receptores.

La estimulación de PBMCs con las células de la línea K562 nos permitió estudiar la capacidad de las células NK de actuar contra células blanco carentes de expresión de moléculas HLA en su superficie. Se estudió tanto la función citotóxica de las células NK como la función secretora de citocinas (IFN gamma). La técnica utilizada mostró una alta especificidad ya que sólo resultaron activadas las células CD56^{dim}. Como se mencionó previamente, la línea celular K562 carece de moléculas HLA clase I, ligandos específicos de los receptores KIR, lo que provocaría la activación de sólo aquellas células que porten estos receptores. Como se describe en la introducción, las células NK^{bright} carecen de receptores KIR, excepto por el KIR2DL4, y los linfocitos T sólo expresan receptores KIR luego de haber sido activados por moléculas HLA que presentan péptidos a estas células, por lo que las únicas células que expresan receptores KIR son las NK CD56^{dim}, que son las que efectivamente resultaron activadas.

El porcentaje de células CD56^{dim} que mostró actividad citotóxica fue mucho mayor que el porcentaje de células que mostró secreción de IFN gamma, lo cual se correlaciona con la función principal de las células CD56^{dim}, que es su actividad citotóxica. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros al comparar hombres y mujeres, lo que indica una capacidad de respuesta similar de las células NK en ambos sexos.

Las PBMCs también fueron estimuladas con PMA/ionomicina como control positivo. El porcentaje de células NK que resultaron activadas con este estímulo fue de más del doble en cuanto a citotoxicidad y de casi 11 veces superior en cuanto a secreción de IFN gamma, en comparación con el porcentaje de células NK activadas por estímulo con las células K562. Estos resultados confirman la potente capacidad de las

sustancias PMA e ionomicina de activar a las células NK. La observación de la presencia de una respuesta bimodal en ambas condiciones, citotoxicidad y secreción, no pudo ser asociada con ningún genotipo KIR/HLA.

Uno de los puntos más interesantes observados en este trabajo fue la asociación existente entre los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/L3 con la respuesta citotóxica de las células NK bajo el estímulo con las células K562. Se sabe que estos receptores presentan diferencias en cuanto a la afinidad por sus ligandos. La unión KIR2DL1/HLA-C2 presenta mayor afinidad en comparación con la unión KIR2DL2/HLA-C1, mientras que, el KIR2DL3 presenta menor afinidad por HLA-C1 que los dos anteriores (Parham, 2005; Moesta y col., 2008). Se observó que los individuos KIR2DL1+ KIR2DL3/L3 eran altos respondedores, mientras que los individuos KIR2DL1+ KIR2DL2/L2 y KIR2DL1+ KIR2DL2/L3, eran bajos respondedores. A pesar de que el receptor KIR2DL1 presenta la afinidad más alta por su ligando, en comparación con los receptores KIR2DL2/L3, lo que debería generar una alta inhibición, cuando este receptor se encuentra expresado de manera conjunto con el receptor KIR2DL3 (homocigosis para el gen KIR2DL3), la sinergia de la combinación se expresa como una menor inhibición. Esto se debe a la baja afinidad existente entre el receptor KIR2DL3 y su ligando HLA-C1, lo que genera una muy baja inhibición y, por lo tanto, el balance entre ambas señales produce una alta respuesta citotóxica por parte de las células NK. Por el contrario, cuando el receptor KIR2DL1 se expresa junto con el receptor KIR2DL2 (gen KIR2DL2 homocigota) o con los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3 (gen en heterocigosis) el balance de las señales generadas por estos receptores genera una mayor inhibición. Esto se debe a que se encuentran co-expresados los dos receptores con mayor afinidad por su ligando produciendo una inhibición más alta de las células NK, por lo que su actividad citotóxica es baja. Si bien la tendencia fue clara, el número relativamente bajo de individuos estudiados no alcanzó para lograr un valor de *p* más significativo. Esta asociación observada en el panel de individuos sanos analizados es muy interesante de seguir estudiando debido a que ha sido reportado por varios estudios que el receptor KIR2DL3 y su ligando, HLA-C1, influyen directamente la resolución de la infección causada por el virus de la hepatitis C (HCV) (Ahlenstiel & Rehermann, 2005; Khakoo y col., 2004).

1. Conclusiones

- En la población Caucásica se observa una gran variación en las frecuencias de los distintos genes KIR, desde una baja frecuencia para el KIR2DS3 hasta frecuencias muy altas para los genes KIR2DL1, KIR3DL1, KIR2DS4 y el pseudogen KIR2DP1.
- Dadas las características particulares con las que se expresan los genes KIR y en función de los estudios que se planean realizar en patologías, resultó un aspecto central de este trabajo el análisis de cómo se expresan los genes KIR en un amplio panel de individuos normales y como esta expresión puede influir sobre la función de las células NK. El estudio mostró una variación en la expresión de los genes KIR en la superficie de las células NK tanto en el porcentaje de células que expresan cada receptor KIR, lo que significa que no todas las células NK expresan todos los KIR, como en el grado de expresión de cada uno de estos receptores. Las moléculas HLA parecerían influir sobre esta variación en la expresión de los receptores KIR. También se observó co-expresión de estos receptores con el heterodímero CD94/NKG2A. Este último también presentó una expresión variable.
- La técnica utilizada para estudiar la funcionalidad de las células NK por medio de la estimulación con la línea celular K562 mostró una alta especificidad resultando activadas sólo las células CD56^{dim}, únicas portadoras de receptores KIR. Las células CD56^{dim} mostraron una mayor actividad citotóxica que secretora, correlacionándose con su función principal. Otro parámetro que fue necesario conocer era si diferencias de género alteran los parámetros en estudio. Este análisis descartó diferencias entre hombres y mujeres e indica una capacidad de respuesta similar de las células NK en ambos sexos.

- La estimulación de las células NK con PMA/ionomicina produjo un aumento significativo en la activación de las células NK tanto en su función citotóxica como secretora. La presencia de una respuesta bimodal ante este estímulo no pudo ser asociada con ningún genotipo KIR/HLA.
- La diferencia en la expresión de los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/L3 parecería influir en la respuesta citotóxica de las células NK estimuladas con K562, lo cual puede deberse a diferencias en la afinidad de estos receptores por sus ligandos.

2. Perspectivas

Las células NK juegan un papel crucial en el control de varias infecciones virales humanas. Se ha demostrado, a su vez, en varios estudios que la expresión de genes KIR y sus ligandos HLA tiene un impacto en la resolución de varias enfermedades virales humanas. Por lo tanto, el estudio de manera conjunta y relacionada del genotipo KIR, la expresión de los genes KIR en las células NK y la funcionalidad de las células NK es de real importancia tanto en un patrón normal, en primera instancia, como en las patologías, en segunda instancia. Por esto, nuestras expectativas futuras comprenden, en primer lugar, el estudio de un mayor número de individuos sanos para poder completar el presente estudio, y en segundo lugar, el análisis de las mismas características estudiadas aquí en individuos afectados por infecciones producidas por el Virus de la Hepatitis C (HCV) y por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Ahlenstiel G., Rehermann B. Hepatitis C Virus and the threshold of natural killer cell inhibition. *Hepatology* 2005. **41(3)**: 675-677.
- ✓ Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* 2004. **294**: 15-22.
- ✓ Anfossi N., Andre P., Guia S., Falk C.S., Roetynck S., Stewart C.A., Bresó V., Frassati C., Reviron D., Middleton D., Romagné F., Ugolini S., Vivier E. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006. **25**: 331-342.
- ✓ Barten R., Torkar M., Haude A., Trowsdale J., Wilson M.J. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol.* 2001. **22**: 52-57.
- ✓ Bashirova A.A., Martin M.P., McVicar D.W., Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006. **7**: 277-300.
- ✓ Becker S., Tonn T., Füssel T., Uhrberg M., Bogdanow M., Seifried E., Seidl C. Assessment of killer cell immunoglobulinlike receptor expression and corresponding HLA class I phenotypes demonstrates heterogenous KIR expression independent of anticipated HLA class I ligands. *Hum. Immunol.* 2003. **64(2)**: 183-193.
- ✓ Biassoni R., Cantoni C., Pende D., Sivori S., Parolini S., Massimo V., Mottino C., Morreta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.* 2001. **181**: 203-214.
- ✓ Biassoni R., Pessino A., Malaspina A., Cantón C., Bottino C., Sivori S., Moretta L., Moretta A. Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur. J. Immunol.* 1997. **27**: 3095-3099.
- ✓ Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather P.T. Natural Killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 1999. **17**: 189-220.
- ✓ Bolland S., Ravetch J.V. Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. *Adv. Immunol.* 1999. **72**: 149-177.
- ✓ Bottino C., Biassoni R., Millo R., Moretta L., Moretta A. The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I- independent NK cell triggering. *Hum. Immunol.* 2000. **61**: 1-6.

- ✓ Brennan J., Mager D., Jefferies W., Takei F. Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties. *J. Exp. Med.* 1994. **180**: 2287–2295.
- ✓ Bryceson Y.T., Long E.O. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Current Opinion in Immunology* 2008. **20**: 344-352.
- ✓ Bryceson Y.T., March M.E., Ljunggren H.G., Long E.O. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006. **107**: 159-166.
- ✓ Brodsky F.M., Lem L., Solache A., Bennett E.M. Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol. Rev.* 1999. **168**: 199-215.
- ✓ Burshtyn D.N., Scharenberg A.M., Wagtmann N., Rajagopalan S., Berrada K., Yi T., Kinet J.P., Long E.O. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 1996. **4**: 77-85.
- ✓ Campbell K.S., Dessing M., Lopez-Botet M., Cella M., Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 93–100.
- ✓ Carrington M., Norman P.J. The KIR Gene Cluster. *National Library of Medicine (U.S.)* 2003.
- ✓ Cereb N., Maye P., Lee S., Kong Y., Yang S.Y. Locus-specific amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus-specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B, and -C alleles. *Tissue Antigens* 1995. **45**: 1-11.
- ✓ Chan H.W., Kurago Z.B., Stewart C.A., Wilson M.J., Martin M.P., Mace B.E., Carrington M., Trowsdale J., Lutz C.T. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human Natural Killer cells. *J. Exp. Med.* 2003. **197**: 245-254.
- ✓ Chan S.H., Perussia B., Gupta J.W., Kobayashi M., Pospisil M., Young H.A., Wolf S.F., Young D., Clark S.C., Trinchieri G. Induction of interferon γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 1991. **173**: 869–879.
- ✓ Colonna M., Brooks E.G., Falco M., Ferrara G.B., Strominger J.L. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 1993. **260(5111)**: 1121-1124.

- ✓ Colonna M., Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995. **268**: 405-408.
- ✓ D'Andrea A., Chang C., Franz-Bacon K., McClanahan T., Phillips J.H., Lanier L.L. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J. Immunol.* 1995. **155**: 2306-2310.
- ✓ Diefenbach A., Raulet D.H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol. Rev.* 2001. **181**: 170-184.
- ✓ Djeu J.Y., Jiang K., Wei S. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clinical Cancer Research* 2002. **8**: 636-640.
- ✓ Döhning C., Scheidegger D., Samaridis H.G., Pando M., Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J. Immunol.* 1996. **156**: 3098-3101.
- ✓ Du Z., Gjertson D.W., Reed E.F., Rajalingam R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in human. *Immunog.* 2007. **59**: 1-15.
- ✓ Faure M., Long E.O. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J. Immunol.* 2002. **168**: 6208-6214.
- ✓ Fehniger T.A., Cooper M.A., Nuovo G.J., Cella M., Facchetti F., Colonna M., Caligiuri M.A. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003. **102**: 3052–3057.
- ✓ Ferlazzo G., Thomas D., Lin S.L., Goodman K., Morandi B., Muller W.A., Moretta A., Münz C. The abundant NK cells in human lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* 2004a. **172**: 1455–1462.
- ✓ Ferlazzo G., Pack M., Thomas D., Paludan C., Schmid D., Strowig T., Bougras G., Muller W.A., Moretta L., Münz C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004b. **101(47)**: 16606–16611.
- ✓ Flores A.C., Marcos C.Y., Paladino N., Capucchio M., Theiler G., Arruvito L., Pardo R., Habegger A., Williams F., Middleton D., Fainboim L. KIR genes polymorphism in argentinean caucasoids and Amerindians. *Tissue Antigens* 2007. **69(6)**: 568-576.

- ✓ Gao X.N., Lin J., Wang L.L., Yu L. Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. *Mol. Immunol.* 2009. **46(10)**: 2064-2070.
- ✓ Gardiner C.M., Guethlein L.A., Shilling H.G., Pando M., Carr W.H., Rajalingam R., Vilches C., Parham P. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J. Immunol.* 2001. **166**: 2992-3001.
- ✓ Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Pérez-Villar J.J., López-Botet M., Duggan-Keen M., Stern P.L. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 1997. **18(2)**: 89-95.
- ✓ Gassner C. y col. Sequencing of a complete long KIR haplotype from chromosome 19: a derivation of tools for the precise identification of KIR haplotypes from genomic DNA. *Genomics, in press.*
- ✓ Gasser S., Raulet D.H. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 2006. **214**: 130-142.
- ✓ Gerosa F., Baldani-Guerra B., Nisii C., Marchesini V., Carra G., Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2002. **195**: 327-333.
- ✓ Gómez-Lozano N., Estefanía E., Williams F., Halfpenny I., Middleton D., Solís R., Vilches C. The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 y KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 16-24.
- ✓ Gómez-Lozano N., Gardiner C.M., Parham P., Vilches C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2dl5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 2002. **54**: 314-319.
- ✓ Goodridge J.P., Lathbury L.J., Steiner N.K., Shulze C.N., Pullikotil P., Seidah N.G., Hurley C.K., Christiansen F.T., Witt C.S. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2007. **37(1)**: 199-211.
- ✓ Goodridge J.P., Witt C.S., Christiansen F.T., Warren H.S. KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J. Immunol.* 2003. **171**: 1768-1774.
- ✓ Gumperz J.E., Litwin V., Phillips J.H., Lanier L.L., Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J. Exp. Med.* 1995. **181**: 1133-1144.

- ✓ Gumperz J.E., Valiante N.M., Parham P., Lanier L.L., Tyán D. Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J. Exp. Med.* 1996. **183**:1817–1827.
- ✓ Gupta N., Scharenberg A.M., Burshtyn D.N., Wagtmann N., Lioubin M.N., Rohrschneider L.R., Kinet J-P., Long E.O. Negative signaling pathways of the killer cell inhibitory receptor and Fc RIIb1 require distinct phosphatases. *J. Exp. Med.* 1997. **186**: 473–478.
- ✓ Hiby S.E., Walker J.J., O'shaughnessy K.M., Redman C.W., Carrington M., Trowsdale J., Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* 2004. **200(8)**: 957-965.
- ✓ Hsu K.C., Chida S., Dupont B., Geraghty D.E. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* 2002a. **190**:40-52.
- ✓ Hsu K. C., Liu X-R., Selvakumar A., Mickelson E., O'Reilly R.J., Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six framework haplotypes, each with multiple subsets. *J. immunol.* 2002b. **169**: 5118-5129.
- ✓ Joncker N.T., Raulet D.H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunol. Rev.* 2008. **224**: 85-97.
- ✓ Khakoo S.I., Rajalingam R., Shum B.P., Weidenbach K., Flodin L., Muir D.G., Canavez F., Cooper S.L., Valiante N.M., Lanier L.L., Parham P. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity* 2000. **12**: 687–698.
- ✓ Khakoo S.I., Thio C.L., Martin M.P., Brooks C.R., Gao X., Astemborski J., Cheng J., Goedert J.J., Vlahov D., Hilgartner M., Cox S., Little A.M., Alexander G.J., Cramp M.E., O'Brien S.J., Rosenberg W.M., Thomas D.L., Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004. **305(5685)**: 872-874.

- ✓ Kikuchi-Maki A., Yusa S., Catina T.L., Campbell K.S. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J. Immunol.* 2003. **171(7)**: 3415-3425.
- ✓ Kim J., Chwae Y.J., Kim M.Y., Choi H., Park J.H., Kim S.J. Molecular basis of HLA-C recognition by p58 natural killer cell inhibitory receptors. *J. Immunol.* 1997. **159**: 3875-3882.
- ✓ Kulkarnia S., Martinb M.P., Carrington M. The Yin and Yang of *HLA* and *KIR* in human disease. *Seminars in Immunol.* 2008. **20**: 343–352.
- ✓ Lanier L.L. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1998a. **16**: 359-393.
- ✓ Lanier L.L., Corliss B.C., Wu J., Leong C., Phillips J.H. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998b. **391(6668)**: 703-707.
- ✓ Li H., Pascal V., Martin M.P., Carrington M., Anderson S.K. Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet.* 2008. **4(11)**: e1000254.
- ✓ Ljunggren H.G., Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 1990. **11(7)**: 237-244.
- ✓ Long E.O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev. Immunol.* 1999. **17**: 875-904.
- ✓ Mandelboim O., Reyburn H.T., Vales-Gomez M., Pazmany L., Colonna M., Borsellino G., Strominger J.L. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 913-922.
- ✓ Mandelboim O., Wilson S.B., Vales-Gomez M., Reyburn H.T., Strominger J.L. Self and viral peptides can initiate lysis by autologous natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 4604-4609.
- ✓ Marsh S.G.E., Parham P., Dupont B., Geraghty D.E., Trowsdale J., Middleton D., Vilches C., Carrington M., Witt C., Guethlein L.A., Shilling H., Garcia C.A., Hsu K.C., Wain H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Human Immunol.* 2003. **64**: 648-654.

- ✓ Martin M.P., Gao X., Lee J.H, Nelson G.W, Detels R., Goedert J.J., Buchbinder S., Hoots K., Vlahov D., Trowsdale J., Wilson M., O'Brien S.J., Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* 2002. **31**: 429-434.
- ✓ Maxwell L.D., Williams F., Gilmore P., Meenagh A., Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: II. KIR2DS4 *Hum. Immunol.* 2004. **65**: 613-621.
- ✓ Meenagh A., Gonzalez A., Sleator C., McQuaid S., Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity, KIR2DL1 and KIR2DS1. *Tissue Antigens* 2008. **72(4)**: 383-391.
- ✓ Middleton D., Williams F., Halfpenny I.A. KIR genes. *Transpl. Immunol.* 2005. **14**: 135-142.
- ✓ Moesta A.K., Norman P.J., Yawata M., Yawata N., Gleimer M., Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol.* 2008. **80(6)**: 3969-3979.
- ✓ Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M.C., Biassoni R., Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. **19**: 197-223.
- ✓ Moretta A., Sivori S., Vitale M., Pende D., Morelli L., Augugliaro R., Bottino C., Moretta L. Existence of both inhibitory (p58) and activating (p50) receptors for HLA-C molecules in human Natural Killer cells. *J. Exp. Med.* 1995. **182(3)**: 875-884.
- ✓ Natarajan K., Dimasi N., Wang J., Mariuzza R., Margulies D. Structure and function of natural killer cell receptor: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu. Rev. Immunol.* 2002. **20**: 853-885.
- ✓ Nelson G.W., Martin M.P., Gladman D., Wade J., Trowsdale J., Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J. Immunol.* 2004. **173(7)**: 4273-4286.
- ✓ Norman P.J., Stephens H.A., Verity D.H., Chandanayingyong D., Vaughan R.W. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 2001. **52(3-4)**: 195-205.

- ✓ Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. **5**: 201-214.
- ✓ Peruzzi M., Wagtmann N., Long E.O. A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B*2705. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 1585-1590.
- ✓ Piccioli D., Sbrana S., Melandri E., Valiante N.M. Contactdependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 2002. **195**: 335-341.
- ✓ Rajalingam R., Hong M., Adams E.J., Shum B.P., Guethlein L.A., Parham P. Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (*Bonobo*) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J. Exp. Med.* 2001. **193**: 135-146.
- ✓ Rajagopalan S., Bryceson Y.T., Kuppusamy S.P., Geraghty D.E., Van der Meer A., Joosten I., Long E.O. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol.* 2006. **4(1)**: e9.
- ✓ Rajagopalan S., Fu J., Long E.O. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J. Immunol.* 2001. **167**: 1877-1881.
- ✓ Rajagopalan S., Long E.O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1999. **189(7)**: 1093-1099.
- ✓ Rajagopalan S., Long E.O. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J. Exp. Med.* 1997. **185**: 1523-1528.
- ✓ Renard V., Cambiaggi A., Vély F., Bléry M., Olcese L., Olivero S., Bouchet M., Vivier E. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol. Rev.* 1997. **155**: 205-221.
- ✓ Robertson J.M., Caligiuri M.A., Manley T.J., Levine H., Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J. Immunol.* 1990. **145**: 3194-3201.
- ✓ Romagnani C., Juelke K., Falco M., Morandi B., D'Agostino A., Costa R., Ratto G., Forte G., Carrega P., Lui G., Conte R., Strowig T., Moretta A., Münz C., Thiel A., Moretta L., Ferlazzo G. CD56^{bright}CD16⁻ Killer Ig-Like Receptor⁻ NK cells display

longer telomeres and acquire features of CD56^{dim} NK cells upon activation. *J. Immunol.* 2007. **178**: 4947-4955.

✓ Santourlidis S., Graffmann N., Christ J., Uhrberg M. Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. *J. Immunol.* 2007. **180(1)**: 418-425.

✓ Santourlidis S., Trompeter H.I., Weinhold S., Eisermann B., Meyer K.L., Wernet P., Uhrberg M. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J. Immunol.* 2002. **169**: 4253-4261.

✓ Selvakumar A., Steffens U., Dupont B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunol. Rev.* 1997a. **155**: 183-196

✓ Selvakumar A., Steffens U., Palanisamy N., Chaganti R.S., Dupont B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. *Tissue Antigens* 1997b. **49(6)**: 564-573.

✓ Shilling H.G., Guethlein L.A., Cheng N.W., Gardiner C.M., Rodriguez R., Tyan D., Parham P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J. Immunol.* 2002. **168**: 2307-2315.

✓ Shilling H.G., Wienert-Weidenbach K., Valiante N.M., Uhrberg M., Parham P. Evidence for recombination as a mechanism for KIR diversification. *Immunogenetics* 1998. **48**: 413-416.

✓ Single R.M., Martin M.P., Gao X., Meyer D., Yeager M., Kidd J.R., Kidd K.K., Carrington M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat. Genetics* 2007. **39(9)**: 1114-1119.

✓ Steffens U., Vyas Y., Dupont B., Selvakumar A. Nucleotide and amino acid sequence alignment for human killer cell inhibitory receptors (KIR). *Tissue Antigens* 1998. **51**: 398-413.

✓ Stewart C.A., Van Bergen J., Trowsdale J. Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. *J. Immunol.* 2003. **170**: 6073-6081.

✓ Stulberg M.J., Wright P.W., Dang H., Hanson R.J., Miller J.S., Anderson S.K. Identification of distal KIR promoters and transcripts. *Genes Immunity* 2007. **8**: 124-130.

- ✓ Tomasello E., Bléry M., Vély F., Vivier E. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin. Immunol.* 2000. **12(2)**: 139-147.
- ✓ Tomescu C., Chehimi J., Maino V.C., Montaner L.J. Retention of viability, cytotoxicity and response to IL-2, IL-15, or IFN- α by human NK cell after CD107a degranulation. *J. Leukoc. Biol.* 2009. **85**: 000-000.
- ✓ Tortorella D., Gewurz B.E., Furman M.H., Schust D.J., Ploegh H.L. Viral subversion of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 2000. **18**: 861-926.
- ✓ Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989. **47**: 187-376.
- ✓ Trundley A.E., Hiby S.E., Chang C., Sharkey A.M., Santourlidis S. Uhrberg M., Trowsdale J., Moffett A. Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics* 2006. **57**: 904-916.
- ✓ Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 10-15.
- ✓ Uhrberg M., Parham P. & Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotype of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven genes. *Immunogenetics* 2002. **54**: 221-229.
- ✓ Uhrberg M., Valiante N.M., Shum B.P., Shilling H.G., Lienert-Weidenbach K., Corliss B., Tyan D., Lanier L.L., Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997. **7**: 753-763.
- ✓ Valés-Gomez M., Reyburn H.T., Erskine R.A., Strominger J. Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1998. **95**: 14326-14331.
- ✓ Valiante N.M., Uhrberg M., Shilling H.G., Lienert-Weidenbach K., Arnett K.L., D'Andrea A., Phillips J.H., Lanier L.L., Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997. **7**:739-751.
- ✓ Vely F., Peyrat M., Couedel C., Morcet J., Halary F., Davodeau F., Romagne F., Scotet E., Saulquin X., Houssaint E., Schleinitz N., Moretta A., Vivier E., Bonneville M. Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. *J. Immunol.* 2001. **166**: 2487–2494.

- ✓ Vilches C., Gardiner C.M., Parham P. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *J. Immunol.* 2000a. **165**: 6416-6421.
- ✓ Vilches C., Pando M.J., Parham P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 2000b. **51**: 639-646.
- ✓ Vilches C., Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2002. **20**: 217-251.
- ✓ Watzl C., Peterson M., Long E.O. Homogenous expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) on polyclonal natural killer cells detected by a monoclonal antibody to KIR2D. *Tissue Antigens* 2000. **56**: 240-247.
- ✓ Wilson M.J., Torkar M., Haude A., Milne S., Jones T., Sheer D., Beck S., Trowsdale J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 2000. **97**: 4778-4783.
- ✓ Wilson M.J., Torkar M., Trowsdale J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* 1997. **49**: 574-579.
- ✓ Winter C.C., Gumperz J.E., Parham P., Long E.O., Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J. Immunol.* 1998. **161**: 571-577.
- ✓ Wu J., Cherwinski H., Spies T., Phillips J. H., and Lanier L. L. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 1059-1068.
- ✓ Yabe T., McSherry C., Bach F.H., Fisch P., Schall R.P., Sondel P.M., Houchins J.P. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics* 1993. **37**: 455-460.
- ✓ Yawata M., Yawata N., Abi-Rached L., Parham P. variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit. Rev. Immunol.* 2002. **22**: 463-482.
- ✓ Yawata M., Yawata N., Dragui M., Little A.M., Partheniou F., Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* 2006. **203(3)**: 633-645.

✓ Young N.T., Uhrberg M., Phillips J.H., Lanier L.L., Parham P. Differential expression of leukocyte receptor complex- encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. *J. Immunol.* 2001. **166**: 3933-3941.

✓ Young N.T., Rust N.A., Dallman M.J., Cerundolo V., Morris P.J., Welsh K.I. Independent contributions of HLA epitopes and killer inhibitory receptor expression to the functional alloreactive specificity of natural killer cells. *Hum. Immunol.* 1998. **59**: 700-712.

LIBROS CONSULTADOS

- ✓ Abbas A., Lichtman A., Pillai Shiv. Inmunología celular y molecular. *Ed. Elsevier*. 6ta edición. Barcelona, España 2008.

- ✓ Fainboim L., Geffner J. Introducción a la inmunología humana. *Ed. Panamericana*. 5ta edición. Buenos Aires, Argentina 2005.

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
 Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM
 (Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI-(Grado) titulada/o
**.GENÉTICA Y EXPRESIÓN DE LOS GENES KIP Y FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS
 NATURAL KILLER EN UN PÁNCEL DE INDIVIDUOS NORMALES.**
 Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por, ...**LEONARDO...**
FAINBERG.....





presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad
 Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) **01/10/2009**, Acta/Expdte.
 N° **52290**....., con el fin de obtener el título de **LICENCIADA EN GENÉTICA**.....

Tildar según corresponda
 Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales
 Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y
 circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Humanidades y Ciencias
 Sociales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier
 soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.
 En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la
 tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea
 Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la
 defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI
 Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciante (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento - NoComercial - CompartirIgual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Referencias:
 CC (Licencias Creative Commons).
 BY (Atribución).
 NC (No comercial).
 SA (Compartir igual).

Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	SOMAGLIA VERONICA ANDREA
Correo electrónico	veronicasomaglia@gmail.com

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas, Misiones a los.....28..... días del mes de...septiembre..... de...2025..-


Somaglia Veronica.