



**UNIVERSIDAD CENTRAL  
DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA TROMBINA EN LA PRODUCCIÓN  
DE IFN- $\gamma$  POR CÉLULAS NATURAL KILLER**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Angelymar Medina Moreno como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutora: Mercedes López

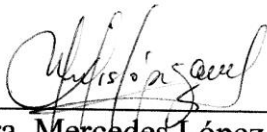
Asesor académico: Valentina Salas

CARACAS, VENEZUELA  
MAYO-2016

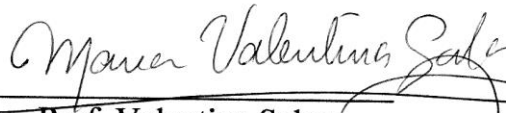
**ACTA DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO  
ESPECIAL DE GRADO DE LA Br. ANGELYMAR MEDINA  
MORENO**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Angelymar Medina Moreno, C.I. 20.127.762, titulado **“Efecto de la trombina en la producción de IFN- $\gamma$  por células Natural Killer”**, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**, con la calificación de **20 puntos**. Asimismo, proponemos que sea considerado para optar a **MENCIÓN HONORÍFICA** ante el Consejo de Escuela.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 31 días del mes de mayo del año 2016, dejando constar que la Prof. Valentina Salas actuó como coordinadora del jurado examinador.



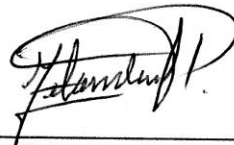
Dra. Mercedes López  
**Tutora**



Prof. Valentina Salas  
**Asesor académico**



Dra. María E. Márquez  
**Jurado**



Prof. Zelandia Fermín  
**Jurado**

## **DEDICATORIA**

Dedico este proyecto a mis padres, quienes con su amor, lucha y perseverancia, nos han guiado a mi hermano y a mí en este viaje llamado vida, nos han guiado por el camino del bien construyendo y fortaleciendo nuestras bases con sus actos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Academia, a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela por abrirme sus puertas, recibirme y hacerme crecer. A mis profesores quienes con dedicación y amor por su arte me ayudaron a sumergirme en este mundo tan increíble y hermoso llamado Ciencia. A mis compañeros y amigos de Facultad, con quienes compartí mi recorrido y de quienes mucho aprendí.

Agradezco al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por recibirme y brindarme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto. Al Grupo de Investigación del Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascul ar por su confianza, sus enseñanzas y hacerme parte de este gran proyecto.

Agradezco a mis padres y a mi hermano por creer en mí, por demostrarme su amor de tantas maneras, por su apoyo incondicional.

Agradezco a mi novio, mi gran amigo, por acompañarme y ser parte de este recorrido, por apoyarme y escucharme siempre.

Doy gracias a Dios por todo lo vivido hasta ahora y por este ciclo que hoy termina.

## **RECONOCIMIENTO**

Este trabajo fue realizado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, específicamente en el Centro de Biofísica y Bioquímica, Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular.

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
1.1. La Sangre.....	6
<b>1.2. Funciones de la sangre</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. <i>Hemostasia</i> .....	7
1.2.1.1. Coagulación sanguínea .....	8
1.2.1.2. Enzima central de la coagulación: Trombina .....	11
1.2.2. <i>Respuesta inmunitaria</i> .....	13
1.2.2.1. Inmunidad innata .....	14
1.2.2.1.a. Células NK.....	15
1.2.2.1.b. Células NKT .....	19
1.2.2.1.c. Citoquinas .....	20
IL-2 .....	21
IL-12 .....	24
IL-10 .....	26
IFN- $\gamma$ .....	27
1.2.2.2. Inmunidad adaptativa .....	29
1.3. Trombina y Sistema inmunitario .....	32
1.4. PARs .....	33
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>35</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5. MATERIALES</b> .....	<b>40</b>
5.1. Reactivos .....	40
5.2. Medio de cultivo .....	40
5.3. Anticuerpos .....	40
<b>6. MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
6.1. Aislamiento de PBMCs y eritrocitos .....	41
6.2. Ensayo de adherencia de las PBMCs .....	42

6.3. Purificación de las células NK .....	42
6.4. Caracterización fenotípica inicial y determinación de pureza de las NK ...	43
6.5. Condiciones de cultivo de las células NK .....	44
6.6. Determinación de la viabilidad celular .....	44
6.7. Extracción y purificación de ARN total .....	45
6.8. Síntesis de ADN complementario (ADN <sub>c</sub> ) mediante RT-PCR .....	46
6.9. PCR en tiempo Real (o qPCR) .....	46
6.10. Análisis estadístico .....	47
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
7.1. Aislamiento de PBMCs .....	48
7.2. Aislamiento y purificación de células NK a partir de PBMCs .....	48
7.3. Viabilidad de las células NK tras su aislamiento .....	49
7.4. Pureza de las preparaciones de células NK .....	49
7.5. Expresión de IFN- $\gamma$ a nivel de ARNm en células NK .....	51
7.6. Expresión de IL-10 a nivel de ARNm en células NK .....	54
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>10. SUGERENCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>61</b>

## RESUMEN

Las células NK forman parte importante de los mecanismos efectores del sistema inmunitario innato, contribuyendo activamente a la defensa del cuerpo humano contra las células tumorales y las células infectadas con microorganismos intracelulares. La trombina, además de ser una proteasa importante en la cascada de la coagulación y la hemostasia en general, desempeña múltiples roles en diversos procesos, como: inflamación, alergia, crecimiento tumoral, metástasis, remodelación tisular, y la cicatrización de heridas.

La trombina es capaz de activar a los receptores PARs, específicamente PAR1, PAR3 y PAR4. En el año 2014 el grupo de investigación que dirige el presente proyecto, demostró que las células NK expresan PAR1, PAR2 y PAR3. Sin embargo, no se tiene información acerca de los efectos de la trombina sobre las células NK. Recientemente, este mismo grupo de investigación encontró mediante estudios de microarreglos una regulación negativa inducida por la trombina en la expresión del gen que codifica para IFN- $\gamma$  en células NK no estimuladas. Partiendo de estos resultados se planteó como objetivo estudiar el efecto de la trombina en la expresión de IFN- $\gamma$  y a su vez, en la expresión de IL-10 a nivel de transcripción por células NK estimuladas por IL-2/IL-12.

Para evaluar el efecto de la trombina a nivel de transcripción se partió de un concentrado de glóbulos blancos humano, también llamado, buffy coat. Se aislaron células mononucleares y glóbulos rojos mediante centrifugación sobre Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus. Seguidamente, se realizó un paso de incubación de las células mononucleares para permitir la adherencia de los monocitos a la placa de cultivo y obtener en suspensión una población de células enriquecida en linfocitos.

Los glóbulos rojos y los linfocitos obtenidos se mezclaron en una proporción 50:1 para llevar a cabo la purificación de las células NK, mediante un coctel de inmunoselección negativa. La pureza de las células NK fue determinada mediante citometría de flujo. Las células NK fueron divididas en varios grupos; los controles negativos del estudio consistieron en células NK sin estímulo y células NK sin estímulo tratadas con trombina, por su parte, los grupos experimentales consistieron en células NK estimuladas con distintas concentraciones de IL-2 e IL-12 durante 4 horas, con y sin tratamiento previo con trombina a una concentración final de 10 U/mL. El tratamiento con trombina por 2 ó 18 horas, se realizó en medio RPMI, libre de suero fetal bovino (SFB) durante la primera hora de incubación, posteriormente, se añadió SFB a una concentración final de 1%. Cumplido el tiempo de estimulación, se aisló el ARN total de las células NK mediante el kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se sintetizó su ADN complementario mediante el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). El efecto de dichos tratamientos sobre la expresión del ARN mensajero del IFN gamma y de la IL-10 en las células NK fue determinado mediante PCR en Tiempo Real (qPCR) usando primers específicos y el kit Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix (Thermo Scientific). Los resultados indican que la trombina induce una regulación negativa sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK estimuladas por IL-2/IL-12, mientras que no ejerce efecto significativo sobre la expresión de la IL-10 en estas células.

**Palabras claves:** células NK, trombina, IFN- $\gamma$ , IL-10, sistema inmunitario, coagulación sanguínea.

## **ABREVIATURAS**

**aa:** aminoácidos

**ADCC:** (del inglés Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

**APs:** (del inglés activating peptides) Péptidos Agonistas

**Células LAK:** (del inglés lymphokine-activated killer cells) células Killer Activadas por Linfocinas.

**Células NK:** células Natural Killer

**FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína

**FT:** Factor Tisular

**GDP:** Difosfato de Guanosina

**GM-CSF:** factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

**GTP:** Trifosfato de Guanosina

**IFN:** Interferón

**IL:** Interleuquina

**IL-12R:** Receptor para IL-12

**IL-2R:** Receptor para IL-2

**iNKR:** (del inglés Inhibitory Natural Killer Cell Receptors) Receptores inhibidores de células NK.

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**IP-10:** proteína-10 inducida por IFN- $\gamma$

**Linfocitos T<sub>H</sub>:** Linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup>

**LPS:** lipopolisacárido

**LTC:** Linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>

**MCP-1:** proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**MIP-2:** proteína inflamatoria de macrófagos tipo 2

**NCAM:** moléculas de adhesión de las células nerviosas

**ODN:** oligodesoxirribonucleótidos

**PAR:** Receptor activado por proteasas

**PBLs:** (del inglés peripheral blood lymphocytes) linfocitos de sangre periférica

**PBMCs:** (del inglés peripheral blood mononuclear cells) células mononucleares de sangre periférica.

**PBS:** (del inglés phosphate buffered saline) buffer fosfato salino.

**PE Cy5:** Ficoeritrina Cianina 5

**PE:** Ficoeritrina

**PHA:** Fitohemaglutinina

**PMAP:** patrones moleculares asociados a patógenos

**RANTES:** Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted

**RBCs:** (del inglés red blood cells) células rojas de la sangre

**RPA:** (del inglés RNase protection assay) Ensayo de protección de RNasa.

**RT-PCR:** Transcripción Reversa

**SFB:** suero fetal bovino

**TAFI:** (del inglés thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina.

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**β-ME:** β-Mercaptoetanol

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1.** Nombres de los genes y secuencias de los primers utilizados para la PCR en tiempo Real.

**Figura 1.** Modelo Celular de la coagulación.

**Figura 2.** Estructura de rayos X de la forma E: Na<sup>+</sup> de la trombina.

**Figura 3.** Subconjuntos de células NK humanas.

**Figura 4.** Condiciones de activación de las células NK.

**Figura 5.** Resumen de la biología de IL-12.

**Figura 6.** Mecanismo de activación de los PARs.

**Figura 7.** Análisis de pureza de células NK por citometría de flujo.

**Figura 8.** Efecto de la incubación por 2 horas con trombina sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK.

**Figura 9.** Efecto de la incubación por 18 horas con trombina sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK.

**Figura 10.** La trombina inhibe la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK estimuladas con IL-2 e IL-12.

**Figura 11.** Efecto de la trombina sobre la expresión de IL-10 por células NK estimuladas con IL-2 e IL-12.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La sangre

La sangre es un tejido líquido, al que puede considerarse como una variedad de tejido conectivo, que circula por el aparato cardiovascular gracias al impulso que le proporciona el corazón. La sangre está compuesta por dos fracciones bien diferenciadas: plasma y células sanguíneas o elementos formes. El plasma es la fracción líquida intercelular en la que se encuentran suspendidos: compuestos orgánicos, electrolitos y proteínas. Está compuesto principalmente por agua (90%) y supone el 55% del volumen sanguíneo. Por su parte, las células sanguíneas se clasifican en: eritrocitos (de  $4 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), plaquetas (de 200.000 a 400.000/ $\text{mm}^3$ ) y leucocitos (de 6000-9000/ $\text{mm}^3$ ). A su vez, los leucocitos se dividen en dos grandes grupos: polimorfonucleares y mononucleares. Los polimorfonucleares incluyen: neutrófilos (55-60%), eosinófilos (2-5%) y basófilos (0-1%). Mientras que los mononucleares: linfocitos (30-35%) y monocitos (3-7%). Se han distinguido varios tipos de linfocitos: linfocitos T, linfocitos B, células Natural Killer (NK), entre otros (Ross y Pawlina, 2012).

## 1.2. Funciones de la sangre

La sangre cumple tres funciones generales de suma importancia en el mantenimiento de la homeostasis en el organismo, estas son:

- A. **Transporte:** Transporta  $\text{O}_2$  y nutrientes hasta los tejidos y recoge de ellos el  $\text{CO}_2$  y los productos de desecho. Transporta sustancias como hormonas, y componentes de la absorción intestinal entre distintos lugares del organismo (Hall y Guyton, 2011).

- B. **Regulación:** participa en la regulación del metabolismo hídrico y mineral y a su vez, en los mecanismos de regulación de la temperatura corporal (Hall y Guyton, 2011).
- C. **Protección:** participa en la hemostasia y en los mecanismos de la respuesta inmunitaria (Hall y Guyton, 2011).

### 1.2.1. Hemostasia

La **hemostasia** es un mecanismo de defensa que protege al organismo de las pérdidas sanguíneas que se producen tras una lesión vascular (Furie y Furie, 2008). La hemostasia comprende cuatro etapas:

- A. **Vasoconstricción:** se produce inmediatamente después de la lesión vascular, condicionada por la contracción del músculo liso vascular en respuesta al estímulo mecánico, así como por la serotonina y otras sustancias vasoconstrictoras liberadas por las plaquetas. Lo que da lugar a la reducción del flujo de sangre (Hall y Guyton, 2011).
- B. **Agregación plaquetaria:** la lesión endotelial genera también la adhesión de las plaquetas a la zona lesionada como consecuencia de la interacción de proteínas de adhesión presentes en la membrana plaquetaria y la pared vascular. Dando como resultado la formación del tapón plaquetario inicial. En ocasiones este fenómeno es suficiente para producir hemostasia (Hall y Guyton, 2011).

C. **Coagulación sanguínea:** si el trombo plaquetario es insuficiente se activa la coagulación sanguínea, lo que comprende la activación de los factores de la coagulación, esto da como resultado la formación del coágulo de fibrina (coágulo final) (Hall y Guyton, 2011). Este punto será explicado con detalle más adelante.

D. **Fibrinólisis:** para conseguir la reparación del tejido endotelial lesionado, se produce la fibrinólisis, que comienza con la retracción del coágulo condicionado por las fibras de actina y miosina de las plaquetas que traccionan la red de fibrina. A continuación se produce la disolución del coágulo que se inicia por la activación del plasminógeno. Dicha activación genera síntesis de plasmina que hidroliza los enlaces arginina-lisina de diversas proteínas, entre ellas la fibrina, dando lugar a fragmentos progresivamente más pequeños (Hall y Guyton, 2011).

#### **1.2.1.1. Coagulación sanguínea**

La coagulación sanguínea se produce por la activación secuencial (en cascada) de proteasas de serina. Estas proteínas constituyen una familia de enzimas proteolíticas caracterizadas por contener en su centro catalítico residuos de serina, histidina y ácido aspártico, los cuales son capaces de hidrolizar enlaces peptídicos (Barret y col., 1998). Las proteasas de serina se producen como precursores o zimógenos inactivos. La posterior conversión del zimógeno en una enzima fisiológicamente activa es mediada mediante un proceso llamado “proteólisis limitada” o activación del zimógeno (Rinderknecht, 1986; Walsh y

Ahmad, 2002). Las proteínas plasmáticas que participan en la coagulación se conocen como factores de la coagulación. Son doce factores, denotados con números romanos del I al XIII, no existe el factor VI (FVI), la forma activa de cada factor se denota agregando una letra "a" (por ej. FV – FVa). Los zimógenos que tendrán actividad de proteasas de serina, son: Protrombina o factor II (FII), factor VII (FVII), FIX, FX, FXI y FXII. Existen otros factores conocidos como "cofactores enzimáticos" ya que no poseen actividad enzimática propia, pero facilitan la acción de otro factor, entre ellos se encuentran: Factor Tisular o FIII, Calcio o FIV, FV y FVIII. Además, el factor XIII es una fibrinolisina, que forma uniones covalentes entre los monómeros de fibrina generados durante la coagulación. Por su parte, el fibrinógeno o FI actúa como sustrato de la trombina en la cascada, dando lugar a la formación de monómeros insolubles de fibrina.

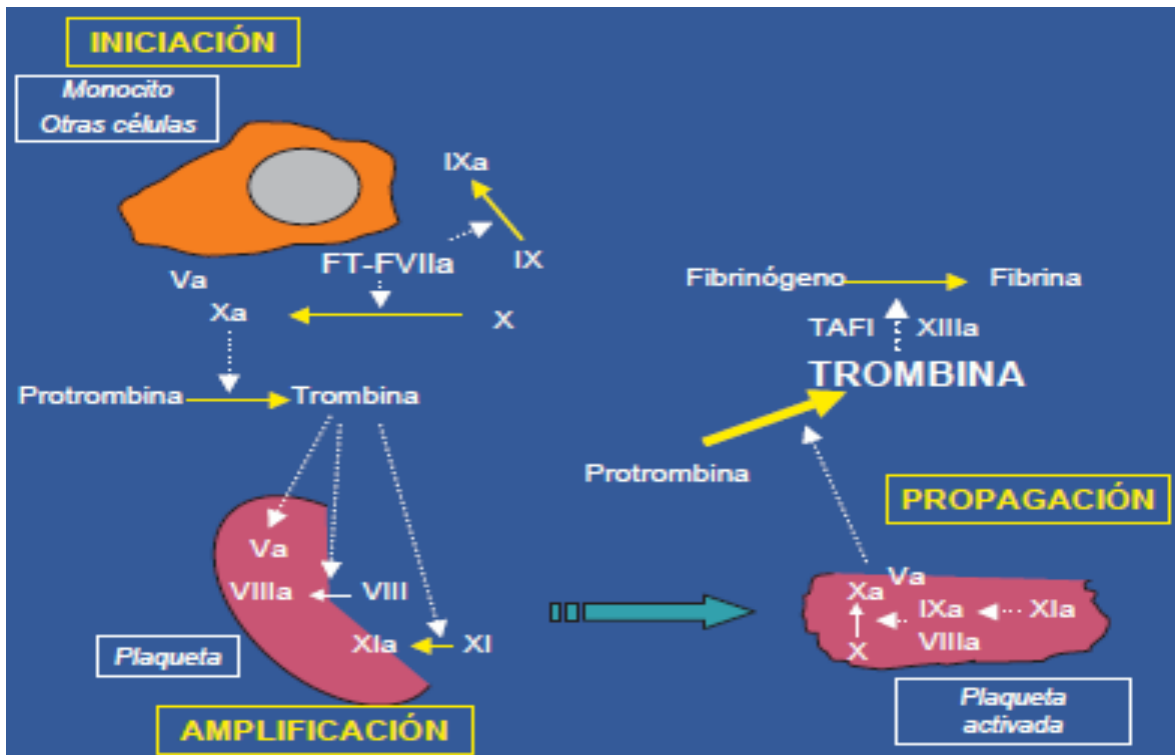
Clásicamente se consideraba la coagulación como una cascada enzimática que podía ser iniciada por 2 vías independientes, la vía intrínseca y la vía extrínseca, que convergían en una vía final común. Sin embargo, dicho esquema no contemplaba la participación de las plaquetas, ni de otras superficies celulares. Según la visión actual, descrita en el llamado Modelo Celular (Hoffman y Monroe, 2005) la coagulación se produce en tres etapas interrelacionadas:

**a. Fase de iniciación:** Esta fase comienza con la exposición del Factor Tisular (FT) tras una lesión vascular. El FT es el principal iniciador de la coagulación *in vivo* y un componente integral de la membrana celular. Se expresa constitutivamente en numerosos tipos celulares que no están en contacto directo con la sangre, como en células presentes en el subendotelio y puede ser

expresado en otras células, como monocitos circulantes y células endoteliales, en respuesta a ciertos estímulos proinflamatorios. Durante el proceso hemostático que tiene lugar tras la lesión vascular, se produce el contacto de la sangre circulante con el subendotelio, lo que favorece la unión del FT con el Factor VII circulante y su posterior activación. El complejo FT/VIIa activa los factores IX y X. El factor Xa se combina en la superficie celular con el factor Va para producir pequeñas cantidades de trombina (Figura 1) (Mackman y col., 2007).

**b. Fase de amplificación:** Las pequeñas cantidades de trombina generadas amplifican la señal procoagulante inicial activando a las plaquetas y a los factores V, VIII y XI, que se ensamblan en la superficie plaquetaria para promover ulteriores reacciones (Figura 1) (Monroe y col., 1994; Oliver y col., 1999).

**c. Fase de propagación:** Durante esta fase, el complejo “tenasa” (FVIIIa, FIXa, Ca<sup>+2</sup> y fosfolípidos) cataliza la conversión del factor X a factor Xa, mientras que el complejo “protrombinasa” (FXa, FVa, Ca<sup>+2</sup> y fosfolípidos) cataliza, a nivel de superficies celulares, la conversión de protrombina en grandes cantidades de trombina (“explosión de trombina”), necesarias para la formación de un coágulo estable de fibrina. El complejo protrombinasa es 300.000 veces más activo que el factor Xa solo en catalizar la activación de protrombina. La trombina generada activaría no sólo el fibrinógeno a fibrina, sino también, al factor XIII o factor estabilizador de la fibrina, y a un inhibidor fibrinolítico (TAFI, por thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) necesarios para la formación de un coágulo de fibrina resistente a la lisis (Figura 1) (Mann y col., 2003; Crawley y col., 2007).



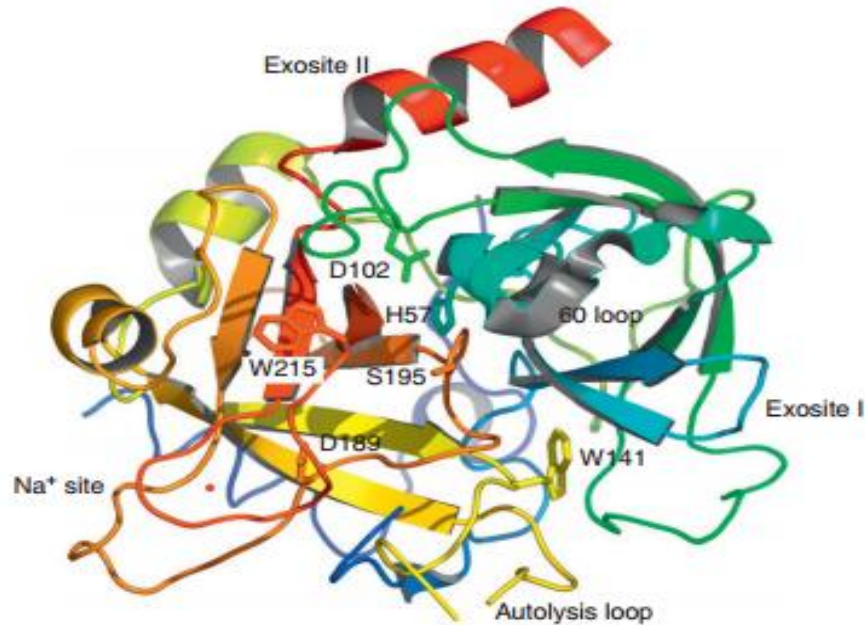
**Figura 1.** Modelo Celular de la coagulación. La fase de iniciación tiene lugar a nivel de las células que expresan FT, como fibroblastos y monocitos activados y conlleva a la generación de los factores Xa, IXa y pequeñas cantidades de trombina. La fase de amplificación ocurre principalmente en la superficie de las plaquetas, que son activadas por la trombina generada y acumulan factores y cofactores en su superficie, permitiendo el ensamblaje de complejos donde tendrán lugar las reacciones enzimáticas siguientes. Finalmente, en la fase de propagación, el complejo Protrombinasa promueve la generación de grandes cantidades de trombina que favorecen la formación de fibrina y su ulterior polimerización para constituir un coágulo estable, tras la acción del FXIIIa. (Tomado de Páramo y col., 2009).

### 1.2.1.2. Enzima central de la coagulación: Trombina

La trombina pertenece a la familia de las proteasas de serina y es considerada la enzima central de la cascada de la coagulación. Se produce inmediatamente a partir de su zimógeno, la protrombina, por la acción del complejo protrombinasa en lugares donde se ha llevado a cabo un daño tisular. La trombina consiste en dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro: la cadena A de 5kDa (36 aa) y la cadena B de 32kDa (259 aa), donde se encuentra

el sitio activo (Collados y col., 1996). La trombina posee alta capacidad para adoptar diferentes conformaciones o formas alostéricas. En condiciones fisiológicas es capaz de adoptar tres formas: una forma inactiva  $E^*$ , incapaz de unir  $\text{Na}^+$  o sustratos en su sitio activo, que está en equilibrio con una forma activa  $E$ , capaz de unir  $\text{Na}^+$ , pero no la mayoría de sus sustratos, denominada forma lenta o de baja actividad. Esta forma lenta está, a su vez, en equilibrio con la forma ligada a  $\text{Na}^+$ ,  $E:\text{Na}^+$  (Figura 2), denominada rápida, altamente activa y necesaria para la unión de la mayoría de sus sustratos fisiológicos (Di Cera, 2011).

En la estructura de trombina se han identificado cuatro sitios esenciales: 1) El sitio activo, localizado en un canal interno, donde se sitúan los residuos H57, D102 y S195 responsables de la actividad catalítica; 2) El sitio de unión de  $\text{Na}^+$ ; 3) El exosito I, que contiene diversos aminoácidos básicos, que facilitan la orientación óptima de la mayoría de sus sustratos, como el fibrinógeno, la trombomodulina y de sus inhibidores naturales como la hirudina; 4) El exosito II, opuesto al exosito I, constituido por una hélice  $\alpha$  C-terminal, en el que se unen ligandos polianiónicos, como la heparina, los glucosaminoglicanos o el receptor de plaquetas Gplb. En general, la unión de sustratos al exosito I produce un cambio conformacional a nivel del canal del centro activo, situado a  $\approx 30 \text{ \AA}$ , que se refleja en un cambio en la orientación de las cadenas de W215 y R221 para permitir la entrada del sustrato en el canal (Figura 2) (Di Cera, 2011).



**Figura 2.** Estructura de rayos X de la forma E: Na<sup>+</sup> de la trombina. En esta orientación estándar la cadena A (azul) corre en la parte posterior de la molécula, opuesta al hemisferio frontal de la cadena B catalítica. Los residuos del centro activo (S195, H57 y D102) están etiquetados. El sitio de unión de Na<sup>+</sup> (punto rojo) está a 15 Å de distancia de los residuos de la triada catalítica. El exosito I está en el lado opuesto de la cadena B con relación al sitio Na<sup>+</sup> (Tomado de Di Cera, 2011).

### 1.2.2. Respuesta inmunitaria

Las respuestas del ser humano contra infecciones provocadas por agentes patógenos potenciales se conocen como **respuestas inmunitarias**. En la actualidad se reconocen cuatro categorías amplias de agentes que causan enfermedades, o agentes patógenos: virus, bacterias, hongos y microorganismos eucariotas unicelulares o multicelulares llamados en conjunto, parásitos (Murphy y col., 2008). La defensa contra los microorganismos tiene lugar a través de las primeras reacciones correspondientes a la inmunidad innata y las respuestas posteriores a cargo de la inmunidad adaptativa.

### 1.2.2.1. Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo contra los microbios, que impide, controla o elimina la infección en el hospedador generando una respuesta casi instantánea mediante el reclutamiento de leucocitos a los focos de infección (inflamatorios) que van a limitar los daños (Li y Huang, 2009). La inmunidad innata siempre está inmediatamente disponible para combatir una amplia gama de agentes patógenos, pero no lleva a inmunidad duradera, y no es específica para microorganismo patógeno individual alguno (Murphy y col., 2008).

La inmunidad innata no sólo cumple funciones defensivas poco después de una infección, sino que también “advierde” de su existencia con el objeto de organizar una respuesta inmunitaria adaptativa posterior (Abbas y col., 2008)

Los componentes de la inmunidad innata reconocen estructuras características de los patógenos microbianos que no están presentes en las células de los mamíferos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Aparte de los productos microbianos, el sistema inmunitario innato también puede reconocer células hospedadoras agredidas o lesionadas, al reconocer moléculas que no aparecen con profusión en las células sanas; por ej. Proteínas del shock térmico, determinadas moléculas similares al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de la clase I, y los fosfolípidos de membrana alterados (Abbas y col., 2008).

Los principales componentes de la inmunidad innata son:

- a) **Las barreras físicas y químicas**, como epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies (Murphy y col., 2008).

- b) **Las células fagocíticas** (neutrófilos y macrófagos) y **las células Natural Killer (NK)** (Murphy y col., 2008).
- c) **Las proteínas sanguíneas**, como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación (Murphy y col., 2008).
- d) **Las citoquinas**

#### **1.2.2.1.a. Células NK: Importantes efectores de la Inmunidad Innata**

Las células asesinas naturales, también conocidas como células NK (del inglés Natural Killer), son una sub-población de linfocitos no T (CD3 negativos) y no B (CD19 negativos), caracterizada por ser grandes (diámetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$ ) y contener numerosos gránulos citotóxicos en el citoplasma, razón por la cual también se denominan linfocitos grandes granulares (Moretta y col., 2002).

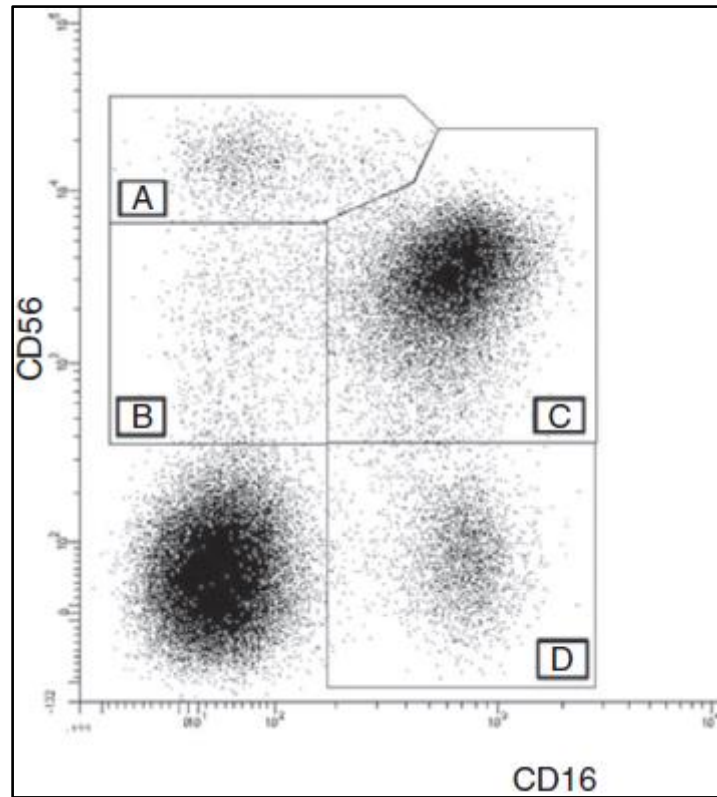
Las células NK son de gran importancia en el sistema inmunitario innato, al ejercer un papel fundamental en la defensa temprana del hospedador contra patógenos invasores, mientras la respuesta inmunitaria específica está siendo activada (Robertson y Ritz, 1990).

Las células NK se desarrollan en la médula ósea a partir de la célula progenitora linfoide común y circulan en la sangre constituyendo entre el 5 y 14% de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por peripheral blood mononuclear cell) (Murphy y col., 2008). Su función efectora está mediada por la producción de citoquinas y su actividad citotóxica. Se encuentran principalmente en los nódulos linfoides y la sangre, pero también están ampliamente distribuidas

en la piel, el intestino, el hígado, los pulmones y el útero, entre otros tejidos. Son células no adherentes y no fagocíticas (Carrega y Ferlazzo, 2012).

Las células NK se han identificado fenotípicamente por la expresión en su superficie de las moléculas CD16 (el receptor de baja afinidad para la fracción Fc de la inmunoglobulina G, o Fcγ-RIIA) y/o CD56 (de la familia de moléculas de adhesión de las células nerviosas, NCAM) (Moretta y col., 2001; Moretta y col., 2002). Basados en la expresión de estos marcadores se han descrito cuatro subpoblaciones de células NK: a) CD56<sup>bright</sup>, las cuales generalmente no expresan CD16 y tienen baja expresión de receptores KIR; b) CD56<sup>dim</sup>, que comprende alrededor del 90% de las células NK, de las cuales una pequeña proporción son CD16<sup>-</sup> c) pero en su mayoría expresan CD16 y receptores KIR y d) CD56<sup>-</sup>, que expresan en alta densidad el CD16 (Figura 3) (Taborda y col., 2014).

En general, las células NK que expresan CD56<sup>dim</sup> (dim: baja densidad de expresión) son principalmente citotóxicas y participan activamente en el proceso de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, del inglés Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) (Fauci y col., 2005; Mavilio y col., 2005). Mientras que, las células CD56<sup>bright</sup> (bright: alta densidad de expresión) representan la población principal de células NK que produce citoquinas inmunorreguladoras, incluyendo Interferón (IFN)-γ, factor de necrosis tumoral (TNF)-α y β, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), Interleuquina (IL)-10 e IL-13 (Cooper y col, 2001; Perussia y col, 2005).

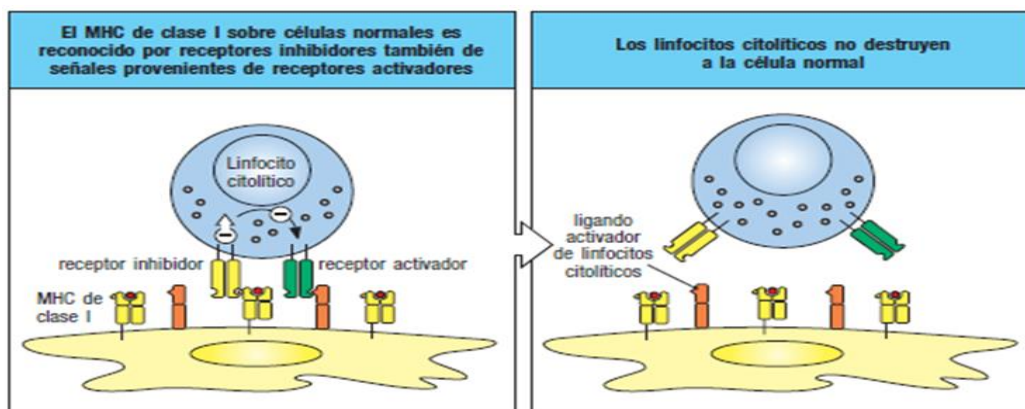


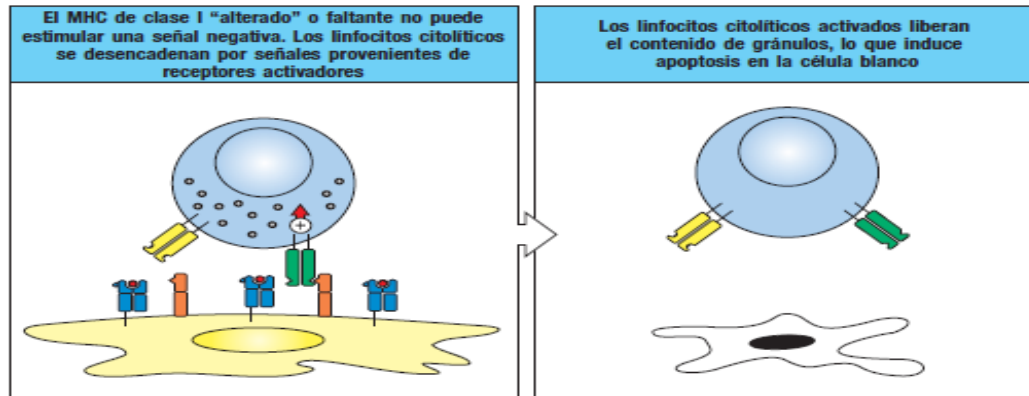
**Figura 3.** Subconjuntos de células NK humanas. Mediante citometría de flujo se pueden establecer las siguientes subpoblaciones de células NK en sangre periférica, en un gráfico de puntos y basándose en la expresión de CD56 y CD16 en células mononucleares CD3<sup>-</sup>: A) CD56<sup>bright</sup>; B) CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup>; C) CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>; D) CD56<sup>-</sup>. En general, las células NK CD56<sup>bright</sup> son predominantemente células inmunorreguladoras, que producen altos niveles de citoquinas. Mientras que, las células NK CD56<sup>dim</sup> son células esencialmente citotóxicas, producen bajos niveles de citoquinas (Tomado de Taborda y col., 2014).

La activación de las células NK está regulada por un equilibrio entre las señales generadas a partir de una variedad de receptores activadores e inhibidores de superficie celular (Vivier y col, 2004) y a su vez, por el IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  o citoquinas derivadas de macrófagos. Los receptores inhibidores (iNKR, del inglés Inhibitory Natural Killer Cell Receptors) son específicos para las moléculas del MHC de clase I, mientras que los receptores activadores proporcionan la señal

de “encendido” que induce la activación de las células NK durante su interacción con la célula blanco (Galiani y col., 1999).

Las células NK se activan por una combinación de reconocimiento directo de cambios en glucoproteínas de superficie celular inducidos por agresión metabólica, como transformación maligna o infección vírica o bacteriana, junto con un reconocimiento de “lo propio alterado”, que comprende cambios de la expresión de moléculas del MHC. La expresión alterada de moléculas del MHC de clase I puede ser una característica común de células infectadas por patógenos intracelulares, ya que muchos de estos patógenos han creado estrategias para interferir con la capacidad de dichas moléculas para desplegar péptidos a células T. Así, un mecanismo mediante el cual las células NK distinguen entre células infectadas y no infectadas es al reconocer alteraciones de la expresión del MHC de clase I. Las señales generadas por los receptores activadores de las células NK incluyen la liberación de citoquinas como IFN- $\gamma$  y la muerte dirigida de la célula diana por medio de liberación de gránulos citotóxicos, que contienen granzimas y perforina. (Figura 4) (Murphy y col., 2008).





**Figura 4.** Condiciones de activación de las células NK. La eliminación mediada por células NK depende del balance entre señales activadoras e inhibitoras. (Tomado de Murphy y col, 2008).

Las señales generadas por los receptores inhibitoras evitan que las células NK destruyan células hospedadoras normales. Tales receptores inhibitoras son específicos para varias moléculas del MHC de clase I, lo que ayuda a explicar por qué las células NK destruyen de manera selectiva células que portan cifras bajas de dichas moléculas pero se evita que destruyan células que tienen números normales. Mientras más alto sea el nivel de expresión del MHC de clase I sobre la superficie de una célula, mejor protegida está contra la destrucción por células NK (Murphy y col., 2008).

#### 1.2.2.1.b. Células NKT

Existe un subtipo de linfocitos T llamado células NKT, estas células se caracterizan fenotípicamente por presentar en su superficie el marcador CD3 característico de los linfocitos T y a su vez, por expresar una variedad de marcadores que normalmente se asocian con las células NK, tales como CD16 y CD56. Muchas de estas células presentan un TCR semi-invariante, restringido por la molécula de histocompatibilidad CD1d, una molécula presentadora de antígeno

que una lípidos y glicolípidos propios y extraños. Tras la activación, las células NKT son capaces de producir grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , IL-4 y GM-CSF, así como otras múltiples citoquinas y quimioquinas (tales como IL-2, IL-13, IL-17, IL-21 y TNF- $\alpha$ ) (Abbas y col., 2008).

#### **1.2.2.1.c. Citoquinas**

Las citoquinas son unas proteínas de origen secretor a cuyo cargo corren muchas de las respuestas celulares correspondientes a la inmunidad innata y adaptativa y, por tanto actúan como “moléculas mensajeras” del sistema inmunitario. Aunque existen muchos tipos de células productoras de citoquinas dentro del sistema inmunitario innato, los macrófagos son las células más comprometidas en la síntesis de citoquinas, mientras que en el sistema inmunitario adaptativo son las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>, ya que sus citoquinas son esenciales para que se produzca la respuesta inmunitaria (Abbas y col., 2008).

Las citoquinas se unen a receptores específicos de membrana de las células diana, iniciando una señal intracelular que altera el patrón de expresión génica, generando por tanto en las células diana una determinada respuesta biológica.

Aunque las citoquinas son variables desde el punto de vista estructural comparten varias propiedades (Abbas y col., 2008):

- a) La secreción de citoquinas es un fenómeno breve y autolimitado.** Las citoquinas no se almacenan habitualmente como moléculas preformadas, su síntesis se inicia por la transcripción génica nueva como consecuencia de la activación celular. Esta activación de la transcripción es transitoria, y

los ARN mensajeros que codifican la mayoría de las citoquinas son inestables, por lo que la síntesis de citoquinas también es transitoria.

- b) Las acciones de las citoquinas son con frecuencia pleiotrópicas y redundantes.** Pleiotropismo se refiere a la capacidad de una citoquina de actuar sobre diferentes tipos celulares. Esta propiedad permite que una citoquina medie diversos efectos biológicos. Redundancia se refiere a la propiedad de que múltiples citoquinas tienen los mismos efectos funcionales.
- c) Las citoquinas influyen con frecuencia en la síntesis y las acciones de otras citoquinas.** La capacidad de una citoquina de estimular la síntesis de otras, da lugar a cadenas en las que una segunda o tercera citoquina puede mediar los efectos biológicos de la primera. Dos citoquinas pueden antagonizar mutuamente sus acciones, producir efectos aditivos o, en algunos casos, mayores de los previstos, o sinérgicos.
- d) Las acciones de las citoquinas pueden ser locales o sistémicas.** La mayoría de las citoquinas actúan de forma autocrina (sobre la misma célula que las ha secretado), yuxtacrina (sobre células adheridas a la célula secretora) y paracrina (sobre células cercanas), y más raramente de forma endocrina (lejos de la célula secretora).
- e) Las citoquinas inician sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos en las células diana.** Los receptores de las citoquinas se unen con frecuencia a sus ligandos con afinidades elevadas, con constantes de disociación (valores de  $K_d$ ) en el intervalo de  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$

M. Por tanto, sólo son necesarias pequeñas cantidades de una citoquina para ocupar los receptores y producir efectos biológicos.

- f) **Las señales externas regulan la expresión de los receptores de las citoquinas** y, por tanto, la reactividad de las células a las citoquinas.
- g) **Las respuestas celulares a la mayoría de las citoquinas suponen cambios de la expresión génica en las células diana**, lo que da lugar a la expresión de nuevas funciones y a veces a la proliferación de las células diana.
- h) **Las respuestas celulares a las citoquinas están reguladas estrechamente**, y hay mecanismos inhibidores de retroalimentación para inactivar estas respuestas.

### **Clasificación de las citoquinas**

La siguiente clasificación está basada en el efecto biológico principal de estos mediadores solubles:

- a) Interleuquinas (IL)
- b) Quimioquinas
- c) Factores de crecimiento
- d) Citoquinas implicadas en hematopoyesis
- e) Interferones (IFNs)
- f) Factores de necrosis tumoral (TNFs)

En base al alcance del presente proyecto se describirán a continuación sólo cuatro citoquinas: IL-2, IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$ .

## IL- 2

La IL-2 es una citoquina de 15kDa compuesta por cuatro cortas  $\alpha$ -hélices y es producida esencialmente por células T CD4<sup>+</sup> activadas, aunque se ha reportado que las células T CD8<sup>+</sup> activadas, células NK, células NKT y las células dendríticas también son capaces de secretar esta citoquina en cantidades más pequeñas (Boyman y col., 2006; Malek, 2008).

La IL-2 puede actuar tanto de manera paracrina como autocrina mediante la unión a su receptor (IL-2R), miembro de la familia de receptores de citoquinas de tipo I (Boyman y col., 2006; Malek, 2008). Se han identificado tres cadenas diferentes como componentes del receptor IL-2R (Panu y Warren, 2004; Malek, 2008): la cadena  $\gamma$  común ( $\gamma$ c) o CD132, la cadena  $\beta$  o CD122 y la cadena  $\alpha$  o CD25. Únicamente las cadenas  $\gamma$ c y  $\beta$  tienen grandes dominios intracelulares y están involucrados en la transducción de señales (Boyman y col., 2006).

IL-2 desempeña un papel central en la iniciación y el desarrollo de una respuesta inmune al antígeno a través de sus efectos directos sobre la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T y B (Morgan y col., 1976; Jelinek y Lipsky, 1987). IL-2 también activa otras células del sistema inmunitario, más notablemente a las células NK (Brooks y Henney, 1985). La IL-2 aumenta la actividad de las células NK, lo que conduce a un aumento de su actividad citotóxica (Henney y col., 1981; Savary y col., 1989) y a la producción de diversas citoquinas tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Anegon y col., 1988), GM-CSF, IL-3 (Cuturi y col., 1989) e IL-15 (Warren y col., 1996).

## IL-12

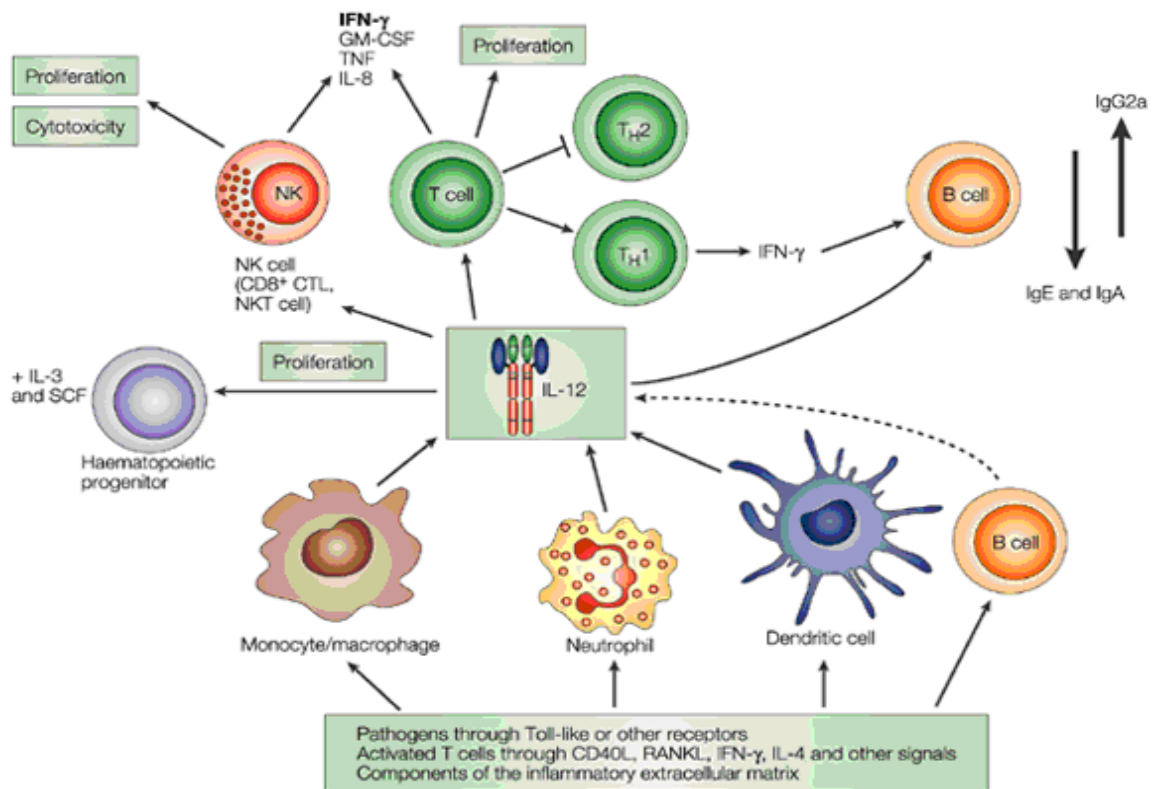
La IL-12 es una citoquina inmunoreguladora clave en el sistema inmunitario (Chehimi y Trinchieri, 1994; Beadling y Slifka, 2006; Sinigaglia y col., 1999), presenta un peso molecular de 70kDa y está compuesta por dos subunidades unidas covalentemente, IL-12p35 (35kDa) e IL-12p40 (40kDa), cada subunidad se expresa en cromosomas diferentes (Merberg y col., 1992).

Las actividades biológicas de IL-12 están mediadas a través de la unión a un complejo receptor de membrana, que está compuesto también por dos subunidades: IL-12R  $\beta$ 1 e IL-12R  $\beta$ 2, ambas subunidades son miembros de la familia de receptores de citoquinas de tipo I. Las dos cadenas del receptor son necesarias para mediar una señalización máxima; sin embargo, las cadenas tienen funciones independientes (Presky y col., 1996; Collison y Vignali, 2008).

La IL-12 es producida principalmente por células dendríticas, macrófagos, monocitos, neutrófilos, microglías y, en menor medida por células B (Airoldi y col., 2002). También se ha demostrado que células no inmunes son capaces de producir ciertas cantidades de esta citoquina, entre ellas queratinocitos infectados, osteoblastos, células epiteliales y células endoteliales (Aragane y col., 1994; Bost y col., 1999). La producción de IL-12 está regulada por mecanismos de retroalimentación positivos y negativos que involucran citoquinas  $T_H1$  proinflamatorias, citoquinas  $T_H2$  antiinflamatorias e IFN tipo 1 (Aste-Amezaga y col., 1998, Segal y col., 1998).

La IL-12 tiene múltiples funciones biológicas y representa un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La IL-12 induce la diferenciación de células T vírgenes  $CD4^+$  a células  $T_H1$  y activa células NK. Las células  $T_H1$  y las

NK producen IFN- $\gamma$  y otras citoquinas (Bonecchi y col., 1998). La IL-12 cumple un rol importante en el tráfico y la migración de células T mediante la inducción de la expresión de ligandos de moléculas de adhesión P y E-selectina sobre células T<sub>H1</sub>, no sobre células T<sub>H2</sub>; lo que permite que estas células sean reclutadas selectivamente a los sitios donde se necesita una respuesta inmunitaria T<sub>H1</sub> (Astrup y col., 1997). La IL-12 actúa sobre progenitores hematopoyéticos, que en sinergia con otros factores estimulantes de colonias, inducen una mayor proliferación y formación de colonias. IL-12 actúa sobre células B directamente o a través de los efectos de citoquinas de tipo 1 como IFN- $\gamma$  mejorando la activación y la producción de inmunoglobulinas asociadas a una respuesta T<sub>H1</sub> (Hamza y col., 2010) (Figura 5).



**Figura 5.** Resumen de la biología de IL-12. Los principales productores fisiológicos de IL-12 son los fagocitos y las células dendríticas. Las células diana fisiológicamente más importantes de IL-12 son: progenitores

hematopoyéticos sobre las cuales, la IL-12 induce una mayor proliferación y formación de colonias; también las células NK, sobre las que IL-12 induce proliferación, aumento de la citotoxicidad, y la producción de citoquinas, particularmente IFN- $\gamma$ . En las células T, además, la IL-12 además favorece la diferenciación de células que producen citoquinas tipo 1 ( $T_H1$ ). Finalmente, en las células B, la IL-12 actúa directamente o indirectamente (a través del IFN- $\gamma$ ), favoreciendo la producción de inmunoglobulinas asociadas a una respuesta  $T_H1$ ; por ejemplo, la IgG2a (Tomado de Hamza y col., 2010).

## **IL-10**

La IL-10 es una citoquina altamente pleiotrópica, posee propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras, y circula en la sangre de pacientes con infecciones graves (Lehmann y col., 1995). El gen que codifica a la IL-10 humana está constituido por cinco exones y cuatro intrones, y se localiza en el cromosoma 1q32 humano (Jones y Flavell, 2005). La forma biológicamente activa de IL-10 es como homodímero estabilizado por fuerzas no covalentes, con subunidades de 160 aminoácidos (aa) en el humano (18,5 kDa). La actividad biológica del IL-10 es mediada por la unión a su receptor el cual pertenece a la familia de receptores de citoquinas de tipo II.

En principio, la IL-10 fue descrita como un producto de células  $T_H2$  que inhibía la síntesis de citoquinas en células  $T_H1$  (Fiorentino y col., 1989). Ahora se sabe que IL-10 es producida por células del sistema inmunitario innato y adaptativo, incluyendo macrófagos, células dendríticas, células B, células T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , (Moore y col., 2001; Kamanaka y col., 2006), mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y células NK (O'Garra y Vieira, 2007; Lampropoulou y col., 2010).

La IL-10 es una citoquina supresora general. La secreción de IL-10 por las células  $T_H1$  representa un mecanismo de autorregulación potente que protege contra la inflamación excesiva y el potencial de destrucción del tejido durante las

respuestas inmunes  $T_H1$  proinflamatorias impulsadas en las infecciones. Sin embargo, este mecanismo es explotado por patógenos para evitar su eliminación, dando lugar a infecciones crónicas (O'Garra y Vieira, 2007; Trinchieri, 2007). Muchos de los efectos de IL-10 sobre células T y sobre el funcionamiento de células NK son mediados a través de un efecto directo sobre monocitos-macrófagos. Así, IL-10 inhibe la expresión de MHC clase II y la molécula coestimuladora B7-1/B7-2 sobre monocitos y macrófagos y limita la producción de citoquinas proinflamatorias (incluyendo IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 y TNF- $\alpha$ ) y quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1), RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), IL-8, la proteína-10 inducida por IFN- $\gamma$  (IP-10) y la proteína inflamatoria de macrófagos tipo 2 (MIP-2) (Moore y col., 2001). IL-10 puede actuar directamente sobre células T CD4 $^+$ , inhibiendo la proliferación y la producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 y TNF- $\alpha$  (Gospodarowicz y col., 1978; Tsopanoglou y Maragoudakis, 1999; Moore y col., 2001). De este modo, IL-10 puede regular directamente las respuestas innata y adaptativa  $T_H1$  y  $T_H2$  limitando la activación de células T y la diferenciación en los ganglios linfáticos, así como la supresión de respuestas proinflamatorias en los tejidos, dando lugar a la alteración del control de patógenos y/o la reducción de la inmunopatología (Naldini y col., 2005).

### **IFN- $\gamma$**

El IFN- $\gamma$  o interferón inmune tipo II es producido por linfocitos T CD4 $^+$ , CD8 $^+$ , células T $\gamma/\delta$ , así como por células NK en respuesta a algún estímulo

inflamatorio. El IFN- $\gamma$  no comparte receptores con los interferones de tipo I y su estructura proteica es distinta (Boehm y col., 1997; Pestka y col., 2004).

El gen que codifica al IFN- $\gamma$  humano está constituido por cuatro exones y tres intrones, y se localiza en el cromosoma 12 humano (Gray y Goeddel, 1983). La forma biológicamente activa del IFN- $\gamma$  es como homodímero estabilizado por fuerzas no covalentes, con subunidades de 143 aminoácidos (aa) en el humano (17.1kDa) (Gray y Goeddel, 1983).

La actividad biológica del IFN- $\gamma$  es mediada por un receptor específico, este receptor de IFN- $\gamma$  o de tipo II, se expresa en todas las células con excepción de los eritrocitos maduros y es especie-específico en la capacidad de unión a su ligando (Novick y col., 1987; Aguet y Merlin, 1987).

El IFN- $\gamma$  potencia la transcripción de varios genes involucrados en actividades inmunomoduladoras, antivirales y antiproliferativas (apoptosis) (Pestka y col., 2004). El IFN- $\gamma$  como molécula inmunomoduladora es muy pleiotrópica, éste tiene la capacidad de aumentar la actividad citotóxica y fagocítica de los macrófagos, también induce la expresión de moléculas del MHC clase I y II en las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, incrementa el desarrollo y diferenciación de las células T<sub>H</sub>1, regula la respuesta humoral induciendo la producción de IgG2a e IgG3 por las células B maduras, promueve la actividad citotóxica de los linfocitos T, de las células NK y las células killer activadas por linfocinas (LAK), además regula la producción de citoquinas proinflamatorias. (Farrar y Schreiber, 1993; Boehm y col., 1997; Bach y col., 1997). El IFN- $\gamma$  induce la sobreexpresión de citoquinas pro inflamatorias como IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , IP-10, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), caspasa-1 y gp91 phox,

además induce la activación de factores de transcripción pro inflamatorios como el NFκB (Mühl y Pfeilschifter, 2003).

La protección inmunológica contra bacterias y parásitos intracelulares depende de la inmunidad mediada por células. El IFN-γ activa principalmente a los macrófagos que a su vez lisan o restringen el crecimiento de patógenos intracelulares (Boehm y col., 1997).

### **1.2.2.2. Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa recibe su nombre debido a que aparece como respuesta a una infección y se adapta a ella. Sus características definitorias son una exquisita especificidad frente a diversos patógenos (microbianos y no microbianos) y la propiedad de “recordar” las exposiciones repetidas al mismo patógeno, propiedad conocida como memoria inmunitaria. La inmunidad adaptativa le sigue a la inmunidad innata proporcionando una supresión mucho más eficiente y a largo plazo de los agentes patógenos (Li y Huang, 2009).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas **inmunidad humoral e inmunidad celular**, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar agentes patógenos de distintos tipos. Las principales células del sistema inmunitario adaptativo son los linfocitos, las células presentadoras de antígenos y las células efectoras (Abbas y col., 2008).

Existen distintas subpoblaciones de linfocitos que difieren en la forma de reconocer los antígenos y en sus funciones:

- **Linfocitos B:** Se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (inmunoglobulinas) que reconocen los antígenos extracelulares, por lo que actúan como mediadores de la inmunidad humoral (Abbas y col., 2008).
- **Linfocitos T:** son los mediadores de la inmunidad celular, reconocen los antígenos de los microorganismos intracelulares capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. De esta manera, son capaces de inducir la destrucción del microorganismo residente en los fagocitos o de las células infectadas. Los linfocitos T presentan una especificidad restringida hacia los antígenos, no reconocen más que los de tipo peptídico, una vez que los antígenos son degradados dentro de las células, sus fragmentos péptidos son captados por moléculas del MHC, y este complejo se despliega en la superficie celular (Abbas y col., 2008). Los linfocitos T constan de distintas poblaciones desde el punto de vista funcional; las que están mejor caracterizadas son:
  - **Linfocitos T cooperadores (Helper; T<sub>H</sub>) CD4<sup>+</sup>:** segregan citoquinas, cuyas funciones consisten en poner en marcha la proliferación y la diferenciación de los propios linfocitos T y activar diversas células, como los linfocitos B, los macrófagos y otros leucocitos. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se pueden diferenciar en subpoblaciones de linfocitos efectores (Abbas y col., 2008).
    - **Linfocitos T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2:** son las subpoblaciones mejor definidas de linfocitos T efectores del linaje cooperador CD4<sup>+</sup>, estas

subpoblaciones se distinguen fundamentalmente por las citoquinas que sintetizan, las cuales no sólo determinan sus funciones efectoras, sino que también participan en el desarrollo y la expansión de las subpoblaciones respectivas, regulando a su vez de forma cruzada a la subpoblación recíproca. El IFN- $\gamma$  es la citoquina característica de los linfocitos  $T_H1$ , y la IL-4 y la IL-5 son las citoquinas definitorias de los linfocitos  $T_H2$ . Las proporciones relativas de estas subpoblaciones inducidas durante una respuesta inmunitaria son los principales determinantes de las funciones protectoras y de las consecuencias patológicas de la respuesta. **La principal función de los linfocitos  $T_H1$**  es la defensa mediada por los fagocitos contra las infecciones, especialmente por microorganismos intracelulares. Mientras que, **la principal función efectora de los linfocitos  $T_H2$**  es favorecer las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y eosinófilos/mastocitos, que son protectoras frente a las infecciones por helmintos. Las respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos  $T_H2$  son la causa subyacente de las reacciones alérgicas, y pueden interferir con las respuestas inmunitarias protectoras mediadas por los linfocitos  $T_H1$  frente a las infecciones intracelulares (Abbas y col., 2008).

- **Linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$  (LTC):** destruyen las células productoras de antígenos extraños, como las que están infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares (Abbas y col., 2008).

### 1.3. Trombina y sistema inmunitario

Además de su papel reconocido en la hemostasia, numerosas evidencias demuestran que la trombina desempeña múltiples roles en: inflamación, alergia, crecimiento tumoral, metástasis, remodelación tisular, angiogénesis, permeabilidad de células endoteliales, vasoregulación, regulación génica, tráfico de leucocitos, inmunomodulación y cicatrización de heridas (Coughlin, 2000; Cirinoy col., 2000; Macfarlane y col., 2001; Coughlin, 2001).

La trombina es una enzima altamente pleiotrópica siendo capaz de ejercer sus efectos sobre: plaquetas, células endoteliales, células del músculo liso vascular, monocitos, linfocitos T, células NK y fibroblastos, encontrándose vinculada en procesos inflamatorios e infecciosos en el organismo (Siller-Matula y col., 2011).

Muchas de las acciones celulares de la trombina han sido atribuidas a la activación de tres de los cuatro receptores de la familia de receptores activados por proteasas (PARs), específicamente de PAR1, PAR3 y PAR4 (Steinhoff y col., 2005), los cuales son una familia de receptores acoplados a proteínas G dispuestos en la superficie celular de diversos tipos celulares (Cunningham y col., 2000; Sambrano y col., 2001; Chin y col., 2003). PAR1 es el miembro más abundante de la familia de los PARs en los linfocitos. Las células NK expresan PAR1, PAR2 y PAR3; las células T CD4<sup>+</sup> expresan PAR1 y PAR2, mientras que las células T γδ y CD8<sup>+</sup> sólo expresan PAR1. Las células B no expresan ningún PAR (López y col, 2014).

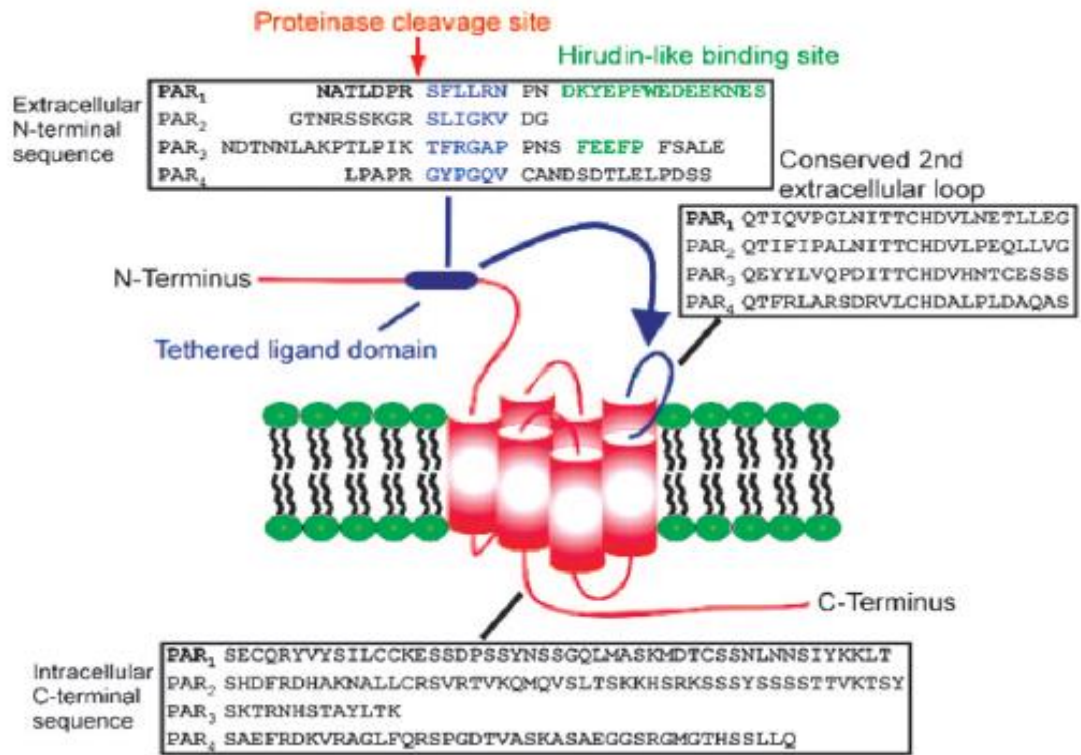
#### 1.4. PARs

Los PARs son una subclase única de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana que se activan mediante la escisión proteolítica de su extremo N-terminal extracelular por la acción de proteasas (Macfarlane y col., 2001; Hollenberg y Compton, 2002). Se conocen como receptores acoplados a proteínas G debido a que sus vías de transducción de señales activan proteínas de unión a trifosfato de guanosina (GTP) (proteínas G) (Abbas y col., 2008).

Los PARs son activados por un mecanismo único: las proteasas activan los receptores mediante la escisión proteolítica del extremo N-terminal extracelular de sus receptores, exponiendo de este modo una nueva secuencia N-terminal activadora del receptor, conocida como “ligando atado”. Dicha secuencia se une al segundo bucle extracelular del receptor y lo activa (Vu y col., 1991; Nystedt y col., 1995) (Figura 6).

La activación del receptor produce cambios conformacionales que favorecen su interacción con proteínas G triméricas. En estado inactivo una subunidad  $G\alpha$  está unida a difosfato de guanosina (GDP) y a las subunidades  $G\beta\gamma$ . La activación de PARs induce un cambio conformacional en estas proteínas G que conlleva el intercambio de GDP por GTP, seguido de la fosforilación del receptor y separación de la subunidad  $G\alpha$  del complejo dimérico  $G\beta\gamma$ , desencadenando la compleja cascada de señalización, específica según el tipo de célula. Estos receptores son inactivados mediante la fosforilación en diversas posiciones de su extremo C-terminal intracelular y a su vez, mediante el desacoplamiento de las proteínas G. Preferentemente, son internalizados en

lisosomas, donde son degradados con alta eficacia, sin ser reciclados a la superficie celular (Coughlin, 2000; Macfarlane y col., 2001). La disponibilidad de PARs en la superficie celular está gobernada por la movilización de estos receptores a partir de depósitos intracelulares (Macfarlane y col., 2001).



**Figura 6.** Mecanismo de activación de los PARs. La proteasa de serina escinde al receptor en un sitio específico (marcado por la flecha roja) y expone una nueva secuencia N-terminal extracelular activadora del receptor, conocida como "ligando atado" (presentada en azul). Dicho "ligando atado" interactúa con el segundo bucle extracelular conservado y activa al receptor. Las secuencias del extremo N-terminal, incluyendo el ligando atado, del segundo bucle extracelular y del extremo C-terminal intracelular se muestran en los recuadros. Las secuencias de los dominios de unión similares a la hirudina para PAR<sub>1</sub> y PAR<sub>3</sub> están marcadas en verde (Tomado de Steinhoff y col., 2005).

Por otra parte, PAR<sub>1</sub>, PAR<sub>2</sub> y PAR<sub>4</sub> pueden ser activados sin sufrir escisión proteolítica mediante péptidos sintéticos cortos o péptidos agonistas (APs, del

inglés activating peptides) diseñados en base a la secuencia de sus ligandos atados (Macfarlane y col., 2001; Déry y col., 1998; Hollenberg y Compton, 2002).

## **2. ANTECEDENTES**

En el año 2005, Naldini y colaboradores reportaron que la  $\alpha$ -trombina humana y el péptido agonista de PAR1, SFLLRN, mejoran significativamente la expresión de IL-10 en PBMCs humano, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, en presencia o ausencia de activadores específicos de células mononucleares, como fitohemaglutinina (PHA), lipopolisacárido (LPS) y anti-CD3/-CD28. Demostraron a través de ensayos ELISA que, el efecto de la trombina sobre la producción de IL-10 a nivel de proteína es tiempo y dosis dependiente, al comparar los resultados de expresión de PBMCs estimulados con 150nM de trombina a las 6, 16, 24 y 40 horas de incubación, definiendo las 16 horas como tiempo mínimo necesario para observar dicho efecto. Por su parte, las células fueron incubadas con 6, 30, 150 y 300nM de trombina resultando 30nM de trombina suficiente para aumentar significativamente la liberación de IL-10 pasadas las 16 horas. A su vez demostraron que, tal regulación requiere de trombina con actividad proteolítica ya que al emplear DIP-trombina (enzima inactiva proteolíticamente) no se evidenció una mejora en la producción de IL-10. También estimularon las células con 40 $\mu$ M del péptido agonista de PAR1 y evidenciaron un incremento en la producción de IL-10 similar al efecto observado con 150nM de trombina. Con el fin de corroborar si el efecto de la trombina sobre la producción de IL-10 era mediado vía PAR1 decidieron evaluar la expresión a nivel de ARNm. Trombina y el péptido agonista resultaron capaces de mejorar la

expresión de ARNm. La expresión de ARNm fue evaluada mediante un ensayo de protección de RNasa (RPA, del inglés RNase protection assay) en PBMCs en reposo y activadas por PHA o LPS. Naldini y colaboradores demostraron también que la producción de IL-10 inducida por trombina en PBMCs humano, requiere la expresión de PAR1 por oligodesoxirribonucleótidos (ODN) antisentido y sentido específicos de PAR1 (Naldini y col., 2005).

Un año más tarde, 2006, Naldini y colaboradores, continuando sus estudios en PBMCs aislados de sangre humana, demostraron que la  $\alpha$ -trombina humana y el péptido agonista de PAR1, SFLLRN, reducen significativamente la expresión tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína del IFN- $\gamma$ . Demostraron mediante ensayos ELISA que la trombina provoca una inhibición tiempo y dosis dependiente de la liberación de IFN- $\gamma$  inducida por la PHA, a nivel de proteína. Determinaron mediante RPA, que dicha inhibición requiere trombina con actividad proteolítica. A su vez, Naldini y colaboradores también investigaron el rol de IL-10 en la reducción de IFN- $\gamma$  inducida por trombina en PBMCs estimulados con PHA o por la combinación de anticuerpos anti-CD3/anti-CD8, en ausencia o presencia de anti-IL-10 encontrando a través de ensayos ELISA una inhibición significativa en la producción de IFN- $\gamma$  por PBMCs en ausencia de anti-IL-10, pero un efecto totalmente contrario en presencia de anti-IL-10, concluyendo que el efecto inhibidor de trombina en IFN- $\gamma$  está mediado a través de IL-10. Reportaron también que la trombina regula el balance de citoquinas  $T_H1/T_H2$ , encontrando mediante ensayos ELISA que la reducción de IFN- $\gamma$  (perfil  $T_H1$ ) está acompañada de la regulación negativa de IL-12 (perfil  $T_H1$ ), de un incremento en la liberación de

IL-4 (perfil T<sub>H</sub>2), así como por un aumento en la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 (Naldini y col., 2006).

En el año 2014, el grupo de investigación que dirige el presente proyecto reveló que PAR1 es el miembro más abundante de la familia de los PARs en los linfocitos. Encontrando que las células NK expresan PAR1, PAR2 y PAR3; los linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresan PAR1 y PAR2, mientras que los linfocitos T  $\gamma\delta$  y CD8<sup>+</sup> sólo expresan PAR1. Las células B no expresan ningún PAR (López y col., 2014). Para llegar a dicha conclusión, evaluaron la expresión de PARs a nivel de ARNm. Realizaron para ello una transcripción reversa (RT-PCR), partiendo de ARN total en presencia de primers específicos para PARs. Evaluaron también la expresión de PARs en la superficie celular mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos, y obtuvieron resultados consistentes. A su vez, este grupo de investigación evaluó mediante experimentos de microarreglos (datos no publicados), la expresión genética de células NK no estimuladas incubadas con trombina, identificando una regulación negativa en la expresión del gen que codifica para el IFN- $\gamma$ . Partiendo de estos hallazgos, en este trabajo de investigación se ha planteado demostrar a través de distintos enfoques, si la trombina es capaz de alterar la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-10 en las células NK aisladas de sangre periférica humana, estimuladas por IL-2/IL-12.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las células NK forman parte importante de los mecanismos efectores de la inmunidad innata, contribuyendo activamente al control de las células tumorales y de las infectadas con microorganismos intracelulares. La trombina, además ser una proteasa importante en la hemostasia, también desempeña múltiples roles en: inflamación, alergia, crecimiento tumoral, metástasis, remodelación tisular y cicatrización de heridas.

La trombina es capaz de activar receptores PARs, específicamente PAR1, PAR3 y PAR4. Las células NK expresan PAR1, PAR2 y PAR3. Sin embargo, no se tiene información sobre los efectos de esta enzima sobre las células NK aisladas de sangre humana. Por esta razón, el objetivo del proyecto es comprobar el efecto de la trombina sobre células NK estimuladas, tomando en cuenta que en estudios de microarreglos realizados por el grupo de investigación que dirige el presente proyecto se encontró una regulación negativa inducida por la trombina en la expresión del gen que codifica para el IFN- $\gamma$  en células NK no estimuladas. Estos datos parecen indicar que la trombina afecta la respuesta efectora de las células NK. Esto podría explicar al menos en parte, el efecto descrito en la literatura sobre el efecto beneficioso de los inhibidores de trombina al controlar el crecimiento de tumores. En un futuro, el estudio de la relación entre la trombina y las células NK podría tener implicaciones terapéuticas, ya que de confirmarse que la trombina afecta la respuesta efectora de las células NK, sería interesante investigar si al controlar la actividad de esta enzima, mediante la aplicación de anticoagulantes, o específicamente, inhibidores de trombina, es posible mejorar

cuadros infecciosos por virus o bacterias e incluso, controlar el desarrollo de tumores.

#### **4. OBJETIVOS**

##### **Objetivo General:**

- Estudiar el efecto de la trombina en la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-10 por células Natural Killer (NK) estimuladas por IL-2/IL-12.

##### **Objetivos Específicos:**

1. Aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humana.
2. Aislar y purificar células NK a partir de PBMCs.
3. Estudiar la viabilidad de las células NK tras su aislamiento y purificación.
4. Determinar la pureza de las preparaciones de células NK.
5. Estandarizar las condiciones de cultivo y estimulación de las células NK con respecto a las concentraciones de IL-2 empleadas y al tiempo de incubación con trombina.
6. Cuantificar la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-10 a nivel de transcripción en células NK estimuladas por IL-2/IL-12 en presencia y ausencia de trombina.

## 5. MATERIALES

### 5.1. Reactivos

Azul de tripano [C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>]

Coctel RosetteSep (STEMCELL Technologies)

Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Life Sciences)

IL-12 Recombinante Humana (p70) (Biolegend- Cat.#573002)

IL-2 Recombinante Humana (Biolegend- Cat.#589104)

Kit Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix (Thermo Scientific).

Kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems)

Kit RNeasy Mini (Qiagen)

Buffer Fosfato Salino

Primers específicos para: β-actina, IFN-γ e IL-10 (Integrated DNA Technologies)

Suero Fetal Bovino (ATCC)

α-Trombina Humana (Enzyme Research Laboratories- Cat.# 1002a HT)

β-Mercaptoetanol [C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS]

### 5.2. Medio de cultivo

Medio RPMI 1640 (STEMCELL Technologies) suplementado con:

-Penicilina-Estreptomicina (Sigma Aldrich)

-Solución L-Glutamina (Sigma Aldrich)

### 5.3. Anticuerpos

- Anticuerpo monoclonal **anti-CD3** humano IgG<sub>1</sub>K, hecho en ratón y conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína [Anti-CD3-FITC (Bioscience)].

- Anticuerpo monoclonal **anti-CD19** humano IgG<sub>1</sub>K, hecho en ratón y conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína [Anti-CD19-FITC (Bioscience)].

- Anticuerpo monoclonal **anti-CD16** humano, IgG<sub>1κ</sub>, hecho en ratón y conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína [Anti-CD16-FITC (Bioscience)].
- Anticuerpo monoclonal **anti-CD14** humano IgG<sub>2aκ</sub>, hecho en ratón y conjugado a Ficoeritrina [Anti-CD14-PE (Bioscience)].
- Anticuerpo monoclonal **anti-CD56** humano IgG<sub>1κ</sub>, hecho en ratón y conjugado a Ficoeritrina Cianina 5 [Anti-CD56-PE Cy5 (Bioscience)].
- Anticuerpo monoclonal, **isotipo IgG<sub>1κ</sub>**, hecho en ratón y conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína [Isotipo (Bioscience)]
- Anticuerpo monoclonal, **isotipo IgG<sub>2aκ</sub>**, hecho en ratón y conjugado a Ficoeritrina [Isotipo (Bioscience)].
- Anticuerpo monoclonal, **isotipo IgG<sub>1κ</sub>**, hecho en ratón y conjugado a Ficoeritrina Cianina 5 [Isotipo (Bioscience)].

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Aislamiento de PBMCs y eritrocitos

El material de estudio fue donado por El Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital en forma de concentrado sanguíneo enriquecido en glóbulos blancos (buffy coats). El concentrado se centrifugó sobre un volumen de Ficoll-Paque™ Plus (proporción 2:1 sangre:ficoll) durante 30 minutos a 800 g, sin freno a temperatura ambiente (15-25°C). Posteriormente se procedió a recuperar la interfaz de color blanco constituida por las PBMCs y a su vez, los glóbulos rojos o RBCs (por red blood cells) que quedan sedimentados al fondo del tubo. Las PBMCs fueron lavadas dos veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) suplementado al 2 % con Suero Fetal Bovino (SFB) centrifugando a 600 g por 10 minutos con

freno. Las RBCs fueron lavadas con PBS suplementado al 2 % SFB y se centrifugaron a 900 g durante 8 minutos, sin freno. De cada muestra se tomó una alícuota de 40  $\mu$ L y se determinó el número de células por el analizador hematológico automatizado Drew-3 (Drew Scientific Group).

## **6.2. Ensayo de adherencia de las PBMCs**

Con el fin de eliminar a los monocitos, las PBMCs se incubaron en placas de plástico estériles a una concentración final de  $2 \times 10^6$  cél/mL bajo una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 1 hora en medio RPMI 1640 suplementado con 2mM de L-Glutamina, 1X penicilina-estreptomicina y 1 % SFB. Terminada la incubación se recolectaron las células no adherentes, enriquecidas en linfocitos de sangre periférica (PBL, por peripheral blood lymphocytes) y se lavaron con PBS suplementado con 2% de SFB centrifugando a 600 g por 10 minutos con freno. El sedimento se resuspendió en PBS 2% SFB y se tomó una alícuota de 40  $\mu$ L para determinar el número de células por el analizador hematológico automatizado.

## **6.3. Purificación de células NK.**

Las células obtenidas se mezclaron en una proporción RBCs: PBLs de 50:1. A la mezcla obtenida se le adicionó un determinado volumen del coctel RosetteSep (coctel de inmunoselección negativa de células NK humanas) siguiendo las indicaciones del fabricante y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). La muestra se diluyó con un volumen equivalente de PBS suplementado con 1% SFB. La solución obtenida se colocó sobre un volumen de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus a una proporción 2:1 (sangre:ficoll) y se procedió a centrifugar a 1200 g durante 20 minutos, sin freno a temperatura ambiente. Posteriormente, se recolectó la interfaz de color blanco enriquecida en

células NK. Se realizaron 2 lavados sucesivos de las células obtenidas, para ello se agregó un volumen de PBS suplementado con 1 % SFB y se centrifugó a 800 g por 10 minutos con freno. El sedimento obtenido se resuspendió en 2 mL de PBS 1% SFB, se tomó una alícuota de 40  $\mu$ L y se determinó el número de células por el analizador hematológico automatizado.

#### **6.4. Caracterización fenotípica inicial y determinación de pureza de las NK**

Una vez aisladas las células NK, se tomó una alícuota y se realizó la caracterización fenotípica inicial y evaluación de la pureza, para ello las células se distribuyeron a razón de  $2 \times 10^5$  células por cada marcaje a realizar. Con el fin de determinar la expresión en la superficie celular de las moléculas CD que caracterizan a las células NK y descartar la presencia de otras células mononucleares se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD3 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (anti-CD3-FITC)/ anti-CD14 conjugado a ficoeritrina (anti-CD14-PE) (marcaje simultáneo), anti-CD16-FITC/ anti-CD56 conjugado a ficoeritrina cianina 5 (anti-CD56-PE Cy5) (marcaje simultáneo). Se evaluó a su vez un control de autofluorescencia y los isotipos: IgG<sub>1, $\kappa$</sub>  FITC; IgG<sub>2a, $\kappa$</sub>  PE e IgG<sub>1, $\kappa$</sub>  PE Cy5.

Las células se incubaron con 5  $\mu$ L de cada anticuerpo durante 20 minutos en frío (4 - 8°C) y protegidas de la luz. Luego se lavaron con PBS-SFB 1% y se centrifugaron a 360 g durante 10 minutos. Al finalizar el lavado, se resuspendió el botón celular en PBS, se transfirió el volumen a los tubos de citometría y se realizó la lectura en el citómetro de flujo (BD FACSCalibur). Para evaluar la pureza de la suspensión de células NK se evaluó la expresión de los antígenos CD16 y CD56

en un diagrama de puntos, el porcentaje de células que expresaron uno o ambos antígenos permitió determinar el porcentaje de pureza.

### **6.5. Condiciones de cultivo de las células NK**

Las células NK fueron incubadas en medio medio RPMI 1640 (con 2mM de L-Glutamina y 1X penicilina-estreptomicina) libre de suero, en placas de cultivo de doce pozos a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL por pozo bajo una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C en presencia o ausencia de 10 U/mL de trombina. Una hora más tarde, se agregó a todos los pozos SFB al 1% y se incubó por 1 ó 17 horas adicionales. Luego, se realizó la estimulación de las células con 6, 30 ó 60 ng/mL de IL-2 y 10 U/mL de IL-12 durante 4 horas. Posteriormente, las células fueron colectadas por centrifugación a 350g por 15 minutos. El sedimento obtenido fue almacenado a -80°C para analizar posteriormente.

### **6.6. Determinación de la viabilidad celular**

La viabilidad de las células NK se determinó por el método de exclusión del azul de tripano empleando una cámara de Neubauer.

Para llevar a cabo la técnica, se realizó una dilución previa 1/5 de la suspensión celular con PBS y seguidamente una dilución 1/2 con azul de tripano, quedando una dilución final 1/10. Luego se tomaron 10 µL de dicha solución y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo bajo el microscopio. La media aritmética de los cuatro recuentos efectuados (cuadros grandes de las esquinas de la cámara de Neubauer) de células vivas (células no coloreadas) multiplicada por el factor de la cámara ( $10^4$ ) y el factor de dilución (10) ofrece la concentración de las células vivas en la muestra (cél/mL). Este mismo procedimiento se realizó para determinar la concentración de células muertas

(células coloreadas de azul) en la muestra. La concentración obtenida multiplicada por el volumen original de la suspensión celular da como resultado el total de células vivas, y muertas respectivamente. El total de células (vivas y muertas) representa el 100% de células en la suspensión celular. El total de células vivas permite determinar el porcentaje de viabilidad celular.

### **6.7. Extracción y purificación de ARN total.**

Para llevar a cabo la extracción del ARN total de las células NK se empleó el Kit RNeasy Mini siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se inició realizando una mezcla de  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) y Buffer RLT, en una proporción 10 $\mu$ L:1mL. Seguidamente, se agregaron 350  $\mu$ L de esta mezcla a cada uno de los eppendorf que contenían las células NK y se procedió a homogeneizar mediante pipeteo. Luego, se agregó a cada homogenato 350  $\mu$ L de etanol 70 % y se mezcló mediante pipeteo. Los 700  $\mu$ L fueron agregados sobre una columna de adsorción porosa previamente identificada. Cada columna se dispuso sobre un tubo colector y se centrifugó a 8000 g por 15 segundos, con freno a temperatura ambiente. El líquido obtenido en los tubos colectores fue descartado. Se realizaron 3 lavados sucesivos, para ello, se inició agregando a cada columna 700  $\mu$ L de buffer RW1 y se centrifugó a 8000 g por 15 segundos, con freno a temperatura ambiente. Los tubos colectores fueron descartados y las columnas se colocaron sobre tubos nuevos. Se agregaron 500  $\mu$ L de buffer RPE y se centrifugó a 8000 g por 15 segundos, con freno a temperatura ambiente. El líquido obtenido en los tubos colectores fue descartado. Se repitió el lavado anterior, pero esta vez se centrifugó por 2 minutos. Los tubos colectores fueron descartados, cada columna se colocó sobre un eppendorf estéril de 1,5 mL y se procedió a eluir el ARN, para

ello, se agregaron 40 µl de agua libre de RNasas a cada columna y se centrifugó 8000 g por 1 minuto a temperatura ambiente, con freno. Finalmente, se determinó la concentración de ARN obtenida y su pureza, mediante espectrofotometría UV (espectrofotómetro BioPhotometer plus eppendorf).

### 6.8. Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante RT-PCR.

Para llevar a cabo la síntesis de ADNc se empleó el kit High Capacity RNA-to-cDNA. Se inició preparando la mezcla de reacción, para ello se mezcló el Buffer RT, Enzyme mix (ambos a una concentración final 1X) y el ARN de las muestras, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se colocaron en el termociclador y se inició la reacción bajo las siguientes condiciones: 37°C por 60 minutos y 95°C por 5 minutos. Finalmente, las muestras se congelaron a -20°C hasta el próximo paso.

### 6.9. PCR en tiempo Real (o qPCR)

La expresión de IFN-γ e IL-10 a nivel de transcripción se evaluó por PCR en tiempo Real, mediante cuantificación relativa empleando β-actina como gen de referencia. Los primers utilizados fueron los siguientes:

**Tabla 1.** Nombres de los genes y secuencias de los primers utilizados para la PCR en tiempo Real.

Gen	Secuencias de los primers	Tamaño del amplicón (pb)
<b>β-actina</b>	5'- AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG -3' (sentido) 5'- TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA -3' (antisentido)	98
<b>IFN-γ</b>	5'- TCC CAT GGG TTG TGT GTT TA -3' (sentido) 5'- AAG CAC CAG GCA TGA AAT CT -3' (antisentido)	198
<b>IL-10</b>	5'- CAT CGA TTT CTT CCC TGT GAA -3' (sentido) 5'- TCT TGG AGC TTA TTA AAG GCA TTC -3' (antisentido)	74

El tamaño de los productos de amplificación se determinó alineando la secuencia de los primers con las bases de datos de secuencias del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) usando la familia de programas de la Herramienta de Búsqueda de Alineación Básica Local (BLAST, por sus siglas en inglés).

Para llevar a cabo este protocolo se empleó el kit Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. Se inició mezclando Master Mix (1X), agua libre de nucleasas, y un par de primers de  $\beta$  actina, IFN- $\gamma$  o IL-10 (a una concentración final de 0,14  $\mu$ M). Una vez diseñado el mapa de siembra se procedió a sembrar en una placa qPCR de 48 pozos: 8  $\mu$ l de la mezcla anterior y 2  $\mu$ l de la muestra de ADNc. Seguidamente, se cubrió la placa con papel parafilm (especial para placas qPCR) y se centrifugó a 130 g por 1 minuto con freno a temperatura ambiente. Se introdujo la placa en el termociclador qPCR (StepOne™ Thermo Scientific) y se procedió a iniciar la reacción bajo las siguientes condiciones:

**1 ciclo:** 95°C por 15 min.

---

**40 ciclos:** 95°C por 15 seg/ 55°C por 30 seg/ 72°C por 30 seg.

---

**1 ciclo:** 95°C por 15 seg/ 60°C por 1 min/ 95°C por 15 seg/ 60°C por 15 seg.

## 6.10. Análisis estadístico

Los valores presentados son la media aritmética  $\pm$  SEM de cinco experimentos independiente realizados por triplicado. La significancia estadística entre las medias se determinó mediante las pruebas no paramétricas de Wilcoxon

Mann-Whitney. Se utilizó el programa InStat (GraphPad Software). Los resultados se consideraron significativos cuando  $P < 0,05$ .

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Aislamiento de PBMCs**

Las PBMCs se aislaron a partir de concentrados de glóbulos blancos (buffy coats) humano, cuyos volúmenes estuvieron comprendidos entre los 45 y 60 mL. El gradiente de centrifugación sobre Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus permitió separar las PBMCs con una contaminación relativamente baja de plaquetas y otros tipos celulares (granulocitos  $< 5\%$ , eritrocitos  $< 10\%$ ), según los resultados arrojados por el analizador hematológico automatizado. Como era de esperar, el número total de células aisladas varió en todos los casos, obteniendo en uno de los ensayos un total de  $118 \times 10^6$  células partiendo de 60 mL de buffy coat.

### **7.2. Aislamiento y purificación de células NK a partir de PBMCs.**

Las PBMCs incluyen linfocitos y monocitos. Los monocitos son células adherentes, mientras que los linfocitos (PBL) son células no adherentes, dicha característica permitió separar estos grupos celulares mediante un ensayo de adherencia. Obteniendo a partir de  $118 \times 10^6$  PBMCs, un total de  $84 \times 10^6$  PBLs. De las cuales se aislaron y purificaron, haciendo uso del coctel de inmunoselección negativa, un total de  $16 \times 10^6$  células NK, con un porcentaje de contaminación por otros tipos celulares despreciable, según los resultados arrojados por el analizador hematológico automatizado.

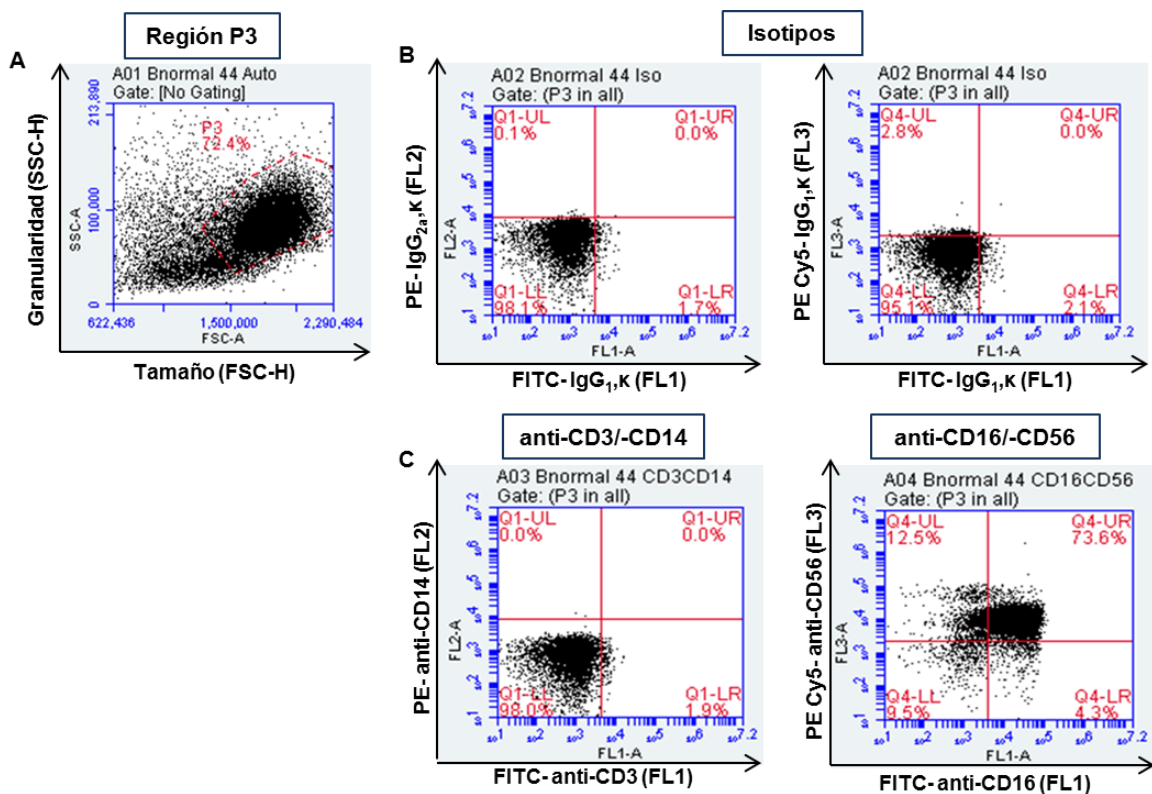
### **7.3. Viabilidad de las células NK tras su aislamiento**

Con el fin de determinar la viabilidad de las células NK, se empleó el método de exclusión del azul de tripano, obteniendo un porcentaje de viabilidad igual o mayor a 90% en todos los casos.

### **7.4. Pureza de las preparaciones de células NK.**

Las células NK se caracterizan fenotípicamente por la expresión en su superficie de las moléculas CD16 y/o CD56. Para determinar la pureza de las preparaciones celulares se realizó un ensayo citométrico donde se evaluó por tanto la expresión de estos antígenos, mediante el reconocimiento específico por los anticuerpos anti-CD16-FITC y anti-CD56-PE Cy5, respectivamente. La expresión de estos antígenos se representó mediante un diagrama de puntos (“dot plot”). En la Figura 7 se muestra un resultado representativo de tres experimentos realizados. El porcentaje de células que expresaron ambos antígenos permitió determinar el porcentaje de pureza, siendo en todos los casos mayor o igual a 90% (Figura 7C, gráfico de la derecha), con una contaminación por otros tipos celulares igual o menor al 10% mediante la expresión de los antígenos CD3 y CD14 respectivamente (Figura 7C, gráfico de la izquierda). La región P3 (Figura 7A) corresponde a la población de células NK, seleccionada de acuerdo al tamaño y granularidad de estas células. La presencia de monocitos en esta población se evaluó por su reacción con un anticuerpo anti-CD14-PE, la de los linfocitos T con un anti-CD3-FITC y la de células NK con un anti-CD16-FITC y un anti-CD56-PE Cy5. Como controles negativos se emplearon los isotipos: IgG<sub>1,κ</sub>-FITC; IgG<sub>2a,κ</sub>-PE e IgG<sub>1,κ</sub>-PE Cy5. Los cuales permitieron definir los límites a partir de los cuales los

marcajes eran positivos (Figura 7B). En la Figura 7C, en el gráfico de la derecha se observa el reconocimiento de los antígenos CD16 y CD56 respectivamente, que caracterizan a las células NK. La doble expresión de los antígenos estuvo presente en el 73,6% de las células, mientras la expresión del antígeno CD56 estuvo presente en el 12,5% de las mismas y la expresión del antígeno CD16 fue solamente de 4,3%. Lo que conlleva a una pureza de 90,4%. A su vez, se observa un 9,5% en el cuadrante inferior izquierdo que corresponde a la población celular contaminante. Sin embargo, este porcentaje no coincide con el porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup> observado en la Figura 7C de la izquierda (1,9%).



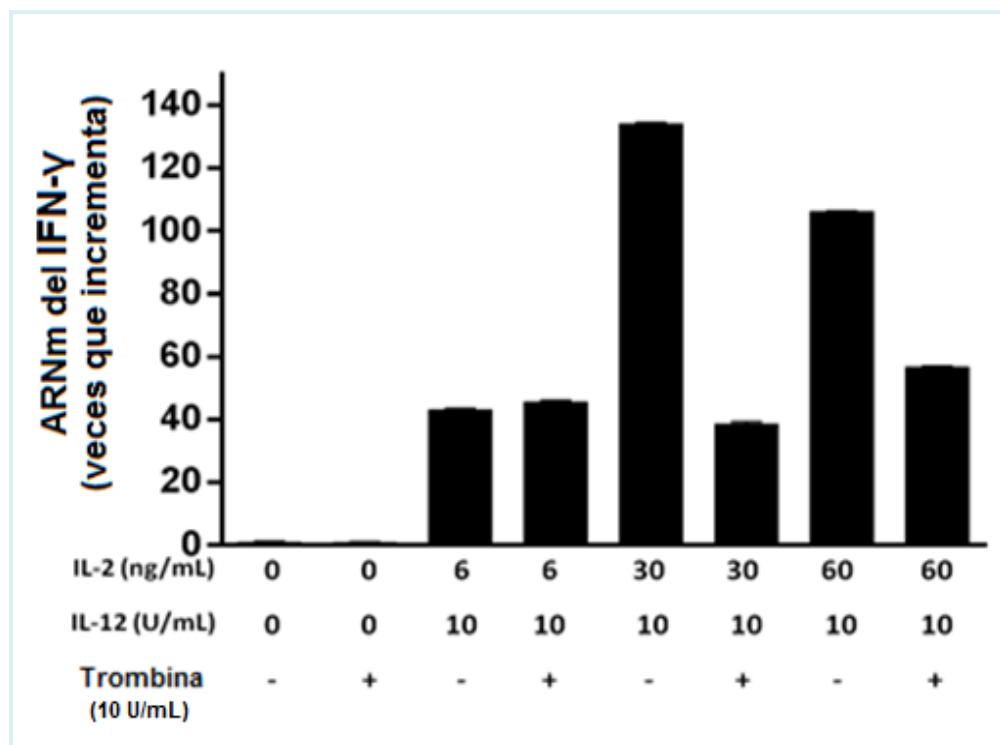
**Figura 7.** Análisis de pureza de células NK por citometría de flujo. A) Región P3: de acuerdo al tamaño (FSC-H) y la granularidad (SSC-H) se seleccionó la población celular a evaluar correspondiente a las células NK. B) Marcaje con Isotipos: se utilizaron anticuerpos del mismo isotipo que los anticuerpos específicos y marcados con el mismo fluorocromo, pero que no reconocen ninguna de las moléculas de la superficie, lo que permitió

establecer los límites a partir de los cuales el reconocimiento de los antígenos era específico. C) Marcaje específico de los antígenos de superficie CD3 y CD14 (gráfico de la izquierda) y CD56 y CD16 (gráfico de la derecha): El cuadrante superior derecho en cada gráfico corresponde a la sección de células con marcaje doble. Los números en cada cuadrante de los gráficos corresponden a los porcentajes de eventos. Resultado representativo de tres experimentos realizados de forma independiente.

## **7.5. Expresión de IFN- $\gamma$ a nivel de ARNm en células NK.**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la trombina sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK evaluamos dos condiciones de incubación: trombina por 2 horas (Figura 8) o 18 horas (Figura 9) previa a la estimulación con las citoquinas (IL-2 e IL-12) durante 4 horas. En ambas condiciones las células fueron incubadas con 10 U/mL de trombina en medio libre de suero, sin embargo, luego de una hora se añadió SFB a una concentración final de 1%. Se evaluaron a su vez, 3 concentraciones diferentes de la IL-2 a 6, 30 y 60 ng/mL, respectivamente, en presencia de una concentración fija de 10 U/mL de la IL-12. Como controles negativos se evaluó la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK no estimuladas en ausencia y presencia de trombina. Las Figuras 8 y 9 muestran un resultado representativo de tres experimentos realizados por triplicado de forma independiente. En la Figura 8 se muestra que la IL-2 (a todas las concentraciones evaluadas) en presencia de la concentración fija de IL-12 (10 U/mL) son capaces de inducir la expresión de IFN- $\gamma$  en las células NK, alcanzándose la máxima expresión al estimular las células con 30 ng/mL de IL-2 (la expresión aumentó aproximadamente 120 veces). Además, la trombina (añadida 2 horas antes de estimulación con IL-2/IL-12) disminuye la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK estimuladas con 30 y 60 ng/mL de IL-2 y 10 U/mL de IL-12 en comparación con

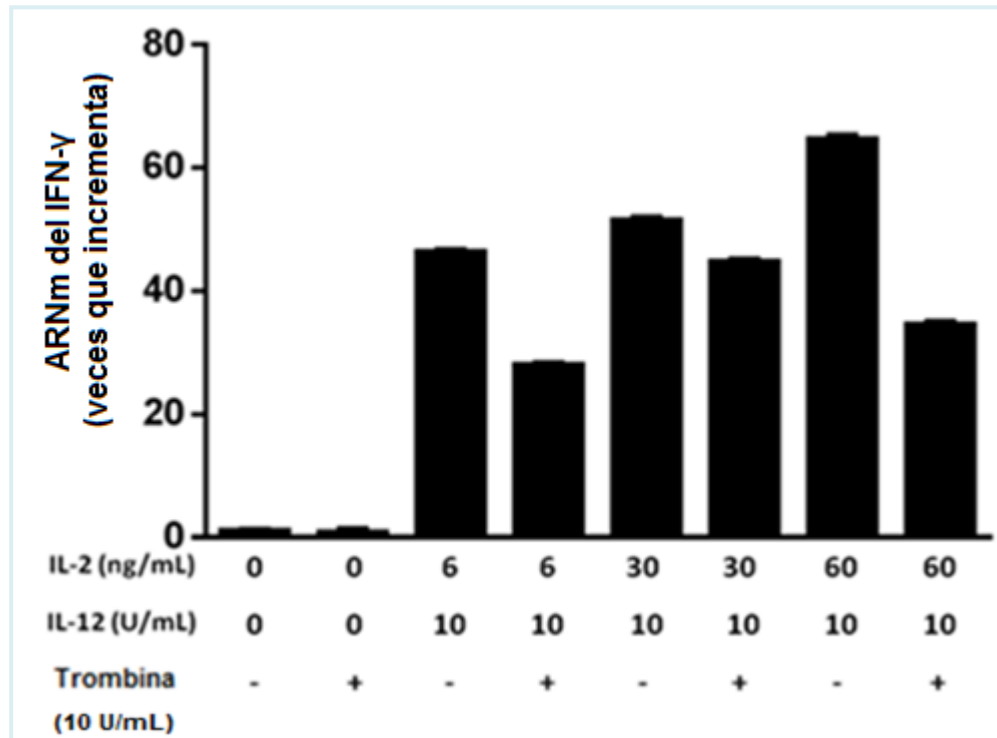
los resultados obtenidos para células estimuladas en ausencia de trombina. El efecto de la trombina no se evidenció al estimular con 6 ng/mL de IL-2.



**Figura 8.** Efecto de la incubación con trombina por 2 horas sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK. Las células NK fueron incubadas en presencia o ausencia de trombina (10 U/mL). Los signos - y + representan ausencia y presencia de trombina, respectivamente. Luego, las células NK fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IL-2 y una concentración fija de 10 U/mL de IL-12 por 4 horas. La expresión del IFN- $\gamma$  se analizó mediante qPCR, empleando  $\beta$ -actina como gen de referencia. Resultado representativo de tres experimentos realizados por triplicado de forma independiente. Se muestra la media aritmética  $\pm$  SEM de los triplicados de un experimento.

Por su parte, en la Figura 9 también se observa una regulación positiva de la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK estimuladas por 4 horas con IL-2 e IL-12. Sin embargo, los valores de expresión de IFN- $\gamma$  son evidentemente menores a los observados en el experimento anterior mostrado en la Figura 8, donde la expresión de IFN- $\gamma$  observada fue aproximadamente 60 veces mayor a la del

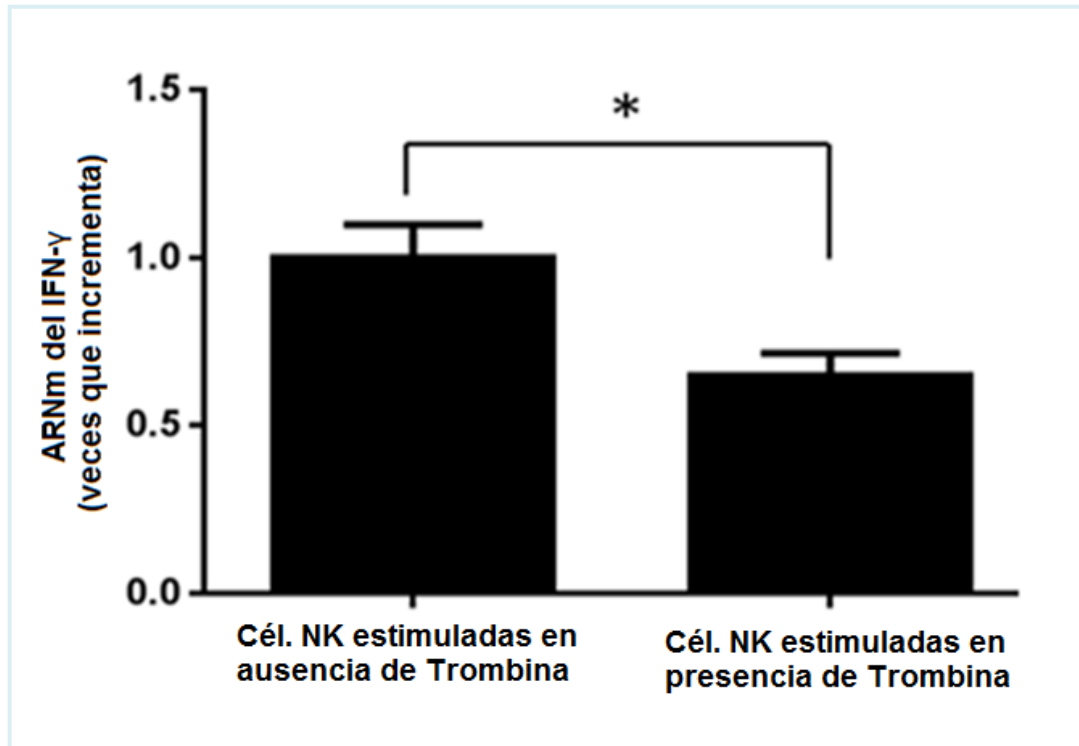
control sin estimular. A su vez, podemos observar que la trombina disminuye la expresión de IFN- $\gamma$  en comparación con los resultados observados para células estimuladas en ausencia de trombina.



**Figura 9.** Efecto de la incubación con trombina por 18 horas sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK. Las células NK fueron incubadas en presencia o ausencia de trombina (10 U/mL). Los signos - y + representan ausencia y presencia, respectivamente. Luego, las células NK fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IL-2 y una concentración fija de 10 U/mL de IL-12 por 4 horas. La expresión del IFN- $\gamma$  se analizó mediante qPCR, empleando  $\beta$ -actina como gen de referencia. Resultado representativo de tres experimentos realizados por triplicado de forma independiente. Se muestra la media aritmética  $\pm$  SEM de los triplicados de un experimento.

Partiendo de estos resultados decidimos evaluar el efecto de la trombina incubando las células NK por 2 horas con 10 U/mL de trombina y posteriormente, estimulándolas con 30 ng/mL de IL-2 y 10 U/mL de IL-12 durante 4 horas.

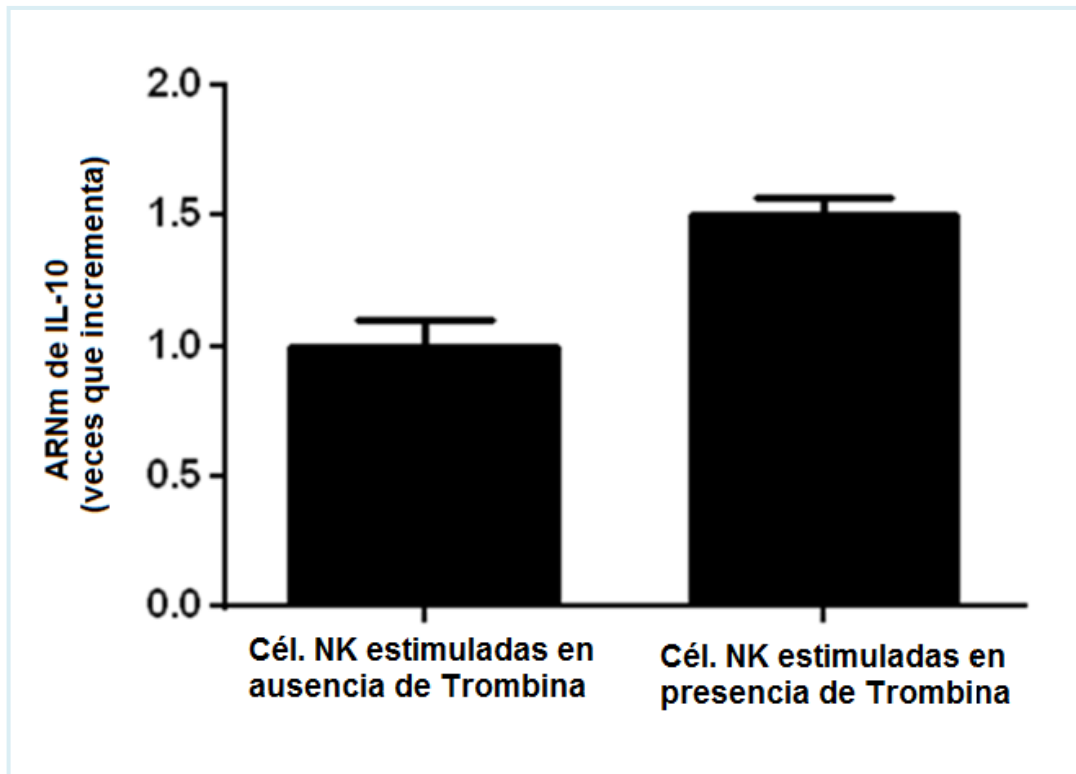
En la Figura 10 se observa que la adición de 10 U/mL de trombina a células NK estimuladas con IL-2/IL-12 reduce significativamente la expresión de IFN- $\gamma$  con respecto al control (células NK estimuladas en ausencia de trombina).



**Figura 10.** La trombina inhibe la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK estimuladas con IL-2 e IL-12. Las células NK fueron incubadas 1 hora en medio RPMI sin suero a 37°C, en presencia o ausencia de trombina (10 U/mL), 1 hora con suero en el medio (1% de SFB y luego estimuladas con IL-2 (30 ng/ml) e IL-12 (10 U/mL) por 4 horas. Se muestra la media aritmética  $\pm$  SEM de cinco experimentos independiente realizados por triplicado. \*P <0,05 según el test de Wilcoxon Mann-Whitney.

### 7.6. Expresión de IL-10 a nivel de ARNm en células NK.

En la Figura 11 se evidencia un aumento en la expresión de IL-10 por células NK estimuladas con IL-2 e IL-12, previamente tratadas con trombina con respecto a las células NK estimuladas en ausencia de trombina, sin embargo, este cambio no fue significativo.



**Figura 11.** Efecto de la trombina sobre la expresión de IL-10 por células NK estimuladas con IL-2 e IL-12. Las células NK fueron incubadas 1 hora en medio RPMI sin suero a 37°C, en presencia o ausencia de trombina (10 U/mL), posteriormente se añadió 1% de SFB en el medio y se incubó durante 1 hora más, para luego ser estimuladas con IL-2 (30 ng/mL) e IL-12 (10 U/mL) por 4 horas. Se muestra la media aritmética  $\pm$  SEM de cinco experimentos independiente realizados por triplicado.

## 8. DISCUSIÓN

Las interacciones entre el sistema inmunitario innato y el sistema de la coagulación sanguínea están bien documentadas (Esmon, 2004). El rol de la trombina en la modulación de citoquinas pro y antiinflamatorias ha sido explorado por diferentes grupos, siendo atribuido a la activación de PARs (Macfarlane y col., 2001; Coughlin y Camerer, 2003), específicamente a la activación de PAR1, PAR3 y PAR4 (Steinhoff y col., 2005). Existen diversos estudios sobre el efecto de la trombina sobre la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs

(Naldini y col., 1993; Naldini y col., 2003; Colognato y col., 2003; Naldini y col., 2005; Naldini y col., 2006), pero no existen reportes sobre el efecto de esta enzima sobre células NK aisladas de sangre periférica.

Las PBMCs están constituidas en un 70-90% por linfocitos y en un 10-30% por monocitos. Las células NK representan el 5-20% de los linfocitos. Nuestros resultados coinciden con estos valores, al obtener  $84 \times 10^6$  linfocitos a partir de  $118 \times 10^6$  PBMCs, lo que representa el 71,19% de las PBMCs. A partir, de los linfocitos purificamos  $16 \times 10^6$  células NK, que representa el 19,05% de estas células. Por otra parte, las células NK se caracterizan por la expresión en su superficie de las moléculas CD16 y/o CD56 y la densidad de expresión de estas moléculas es variable entre las diferentes subpoblaciones de las células NK, lo que permite su clasificación (Taborda y col., 2014). Por esta razón, el porcentaje de pureza obtenido fue resultado de la suma del porcentaje de las subpoblaciones de células NK presentes. Nuestros resultados muestran la presencia de 73,6% células NK CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>; 12,5% de células NK CD16<sup>-</sup> y 4,3% de células CD56<sup>-</sup> (Taborda y col., 2014), lo que da como resultado un 90,4% de pureza. Además, se evidenció la presencia de 9,5% de una población celular contaminante, sin embargo, este porcentaje no coincide con el 1,9% de linfocitos T marcados con el anticuerpo anti-CD3 que reconoce la expresión del marcador CD3. Lo que indica que el 7,6% restante de las células probablemente sean linfocitos B. Dado a que los linfocitos B carecen de receptores PARs, (López y col., 2014); consideramos que la contaminación de nuestra preparación con células B no debe influir en los resultados del presente estudio.

Diversos estudios han demostrado que la IL-2 aumenta la actividad de las células NK, lo que conduce a un aumento de su actividad citotóxica (Henney y col., 1981; Savary y col., 1989) y a la producción de diversas citoquinas tales como el IFN- $\gamma$  (Anegon y col., 1988). De igual modo, la IL-12 regula positivamente tanto la actividad citotóxica de estas células como la producción de IFN- $\gamma$  (Kobayashi y col., 1989; Mehrotra y col., 1995), e incluso la IL-12 mejora sinérgicamente la expresión y producción de la IL-10 en células NK estimuladas con IL-2, así como la producción de IFN- $\gamma$  (Mehrotra y col., 1998). Nuestros resultados muestran que la estimulación de las células NK con distintas concentraciones de IL-2 (6, 30 y 60 ng/mL) en presencia de 10 U/mL de IL-12 induce significativamente la expresión de IFN- $\gamma$  a nivel de ARNm. Sin embargo, el tiempo de incubación previo a la estimulación con las citoquinas parece afectar la función de las células. Recordemos que, evaluamos dos condiciones: 2 horas de incubación y 18 horas de incubación. Al estimular las células NK con 30 ng/mL de IL-2 y 10 U/mL IL-12, luego de 2 horas de incubación previas, se observó un aumento de 120 veces en la expresión de ARNm del IFN- $\gamma$ , mientras que luego de 18 horas de incubación, el aumento de la expresión del ARNm del IFN- $\gamma$  fue solo de 60 veces.

El efecto de la trombina sobre la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-10 se evaluó incubando las células NK con 10 U/mL de esta enzima previo a la estimulación de las células con 30 ng/mL de IL-2 más 10 U/mL de IL-12. Nuestros resultados demuestran que la trombina regula negativamente la expresión del ARNm del IFN $\gamma$  en células NK estimuladas. Se ha reportado que la trombina reduce la expresión de IFN- $\gamma$  a nivel de ARNm en PBMCs estimuladas con PHA (Naldini y

col., 2006). PHA es un activador específico de linfocitos T, por ende, puede inducir en éstos la secreción autocrina de IL-2. La IL-2, por su parte, aumenta la actividad de las células NK y de los linfocitos T induciendo la producción de citoquinas como el IFN- $\gamma$ . Por lo que, consideramos que nuestro resultado es acorde a los reportados por Naldini y colaboradores en el 2006. Por otra parte, nuestros resultados muestran una tendencia de la trombina a regular positivamente la expresión del ARNm de la IL-10, a pesar de que este efecto no fue significativo. El grupo de Naldini y colaboradores en 2005 mostró que la trombina estimula la producción de la IL-10 a nivel de ARNm tanto en PBMCs en reposo como estimuladas con PHA o LPS.

Las citoquinas  $T_H1$  están principalmente involucradas en la inmunidad mediada por células, mientras que las citoquinas  $T_H2$  son responsables de la fuerte respuesta humoral, están involucradas en la inflamación alérgica e inhiben funciones de los macrófagos (Mosmann y Sad, 1996). La regulación negativa de respuestas  $T_H1$  se asocia generalmente a la regulación positiva de respuestas de tipo  $T_H2$  (Fiorentino y col., 1991). Las células NK participan activamente en las respuestas tipo  $T_H1$  mediante la secreción de citoquinas como IFN- $\gamma$ . Las células NK y los macrófagos presentan un mecanismo de retroalimentación positivo. Cuando las células NK son activadas sintetizan IFN- $\gamma$ , éste aumenta la actividad citotóxica y fagocítica de los macrófagos. Los macrófagos en respuesta sintetizan IL-12, la cual activa a las células NK (Abbas y col., 2008). Nuestros resultados representan la primera data obtenida sobre el efecto de la trombina sobre la producción de citoquinas por células NK estimuladas. Estos sugieren que la trombina podría afectar la respuesta efectora de las células NK, mediante la

regulación negativa de la expresión del IFN- $\gamma$  y por ende, también la de los macrófagos, lo que conllevaría a una respuesta inmunitaria innata disminuida, y con esto, menos probabilidades para el hospedador de erradicar infecciones intracelulares o controlar el desarrollo de tumores. Partiendo de esta premisa es posible que se puedan diseñar estrategias terapéuticas, antivirales o antitumorales, al controlar la actividad de esta enzima o la activación de los receptores PARs mediante el uso de antagonistas específicos.

## **9. CONCLUSIONES**

- 1.** El efecto de la estimulación por las citoquinas IL-2 e IL-12 sobre las células NK se ve afectado por el tiempo previo de incubación de las células. La expresión del ARNm del IFN- $\gamma$  fue mayor al someter las células a un periodo de incubación de 2 horas en comparación a la expresión obtenida luego de 18 horas de incubación.
- 2.** La trombina regula negativamente la expresión de IFN- $\gamma$  en células NK estimuladas con IL-2 e IL-12.
- 3.** La trombina tiende a aumentar la expresión de la IL-10 en células NK estimuladas por IL-2 e IL-12, sin embargo, este efecto no fue significativo.
- 4.** La trombina podría afectar la respuesta efectora de las células NK, al regular negativamente la expresión del ARNm del IFN- $\gamma$ , lo que conllevaría a una respuesta inmunitaria innata disminuida, y con esto, menos probabilidades para el hospedador de erradicar infecciones intracelulares o controlar el desarrollo de tumores.

## 10. SUGERENCIAS

Este trabajo muestra los primeros datos acerca del efecto de la trombina sobre las células NK, sin embargo, aún quedan pendientes otros experimentos a fin de:

- Determinar el mecanismo de acción de la trombina sobre las células NK mediante el uso de agonistas y antagonistas de los receptores PARs, específicamente de PAR1 y PAR3 que son los receptores que expresan las células NK y blancos de la trombina.
- Evaluar el efecto de la trombina sobre las células NK en cuanto a la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-10 a nivel de proteínas.
- Estudiar el efecto de la trombina sobre otras funciones de las células NK, tales como; la secreción de otras citoquinas, la actividad citotóxica, etc.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. 2008. *Inmunología Celular y Molecular*. Sexta Edición. Elsevier. Barcelona, España.
- Aguet, M., Merlin, G. 1987. Purification of human  $\gamma$  interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal antireceptor antibodies and human  $\gamma$  interferon. *J Exp Med*. **165**: 988-99.
- Airoidi, I., Guglielmino, R., Carra, G., Corcione, A., Gerosa, F., Taborelli, G., Trinchieri, G. y colaboradores. 2002. The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes. *Haematologica*. **87**: 434–442.
- Anegón, I., Cuturi, M., Trinchieri, G., Perussia, B. 1988. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **167**:452-472.
- Aragane, Y., Riemann, H., Bhardwaj, R., Schwarz, A., Sawada, Y., Yamada, H., Luger, T. y colaboradores. 1994. IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J. Immunol.* **153**: 5366–5372.
- Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A., Trinchieri, G. 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol.* **160**: 5936–5944.
- Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Löhning, M., Bräuer, R., Herz, U., Renz, H. y colaboradores. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature*. **385**: 81–83.
- Bach, E., Aguet, M., Schreiber, R. 1997. The IFN $\gamma$  receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* **15**: 563-91.
- Barrett, A., Rawlings, N., Woessner, J. 1998 *Proteolytic enzymes: nomenclature and classification*. Handbook of proteolytic enzymes. Primera Edición. Editorial Academic Press. New York, E.U.A.

- Beadling, C., Slifka, M. 2006. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **54**:15–24.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. 1997. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol.* **15**: 749-95.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S. y colaboradores. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* **187**: 129–134.
- Bost, K., Ramp, W., Nicholson, N., Bento, J., Marriott, I., Hudson, M. 1999. *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J. Infect. Dis.* **180**: 1912–1920.
- Boyman, O., Surch, C., Sprent, J. 2006. Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **6**:1323-31.
- Brooks C., Henney, C. 1985. Interleukin-2 and regulation of natural killer cell activity in cultured cell populations. *Contemp. Top. Mol. Immunol.* **10**: 63-92.
- Carrega, P., Ferlazzo, G. 2012. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol.* **3**: 1-6.
- Chehimi, J., Trinchieri, G. 1994. Interleukin-12: A bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* **14**:149–161.
- Chin, A., Vergnolle, N., MacNaughton, W., Wallace, J., Hollenberg, M., Buret, A. 2003. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **100**: 11104–11109.
- Cirino, G., Napoli, C., Bucci, M., Cicala, C. 2000. Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *Trends Pharmacol Sci.* **21**: 170–172.
- Collados, M., Borbolla, J., Bojalil, R., De la Rosa, M., Montaña, L. 1996. Protrombina: Estructura y Activación. *BEB.* **15**: 176-180.

- Collison, L., Vignali, D. 2008. Interleukin-35: Odd one out or part of the family? *Immunol. Rev.* **226**: 248–262.
- Colognato, R., Slupsky, J., Jendrach, M., Burysek, L., Syrovets, T., Simmet, T. 2003. Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood.* **102**: 2645–2652.
- Cooper, M., Fehniger, T., Turner S y colaboradores. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood.* **97**: 3146–3151.
- Coughlin, S. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* **407**: 258–264.
- Coughlin, S. 2001. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost.* **86**: 298–307.
- Coughlin, S., Camerer, E. 2003. PARticipation in inflammation. *J. Clin. Invest.* **111**: 25–27.
- Crawley, J., Zanardelli, S., Chion, C y Lane, D. 2007. The central role of thrombin in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **5**: 95-101.
- Cunningham, M., Rondeau, E., Chen, X., Coughlin, S., Holdsworth, S., Tipping, P. 2000. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med.* **191**: 455–462.
- Cuturi, M., Anegón, I., Sherman, F., Loudon, R., Clark, S., Perussia, B., Trinchieri, G. 1989. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **169**:569-583.
- Déry, O., Corvera, C., Steinhoff, M., Bunnett, N. 1998 Proteinase activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol.* **274**: C1429–C1452.
- Di Cera, E. 2011. Thrombin as an anticoagulant. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **99**: 145-184.
- Esmon, C. 2004. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol.* **25**: 536–542.

- Farag, S., Caligiuri, M. 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* **20**: 123-137.
- Farrar, M., Schreiber, R. 1993. The molecular cell biology of interferon-  $\gamma$  and its receptor. *Annu Rev Immunol.* **11**: 571-611.
- Fauci, A., Mavilio, D., Kottlill, S. 2005. NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol.* **5**: 835-843.
- Fiorentino, D., Bond, M., Mosmann, T. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* **170**: 2081–2095.
- Fiorentino, D., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T., Howard, M., Moore, K., O'Garra, A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* **146**: 3444–3451.
- Furie, B., Furie, B.C. 2008. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J Med.* **359**: 938-949.
- Galiani, M., Aguado, E., Tarazona, R., Romero, P., Molina, I. y colaboradores. 1999. Expression of killer inhibitory receptors on cytotoxic cells from HIV-1-infected individuals. *Clin Exp Immunol.* **115**: 472-476.
- Gospodarowicz, D., Brown, K., Birdwell, C., Zetter, B. 1978. Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J. Cell Biol.* **77**: 774–788.
- Gray, P., Goeddel, D. 1983. Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **80**: 5842-6.
- Hall, J., Guyton, A. 2011. *Tratado de Fisiología Médica.* Elsevier, España.
- Hamza, T., Barnett, J., Li, B. 2010. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **11**: 789-806.
- Henney, C., Kuribayashi, K., Kern, D., Gillis, S. 1981. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature.* **291**:335-338.
- Hoffman, M., Monroe, D. 2005. Rethinking the coagulation cascade. *Curr. Hematol. Rep.* **4**: 331-396.

- Hollenberg, M., Compton, S. 2002. International union of pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* **54**: 203–217.
- Jelinek, D., Lipsky, P. 1987. Regulation of human B lymphocyte activation, proliferation and differentiation. *Adv. Immunol.* **40**: 1-59.
- Jones, E., Flavell, R. 2005. Distal enhancer elements transcribe intergenic RNA in the IL-10 family gene cluster. *J. Immunol.* **175**: 7437–7446.
- Kamanaka, M., Kim, S., Wan, Y., Sutterwala, F., Lara-Tejero, M., Galán, J., Harhaj, E. y colaboradores. 2006. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin *tiger* mouse. *Immunity* **25**: 941–952.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R., Clark, S., Chan, S., Loudon, R. y colaboradores. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulation factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 827-845.
- Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Neves, P., Shen, P., Stervbo, U., Boudinot, P. y colaboradores. 2010. Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol. Rev.* **233**: 146–161.
- Lehmann, A., Halstensen, A., Sornes, S., Rokke, O., Waage, A. 1995. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect. Immun.* **63**: 2109–2112.
- Li, M., Huang, S. 2009. Innate immunity, coagulation and placenta-related adverse pregnancy outcomes. *Thrombosis research.* **124**: 656-662.
- López, M., Soriano-Sarabia, N., Bruges, G., Marquez, M., Preissner, K., Schmitz, M., Hackstein, H. 2014. Expression pattern of protease activated receptors in lymphoid cells. *Cellular immunology.* **288**: 47-52.
- Macfarlane, S., Seatter, M., Kanke, T., Hunter, G., Plevin, R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* **53**: 245–282.
- Mackman, N., Tilley, R., Key, N. 2007. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **27**: 1687-93.

- Malek, T. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* **26**:453-79.
- Mann, K., Brummel, K., Butenas, S. 2003. What is all thrombin for? *J. Thromb. Haemost.* **1**: 1504-1514.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E y colaboradores. 2005. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 2886-2891.
- Mehrotra, P., Donnelly, R., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H., Furuke, K. y colaboradores. 1998. Production of IL-10 by Human Natural Killer Cells Stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J. Immunol.* **160**: 2637-2644.
- Mehrotra, P., Grant, A., Siegel, P. 1995. Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. *J. Immunol.* **154**: 5093-5102.
- Merberg, D., Wolf, S., Clark, S. 1992. Sequence similarity between NKSF and the IL 6/G-CSF family. *Immunol. Today.* **13**: 77-78.
- Monroe, D., Roberts, H., Hoffman, M. 1994. Transmission of a procoagulant signal from tissue-bearing cells to platelets. *Br. J. Haematol.* **88**: 364-371.
- Moore, K., De Waal Malefyt, Coffman, R., O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 683-765.
- Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M., Biassoni, R., Moretta, L. 2002. What is a natural killer cell? *Nat Immunol.* **3**: 6-8.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M y colaboradores. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* **19**: 197-223.
- Morgan, D., Ruscetti, F., Gallo, R. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* **193**: 1007-1008.
- Mosmann, T., Sad, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today.* **17**: 138-146.
- Mühl, H., Pfeilschifter, J. 2003. Anti-inflammatory properties of proinflammatory interferon- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol.* **3**: 1247-55.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2008. *Inmunobiología de Janeway*. Séptima Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México.

- Naldini, A., Aarden, L., Pucci, A., Bernini, C., Carraro, F. 2003. Inhibition of interleukin-12 expression by  $\alpha$ -thrombin in human peripheral blood mononuclear cells: a potential mechanism for modulating Th1/Th2 responses. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 980–986.
- Naldini, A., Bernini, C., Pucci, A., Carraro, F. 2005. Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **78**: 736-744.
- Naldini, A., Carney, D., Bocci, V., Klimpel, K., Asuncion, M., Soares, L., Klimpel, G. 1993. Thrombin enhances T cell proliferative responses and cytokine production. *Cell. Immunol.* **147**: 367 377.
- Naldini, A., Morena, E., Filippi, I., Pucci, A., Bucci, M., Cirino, G., Carraro, F. 2006. Thrombin Inhibits IFN- $\gamma$  Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by Promoting a Th2 Profile. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* **26**: 793–799
- Novick, D., Orcnansky, P., Revel, M., Rubinstein, M. 1987. The human interferon-g receptor. *J Biol Chem.* **262**: 8483-7.
- Nystedt, S., Larsson, A., Aberg, H., Sundelin, J. 1995. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem.* **270**: 5950–5955.
- O'Garra, A., Vieira P. 2007. T<sub>H</sub>1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 425–28.
- Oliver, J., Monroe, D., Roberts, H., Hoffman, M. 1999. Thrombin activates factor XI on activated platelets in absence of factor XII. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 170-177.
- Panu, K., Warren, L. 2004. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev.* **202**:67-83.
- Páramo, J., Panizo, E., Pegenaute, C., Lecumberri, R. 2009. Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Rev Med Univ Navarra.* **53**: 19-23.
- Perussia, B., Chen, Y., Loza, M. 2005. Peripheral NK cell phenotypes:multiple changing of faces of an adapting, developingc ell. *Mol Immunol.* **42**: 385–95.

- Pestka, S., Krause, C., Walter, M. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* **202**: 8-32.
- Presky, D., Yang, H., Minetti, L., Chua, A., Nabavi, N., Wu, C., Gately, M. y colaboradores. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 14002–14007.
- Rinderknecht, H. 1986. Activation of pancreatic zymogens: normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanism against inappropriate activation. *Dig. Dis. Sci.* **31**: 314–321.
- Robertson, M., Ritz, J. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* **76**: 2421–38.
- Ross, M., Pawlina, W. 2012. *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.* Editorial Médica Panamericana, Sexta Edición.
- Sambrano, G., Weiss, E., Zheng, Y., Huang, W., Coughlin, S. 2001. Role of thrombin signaling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature.***413**: 74-78.
- Savary, C., Lotzova, E., Klostergaard, J. 1989. Interleukin-2-activated large granular lymphocytes: cytotoxic efficiency and mechanism of killing of tumor cell lines. *Immunol. Lett.* **21**:145-151.
- Segal, B., Dwyer, B., Shevach, E. 1998. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **187**: 537–546.
- Siller-Matula, J., Schwameis, M., Blann, A., Mannhalter, C., Jilma, B. 2011. Thrombin as a multi-functional enzyme. *Thromb Haemost.* **106**: 1020-1033.
- Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P., Rogge, L. 1999. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: A critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol. Rev.* **170**: 65–72.
- Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Shpacovitch, V., Rattenholl, A., Moormann, C., Vergnolle, N., Luger, T. y colaboradores. 2005. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. *Endocr. Rev.* **26**: 1-43.

- Sutherland, M., Friedman, H., Pryzdial, E. 2007. Thrombin enhances herpes simplex virus infection of cells involving protease-activated receptor 1. *J Thromb Haemost.* **5**: 1055-1061.
- Taborda, N., Hernández, J., Montoya, C., Rugeles, M. 2014. Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología.* **33**: 11-20.
- Trinchieri, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* **204**: 239–243.
- Tsopanoglou, N., Maragoudakis, M. 1999. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J. Biol. Chem.* **274**: 23969–23976.
- Vivier, E., Nunes, J., Vely, F. 2004. Natural killer cell signaling pathways. *Science.* **306**: 1517–1519.
- Vu, T., Hung, D., Wheaton, V., Coughlin, S. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* **64**: 1057–1068.
- Walsh, P., Ahmad, S. 2002. Proteases in blood clotting. *Essays Biochem.* **38**: 95–111.
- Warren, S., Kinnea, F., Phillips, J., Lanier, L. 1996. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J. Immunol.* **154**:5144-5152.