

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**ESTUDIO DE REGULACIÓN DE LIGANDOS DE
NKG2D POR INTERLEUQUINA 10 Y SU
ASOCIACIÓN CON CALRETICULINA, EN
TROFOBLASTO Y MELANOMA HUMANO**

TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL GRADO
DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

POR

ANTONIO ENRIQUE SERRANO GÓMEZ

Directores de Tesis:

Dra. María Carmen Molina Sampayo Dr. Juan Carlos Aguilón Gutiérrez

SANTIAGO DE CHILE
2009

A quienes me dieron la vida, y a la Mujer con la que deseo continuarla...

AGRADECIMIENTOS

A María Carmen

A Juan Carlos

A Flavio y Mercedes,

A Evelyn y Marcela

A Macarena y Carolina

A la Dra. Hermoso y al Dr. Ferreira

*A Caroll, Jano, Galia, Carolina Ribeiro, Mónica, Diego, Marisol, Cristián, Claudia,
Paulina, Bárbara, Ismael, Carolina Valck, Enzo, Frano, Rodrigo, Sergio, Norberto, David,
Jaime, Nicole, Alfredo y Roberto*

A Inelia, Oriana, Gilda, Nancy, Juani, Álvaro, Patricio, Félix, Jaime y Don Roli.

Thanks to

*Chen Chiann-mun, Shuo Chen, Thomas A Bowden, Max Crispin, Margaret Jones and
Yvonne Jones*

Acknowledgments

Dr. Norberto Zwirner, Dr Hiro Kataoka, Dr. Marco Clavero López.

CONGRESOS

13th World International Congress of Immunology. Aug, 2007. Río de Janeiro, Brasil.

XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. Nov. 2007. Pucón, Chile.

International Postgraduate Workshop Nov. 2007. Chillán, Chile.

8th International Calreticulin Workshop Jan 2009. Viña Del Mar, Chile.

9th Latin American Congress of Immunology 2009. Viña Del Mar. Chile.

PUBLICACIÓN

IL-10 Decreases MICA Expression on Melanoma Cell Surface

*Antonio E. Serrano, Evelyn Menares-Castillo, Macarena Garrido-Tapia, Carolina J. Hernández, Marcela Gatica-Andrades, Rodrigo Valenzuela-Díaz, Roberto Zúñiga, Mercedes N. López, Flavio Salazar-Onfray, Juan-Carlos Aguillón and María-Carmen Molina
Immunology and Cell Biology. (Revisada).*

FINANCIAMIENTO

Becas Nacionales de Capital Humano Avanzado 2005-2009

Becas de estadías de investigación de la Vicerrectoría Académica de la U. de Chile.

Beca de Estadía en el extranjero para doctorando en tesis. MECESUP UCH 060

Beca de Finalización de Tesis Doctora. Programa MECESUP UCH0606

Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico. FONDECYT 11060452.



ÍNDICE

1.	RESUMEN	8
2.	SUMMARY	9
3.	ABREVIATURAS	10
4.	INTRODUCCIÓN	13
4.1.	RESPUESTA INMUNE	14
4.2.	CÁNCER	15
4.3.	MELANOMA MALIGNO	16
4.4.	TOLERANCIA FETAL	18
4.5.	TOLERANCIA FETAL Y EVASIÓN INMUNE ANTITUMORAL	19
4.6.	CÉLULAS CITOLÍTICAS NATURALES NK (NATURAL KILLER CELLS)	21
4.7.	ACTIVACIÓN, REGULACIÓN Y RECEPTORES DE NK	22
4.8.	NKG2D (NATURAL KILLER GROUP 2, TYPE D)	24
4.9.	LIGANDOS DE NKG2D	25
4.10.	MIC	26
4.11.	NKG2D/NKG2DL EN EVASIÓN INMUNE	27
4.12.	INDUCCIÓN DE NKG2DL	28
4.13.	REGULACIÓN DE NKG2DL	30
4.14.	INTERLEUQUINA 10	31
4.15.	CALRETICULINA	32
5.	HIPÓTESIS	35
6.	OBJETIVOS	36
6.1.	OBJETIVO GENERAL	36
6.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
7.1.	SOLUCIONES GENERALES	37
7.2.	MUESTRAS DE TEJIDO Y CULTIVOS CELULARES	38
7.2.1.	<i>Muestras de placenta humana de abortos espontáneos del primer trimestre</i>	38
7.2.2.	<i>Cultivos Primarios de Células de Trofoblasto</i>	38
7.2.3.	<i>Cultivo Líneas Celulares</i>	39
7.3.	ANÁLISIS DE MICROSCOPIA	39
7.3.1.	<i>Inmunohistoquímica</i>	39
7.3.2.	<i>Inmunofluorescencia de Células de Trofoblasto y Melanoma en Cultivo</i>	41
7.4.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	41
7.4.1.	<i>Inmunoprecipitación</i>	41
7.4.2.	<i>Inmunoelectrotransferencia (Western Blot)</i>	42
7.5.	ANÁLISIS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	43
7.5.1.	<i>ELISA de interacción entre CRT y MICA recombinantes de origen procarionte</i>	43
7.5.2.	<i>Transformación de Bacterias</i>	43
7.5.3.	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa de Colonias de Bacterias Transformadas</i>	44
7.5.4.	<i>Digestión con enzimas de restricción</i>	44
7.5.5.	<i>Ligación de DNA en vector de expresión</i>	45
7.5.6.	<i>Transfección de células eucariontes</i>	45
7.5.7.	<i>Surface Plasmon Resonance BIAcore</i>	45

7.6.	ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN GÉNICA	46
7.6.1.	<i>Extracción de RNA total</i>	46
7.6.2.	<i>Reacción semicuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita (sqRT-PCR)</i>	47
7.6.3.	<i>Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita (qRTPCR)</i>	48
7.7.	ANÁLISIS DE EFECTO DE INTERLEUQUINA 10 POR CITOMETRÍA DE FLUJO. . ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
7.7.1.	<i>Estímulo con Interleuquina-10 (IL-10)</i>	49
7.7.2.	<i>Citometría de Flujo (FACS)</i>	49
7.8.	ANÁLISIS FUNCIONALES	49
7.8.1.	<i>Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)</i>	49
7.8.2.	<i>Enriquecimiento de NK y cultivo de células LAK</i>	50
7.8.3.	<i>Ensayo de liberación de ⁵¹Cr</i>	50
7.8.4.	<i>ELISA para IL-10 Humana en líneas celulares de Melanoma humano</i>	51
7.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
8.	RESULTADOS	52
8.1.	O.E.1: LOCALIZAR MIC EN COMPARTIMENTOS INTRACELULARES DE CÉLULAS DE CITOTROFOBLASTO, COLOCALIZANDO CON PROTEÍNAS CHAPERONAS.	52
8.1.1.	<i>MICA y MICB se expresan en vellosidades coriales de placenta humana provenientes de legrados de abortos de primer trimestre</i>	52
8.1.2.	<i>MICA y MICB se expresan en melanoma maligno</i>	53
8.1.3.	<i>Superposición de chaperonas y MICA/B en el sincitiotrofoblasto temprano de primer trimestre</i>	55
8.1.4.	<i>Superposición de chaperonas y MICA/B en Línea de Melanoma Maligno</i>	56
8.2.	O.E.2: OBTENER LA PROTEÍNA MIC DE CÉLULAS DE TROFOBLASTO Y MELANOMA MALIGNO POR INMUNOPRECIPITACIÓN EN CONJUNTO CON LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS.	58
8.2.1.	<i>MICA co-inmunoprecipita con la molécula chaperona calreticulina en células de melanoma maligno y en trofoblasto temprano</i>	58
8.3.	O.E.3: ESTUDIAR UNIÓN DIRECTA ENTRE MIC Y CALRETICULINA, MEDIANTE ANÁLISIS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	60
8.3.1.	<i>MICA recombinante generado en procarionte y rCRT interactúan directamente</i>	60
8.3.2.	<i>MICA y MICB comparten tres sitios putativos de glicosilación</i>	61
8.3.3.	<i>MICA recombinante generado en célula eucarionte y rCRT no interactuarían directamente</i>	62
8.4.	O.E.4: ESTUDIAR EN UN MODELO DE CULTIVO DE MELANOMA MALIGNO, LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIC POR IL-10	63
8.4.1.	<i>Expresión de NKG2DLs en la superficie de células del melanoma es modulada por la IL-10</i>	63
8.4.2.	<i>Expresión de NKG2DLs es modulada en superficie celular de líneas de melanoma transducidas con gen de IL-10</i>	64
8.4.3.	<i>IL-10 decrece los niveles de mRNA de MICA</i>	67
8.4.4.	<i>IL-10 reduce la lisis de las células del melanoma mediada por NKG2D</i>	69
8.5.	O.E.5: ESTUDIAR EN MODELO DE CULTIVO DE MELANOMA MALIGNO LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CHAPERONAS POR IL-10	71
8.5.1.	<i>IL-10 no afecta la expresión en membrana de CRT, CNX y Erp57</i>	71

9.	DISCUSIÓN	72
9.1.	EXPRESIÓN DE MICA Y MICB EN TROFOBLASTO Y MELANOMA	72
9.2.	LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE MICA Y MICB.....	73
9.3.	INTERACCIÓN MIC Y CRT	75
9.4.	MICA Y MICB	77
9.5.	IL-10	78
9.6.	MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LOS NKG2DL	81
9.7.	PLASTICIDAD DEL NKG2D	82
10.	CONCLUSIONES.....	85
11.	ANEXO	87
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	96

1. RESUMEN

NKG2D (*Natural Killer Group 2, type D*) es un receptor de activación de las células *Natural Killer* de sangre periférica (NK), uterinas (uNK) y TCD8⁺ humanos. Son ligandos de NKG2D (NKG2DL), las proteínas relacionadas con la cadena alfa del complejo principal de histocompatibilidad de clase I A y B (MICA y MICB) y las proteínas de unión a UL16 (ULBPs). Se han descrito variados mecanismos relacionados con la evasión tumoral y con la tolerancia fetal que involucran el control de la síntesis de los NKG2DL, los cuales se expresan principalmente en la superficie de células diana en situaciones de estrés, infección intracelular o transformación maligna. Hay antecedentes que indican que la sobreexpresión de moléculas chaperonas puede alterar el nivel de expresión en la superficie celular de proteínas de membrana, como también algunas citoquinas pueden reducir la expresión de los NKG2DL. Se postula que Calreticulina (CRT) se asocia con las moléculas MICA en células de trofoblasto y en melanoma maligno y que la expresión de los ligandos MICA está influenciada por la Interleuquina 10 (IL-10) en melanoma maligno. Mediante análisis histológicos y microscopía confocal se determinó la superposición de MICA y MICB con calreticulina, calnexina y Erp57. Además, se detectó co-inmunoprecipitación de CRT y MICA. Ambos estudios realizados en cultivos celulares de trofoblasto humano de primer trimestre y en líneas de melanoma maligno humano. Sin embargo no se detectó interacción directa entre CRT-MICA recombinantes mediante análisis de afinidad por BIAcore. Se analizó la expresión de NKG2DL y la relevancia funcional en líneas celulares humanas de melanoma en respuesta al estímulo con Interleuquina 10. Se utilizaron líneas de células malignas del melanoma tratadas con IL-10 para analizar MICA/B mediante qRT-PCR y citometría de flujo. Se demostró que IL-10 disminuye la expresión en la superficie de células de melanoma de MICA, pero no MICB. También se indicó que la regulación de MICA se produce a nivel de mRNA, de forma dosis dependiente tanto de citoquina humana recombinante como de la variante viral de la IL-10. Este estudio reveló además que la disminución la MICA por IL-10 conduce a la reducción de la lisis mediada por células citotóxicas *in vitro*. Esta tesis contribuye al conocimiento de las moléculas responsables del plegamiento y retención intracelular de los NKG2DL, así como al papel de la IL-10 en la expresión de NKG2DL, ambos mecanismos propios de la evasión inmune tumoral y de la tolerancia fetal.

2. SUMMARY

NKG2D (Natural Killer Group 2, type D) is an activating receptor of the peripheral blood natural killer (NK), uterine (uNK) and humans TCD8+ lymphocytes. The NKG2D (NKG2DL) ligands are divided in two families: The proteins related to the alpha chain of major histocompatibility complex class I A and B (MICA and MICB) and the UL16 binding proteins (ULBPs). Various mechanisms related to tumour evasion and foetal tolerance where the control of synthesis of NKG2DL is involved, have been described. NKG2DL are mainly expressed on the surface of target cells under stress, intracellular infection or malignant transformation. Some studies indicate that the overexpression of chaperone molecules may alter the level of cell surface expression of membrane proteins. Also, immunomodulatory cytokines can reduce the expression of NKG2DL. It is believed that Calreticulin (CRT) associates with MICA molecules in trophoblast cells and malignant melanoma, and that the expression of MICA is influenced by IL-10 in malignant melanoma. Using histological analysis and confocal microscopy, the superposition of MICA and MICB with CRT, calnexin and Erp57 was determined. Co-immunoprecipitation of CRT with MICA was also detected. These studies were performed in cell cultures of early first trimester trophoblast and malignant melanoma cell lines. However, no direct interaction between recombinant CRT-MICA by BIAcore affinity analysis was detected. The expression and functional relevance of NKG2DL in human melanoma cell lines in response to stimulation with Interleukin 10 (IL-10) was analysed. Melanoma cell lines treated with IL-10 were used to determine MICA/B by qRT-PCR and flow cytometry. It was demonstrated that IL-10 decreases the cell surface expression of MICA, but not of MICB in melanoma cell lines. It was also indicated that the downregulation of MICA occurred at a mRNA level, and that this effect is dose-dependent of the recombinant human cytokine and the viral variant of IL-10. This study also revealed that the decrease of MICA produced by IL-10 led to the reduction of cytotoxic cell-mediated lyses in vitro. This thesis extends the knowledge on molecules responsible for the folding and intracellular retention of NKG2DL and on the role of IL-10 in the expression of NKG2DL, both mechanisms related to tumour immune evasion and foetal tolerance.

3. ABREVIATURAS

<i>AcMo</i>	: Anticuerpo monoclonal
<i>AcPo</i>	: Anticuerpo policlonal de ratón
<i>ADAM</i>	: Dominio desintegrin y metaloproteinasas
<i>APS</i>	: Persulfato de Amonio
<i>ATM</i>	: Ataxia telangiectasia mutada
<i>ATP</i>	: Adenosín Trifosfato
<i>ATR</i>	: ATM y Rad 3 relacionada
<i>BCRF-1</i>	: Gen de herpesvirus 4 tipo 1
<i>BSA</i>	: Albúmina de suero bovino
<i>CD</i>	: Cluster de diferenciación
<i>cDNA</i>	: DNA codificante
<i>CNX</i>	: Calnexina
<i>CO₂</i>	: Dióxido de carbono
<i>CFRT</i>	: Regulador de la conductancia de la fibrosis quística
<i>CMV</i>	: Citomegalovirus
<i>CSF-1</i>	: Factor de crecimiento de colonias 1
<i>CRT</i>	: Calreticulina
<i>DAPI10</i>	: Proteína de activación de DNAX de 10 KDa
<i>DAPI</i>	: 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidroclorhidro
<i>DC</i>	: Células dendríticas
<i>DEPC</i>	: Dietilpirocarbonato
<i>DMEM-F12</i>	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12</i>
<i>DNA</i>	: Ácido Desoxirribonucleico
<i>dNTPs</i>	: Desoxinucleótidos
<i>EDTA</i>	: Ácido etilendiaminotetraacético
<i>EGF</i>	: Factor de crecimiento epidermal
<i>ELISA</i>	: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<i>ERK</i>	: Kinasa activadora de mitosis
<i>ERp57</i>	: Proteína del RE, de la familia de las PDI
<i>FACS</i>	: Citometría de flujo
<i>FCS</i>	: Suero fetal de Bovino
<i>FITC</i>	: Isocianato de fluoresceína
<i>GADPH</i>	: Deshidrogenasa de la Gliceraldeído-3-fosfato
<i>GM-CSF</i>	: Factor de Crecimiento de granulocitos y macrófagos
<i>GRP58</i>	: Proteína regulada por glucosa 58
<i>GRP78</i>	: Proteína regulada por glucosa 78
<i>GRP94</i>	: Proteína regulada por glucosa 94
<i>H</i>	: Histidina
<i>HAI-1</i>	: Factor inhibidor del activador de crecimiento hepático 1
<i>H-E</i>	: Hematoxilina-eosina
<i>HBSS</i>	: Solución tampón salina de Hanks
<i>HEK 293</i>	: Línea embrionica de riñón humano
<i>HGF</i>	: Factor de crecimiento de hepatocitos.
<i>HMGB-1</i>	: <i>High-mobility group box 1</i>

<i>HIV</i>	: Virus de la inmunodeficiencia humana.
<i>HLA</i>	: Antígenos leucocitarios humanos
<i>HRP</i>	: Peroxidasa de rábano picante
<i>Hsp</i>	: Proteína de shock térmico
<i>HyTk</i>	: Gen timidina kinasa
<i>IF</i>	: Inmunofluorescencia
<i>IGF-2</i>	: Factor de crecimiento similar a insulina 2
<i>IKDC</i>	: Célula dendrítica citolítica
<i>INF-α</i>	: Interferón α
<i>INF-γ</i>	: Interferón γ
<i>IL</i>	: Interleuquina
<i>IP</i>	: Inmunoprecipitación
<i>ITIM</i>	: Motivo inhibitorio tirosina de inmunoreceptor
<i>Itk</i>	: Quinasa de linfocitos T inducible por IL-2
<i>JAK2</i>	: Quinasa Janus 2
<i>Jnk</i>	: Quinasa terminal de c-jun
<i>kDa</i>	: Kilo Dalton
<i>KIR</i>	: Receptores tipo Inmunoglobulina de las células asesinas
<i>LAK</i>	: Linfocitos citolíticos activados
<i>LB</i>	: Medio Luria Bertani
<i>LIF</i>	: Factor inhibitorio de leucemia
<i>MART-1</i>	: Antígeno asociado a melanoma reconocido por células T.
<i>MsCs</i>	: Células supresoras mieloides.
<i>MFI</i>	: Intensidad de Fluorescencia Media
<i>MHC-I</i>	: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
<i>MHC-II</i>	: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II
<i>MICA</i>	: Proteína relacionada a la cadena A de MHC-I
<i>MICB</i>	: Proteína relacionada a la cadena B de MHC-I
<i>MGSA/GRO</i>	: Factor de crecimiento de melanoma
<i>MMP</i>	: Metaloproteinasa
<i>MOPS</i>	: Acido 3-N-morfolino propanosulfónico
<i>miRNA</i>	: Micro RNA mensajeros
<i>mRNA</i>	: RNA mensajero
<i>N</i>	: Asparragina
<i>NF-Y</i>	: Factor de Transcripción nuclear Y
<i>NGF</i>	: Factor de crecimiento neuronal
<i>NK</i>	: Células Citotóxicas Naturales, <i>Natural Killer</i>
<i>NKT</i>	: Célula Citotóxica Natural de linaje linfocitario T
<i>NKG2D</i>	: Receptor de activación de células NK, grupo 2, miembro D
<i>NKG2DL</i>	: Ligandos del receptor NKG2D
<i>NKp30</i>	: Receptor de activación NK 30
<i>PAMPS</i>	: Patrones moleculares asociados a patógenos
<i>PAGE</i>	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
<i>PE</i>	: Ficoritrina
<i>PBMC</i>	: Células mononucleares periféricas
<i>PBS</i>	: Tampón fosfato salino
<i>PCR</i>	: Reacción en cadena de la polimerasa

<i>PDI</i>	: Proteína Disulfuro Isomerasa
<i>PDGF</i>	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
<i>PLGF</i>	: Factor de crecimiento placental
<i>PM</i>	: Peso Molecular
<i>PMSF</i>	: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
<i>PPIs</i>	: Peptidil Prolil Isomerasas
<i>PRR</i>	: Receptores de reconocimiento de patrón
<i>qRT-PCR</i>	: Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita
<i>RAET</i>	: Transcritos inducidos por ácido retinoico
<i>RE</i>	: Retículo endoplasmático
<i>RI</i>	: Respuesta Inmune
<i>RNA</i>	: Ácido Ribonucleico
<i>RPMI-1640</i>	: <i>Roswell Park Memorial Institute medium 1640</i>
<i>SDS</i>	: Dodecil Sulfato de Sodio
<i>S</i>	: Serina
<i>SI</i>	: Sistema Inmune
<i>SHP</i>	: Dominio fosfatasa homólogo a Src
<i>SNC</i>	: Suero normal de conejo
<i>Src2</i>	: <i>Coactivador de receptor nuclear 2</i>
<i>sqRT-PCR</i>	: Reacción semicuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita
<i>STAT</i>	: Transductor de señal y activador de transcripción
<i>SSMN</i>	: Servicio de Salud Metropolitano Norte.
<i>sMICA</i>	: MICA soluble
<i>sMICB</i>	: MICB soluble
<i>T</i>	: Treonina
<i>TAM</i>	: Macrófagos asociados a tumores
<i>TBE</i>	: Tampón Tris Borato EDTA
<i>TE</i>	: Tampón Tris-EDTA
<i>TEMED</i>	: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
<i>TGF-β</i>	: Factor crecimiento tumoral beta
<i>Th</i>	: Linfocitos ayudadores
<i>TLR</i>	: Toll like receptor
<i>Treg</i>	: Linfocitos T regulatorios.
<i>Tris</i>	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
<i>U</i>	: Unidad enzimática internacional
<i>ULBP</i>	: Proteínas de unión a UL16
<i>UV</i>	: Ultravioleta
<i>V</i>	: Volts
<i>Vav-1</i>	: Factor de intercambio de nucleósidos de guanina 1.
<i>VEGF</i>	: Factor de crecimiento endotelial vascular
<i>WB</i>	: Inmunoelctrotransferencia (<i>Western Blot</i>)

4. INTRODUCCIÓN

El Sistema Inmune de los mamíferos está compuesto por órganos, células y moléculas, que interactúan estrechamente en una compleja red para proteger al organismo del daño provocado por patógenos externos y células neoplásicas. También posee la capacidad de discriminar a través de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, las células propias del organismo y las no propias patógenicas¹. Históricamente el desarrollo científico de la inmunología estuvo centrado en el control de infecciones provocada por microorganismos patógenos de diversa naturaleza, pero en las últimas décadas con el advenimiento de las profilaxis y el desarrollo de antibióticos, ha incidido en el aumento de la expectativa de vida y con ello en el avance en el conocimiento de otras áreas de la inmunología como la inmunidad antitumoral, autoinmunidad y trasplante, entre otros (*Diagrama 1*).

El desarrollo de la respuesta inmune está regulado por complejos mecanismos de control que pueden favorecer tanto su acción efectora, como su inhibición. Por ello, el conocimiento de estos mecanismos abre nuevas alternativas de manipulación de las respuestas inmunes, favoreciendo su acción o su represión según sea el caso de la patología. Adicionalmente, se ha descrito que algunos microorganismos patógenos y las neoplasias, utilizan estos sistemas de control de la respuesta inmunológica en su propio beneficio, generando así estrategias para evitar ser eliminados por el sistema de defensa, fenómeno conocido como Evasión Inmune. Sin embargo, esta forma de escapar de la actividad inmunológica es, en ciertos casos un proceso normal del organismo, como se ha descrito en el tracto gastrointestinal,² epitelio bronquial³ y placenta.⁴⁻⁷

El conjunto de órganos, células y moléculas que participan en las fases efectoras, de tolerancia y regulación, comprenden un todo en que las claves de cada fenómeno pueden favorecer en un caso la acción del SI y en otros su control. (*Diagrama 1*). En otras palabras, muchos de los elementos que forman parte de la inmunología moderna son compartidos entre diferentes tipos de patologías o eventos inmunológicos. Uno de los ejemplos más claros, y en los que se desarrolla esta tesis, tiene que ver con la evasión inmune que desarrollan las neoplasias para escapar de la acción de la fase efectora de la RI antitumoral, y los fenómenos evasivos montados por el trofoblasto en el período del embarazo. Es

posible así, extrapolar los fenómenos de un área a otra considerando que los actores se repiten pero en condiciones diferentes.



Diagrama 1: El escape inmune, la respuesta inmune y las condiciones fisiopatológicas asociadas. A medida que la respuesta inmune se hace más fuerte se asocia a patologías relacionadas al daño tisular a lo propio y a injertos, como también en mecanismos que participan del aborto espontáneo. A su vez la, permanencia del feto en gestación esta dada por una respuesta inmune reducida. El escenario de estadios avanzados del cáncer esta dado por una respuesta inmune ausente en contra del tumor, predominando la evasión inmune.

4.1. Respuesta Inmune

Como ya se mencionó, nuestro sistema de defensa trabaja esencialmente discriminando entre moléculas propias de las que no lo son. Esto permite la detección y posterior eliminación de agresores que pueden ir desde virus a parásitos multicelulares.

Es aquí donde con fines prácticos se ha subdividido la inmunología en dos grandes brazos, la llamada RI Innata y la RI adaptativa. La inmunidad innata desempeña una importante función en la fase inicial de las infecciones y en el desarrollo posterior de la inmunidad adaptativa. Una vez que los agentes patógenos se ponen en contacto con el organismo, desencadena inmediatamente las señales de peligro, sin variar su forma de proceder e intensidad; y no confiere protección a la reinfección⁸. La inmunidad adaptativa, en cambio, constituye una protección efectiva del hospedero contra los microorganismos patógenos, cuando éstos han evadido los mecanismos innatos de defensa, y además de eliminar al agente infeccioso, le confiere protección al hospedero contra la reinfección por el mismo agente, garantizado por la existencia de una gran población de células de memoria.⁹

Patrones moleculares propios de los patógenos como los residuos de carbohidratos en las glicoproteínas o la ausencia de residuos de citosina metilados en el DNA, son

detectadas por numerosos receptores distribuidos principalmente en células que forman parte del SI innato. Este reconocimiento se realiza a través de los Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRR), especialmente los Receptores tipo “Toll” (TLR).¹⁰ Estos receptores reconocen a los llamados Patrones Moleculares Asociado a Patógenos (PAMPS), estructuras conservadas y esenciales para la sobrevivencia del patógeno.¹¹ Esta acción fundamental del SI, le otorga la característica de discriminar lo propio de lo no propio microbiano.

El SI innato se considera ontológicamente más antiguo. Está compuesto de barreras epiteliales, células circulantes como células dendríticas (DC), neutrófilos, fagocitos mononucleares, células citolíticas naturales o *Natural Killer* (NK)¹ y proteínas plasmáticas, entre otras.¹² Con la activación del SI innato se desencadena, en etapas posteriores, una RI adaptativa, mediada por los linfocitos T y B.

Fue en la década de los ochenta, en que por primera vez se propuso que el SI era capaz de detectar la expresión de neo-antígenos y/o moléculas alteradas, como también detectar la sobre-expresión de moléculas propias. Actúa en ausencia de lo propio mediante la detección de una disminución en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).¹² Tanto el SI innato como el adaptativo son capaces de interactuar con estas células. Más aún, existen varias sub-poblaciones especializadas encargados de detectarlas y eliminarlas.¹³ Dicha interacción viene dada, en parte, por la presentación de antígenos tumorales que desarrollan un mecanismo complejo y de alta especificidad para la erradicación de dicho tumor. Esta función es realizada, en forma orquestada, por células presentadoras de antígenos, linfocitos T, B y células NK.

Las células NK son el único componente celular que es capaz de diferenciar entre las células sanas y células alogénicas o autólogas, que han sido sometidas a alguna condición de estrés, para posteriormente destruirlas sin sensibilización previa.¹⁴

4.2. Cáncer

El cáncer es un desorden hiperproliferativo que involucra transformaciones morfológicas y celulares, desregulación de la apoptosis, invasión, angiogénesis y metástasis, reemplazando al tejido normal en sus funciones.¹⁵

Actualmente es reconocida la permanente actividad del sistema inmune sobre la eliminación temprana de células bajo transformación tumoral, la llamada inmunovigilancia^{9, 10}. Sin embargo, este proceso no es totalmente efectivo, pues la respuesta inmune ejerce una selección evolutiva sobre las células que resisten mejor el microambiente tumoral pro-inflamatorio, las cuales forman masas tumorales, proceso conocido como inmunoescape. El concepto que unifica ambos procesos, se conoce como Inmunoedición e incluye tres etapas: eliminación, equilibrio y escape de las células tumorales. Este proceso involucra la evolución de la célula tumoral que pasa de ser inmunogénica a generar tolerancia a los componentes del sistema inmune.¹⁶

La activación de la respuesta inmune anti-tumoral, depende de las señales de peligro liberadas o expresadas por las células dañadas o estresadas. En el caso de una transformación celular, las señales de peligro que activan la inmunidad antitumoral aun no se encuentran bien definidas. Estas pueden venir del microambiente tumoral como resultado del remodelamiento del tejido, o pueden provenir directamente de las células transformadas en respuesta a la señalización oncogénica. Las células tumorales coexisten con células del sistema inmune como: macrófagos asociados a tumores (TAM), células T reguladoras (Treg), células dendríticas (DC) y células supresoras mieloides. TAM y Treg son las principales fuentes de citoquinas anti-inflamatorias, como: interleuquina 4 (IL4), IL10 y IL13 y factor de necrosis tumoral beta (TGF- β) las cuales suprimen la actividad anticancerígena mediada por las células NK, y T CD8⁺.¹⁷ Durante el proceso de eliminación de las células transformadas, es importante el papel que cumple el sistema inmune innato, dado principalmente por el reconocimiento de moléculas endógenas liberadas en ambientes proinflamatorios por los receptores tipo Toll, la activación de las DC, el reconocimiento y eliminación de las células transformadas por las células NK.¹⁸

4.3. Melanoma Maligno

Los melanomas son transformaciones malignas que se originan a partir los melanocitos, células de origen neuroectodérmico, encargados de producir el pigmento de la piel.¹⁹ Pueden aparecer en cualquier lugar de la epidermis y mucosas, como también en la uvea e iris.¹⁹ Histológicamente se han descrito varios tipos de ellos, de acuerdo a su nivel diferencial de pigmentación. Considerando su evolución natural, los melanomas atraviesan

la membrana basal del epitelio, se trasladan a través de los vasos linfáticos a ganglios regionales y por diseminación hematológica, colonizan con mayor frecuencia hígado, pulmón, tracto gastrointestinal, hueso o sistema nervioso central. Los melanomas además pueden expandirse localmente, fenómeno que se conoce como metástasis satélite.²⁰ Mención especial merece el melanoma de úvea, ya que es la neoplasia intraocular más común en el adulto y sus metástasis tienen como destino preferencial el tejido hepático.¹⁹

A pesar de los importantes avances de la medicina en la lucha contra el cáncer, se ha registrado un espectacular aumento en la incidencia del melanoma maligno a escala mundial en los últimos cuarenta años. Esta incidencia estaría relacionada a la sobreexposición de las personas a la luz solar, en especial a los rayos ultravioleta B y a la disminución concomitante de la capa de ozono.²¹ Otros factores importantes en relación con melanoma, lo constituyen los antecedentes genéticos e inmunológicos, la exposición a carcinógenos y la preexistencia de nevos. El melanoma puede afectar a adultos y personas jóvenes, siendo una importante causa de muerte en países desarrollados.²²

En Chile, durante las últimas dos décadas, se ha producido un incremento preocupante de las enfermedades oncológicas. Los tumores malignos han aumentado sus tasas de mortalidad de 98 a 118 por cada 100.000 habitantes.²³ Es por esto que cada vez son más los esfuerzos por encontrar soluciones terapéuticas eficientes para combatir el avance de esta enfermedad. En este sentido, un área de acción muy importante es la Inmunología, ya que se centra en poder comprender los mecanismos por los cuales el tumor logra evadir la vigilancia y el ataque por parte del SI, con lo cual logra crecer y expandirse a través del cuerpo.²⁴ Cualquier progreso que se pueda hacer en esta área tiene gran relevancia, ya que puede ser un aporte importante para la implementación futura de terapias destinadas a disminuir el impacto de dicha enfermedad en la salud pública.

El tratamiento que dispone la medicina en la actualidad contra el melanoma se basa en primera instancia en la erradicación del tumor mediante cirugía, donde la extirpación local de lesiones cutáneas de pequeño tamaño y que no traspasan la membrana basal del epitelio da buenos resultados. Cuando las células tumorales han superado esta barrera y se diseminan producen las llamadas metástasis. Las células neoplásicas, a diferencia de las normales, entran en un estado de constante y descontrolada proliferación. Es esta

característica de división activa, aprovechada por la radio y quimioterapia que apuntan a la destrucción celular, atacando el DNA durante la mitosis.

Aún cuando se han experimentado grandes avances relacionados con estas terapias en otros tipos de cáncer, los resultados de los tratamientos tradicionales en la enfermedad metastásica de melanoma son decepcionantes, lo que hace imprescindible la utilización de tratamientos alternativos basados en el diagnóstico precoz y el desarrollo de nuevas estrategias para tratar la enfermedad. Una de ellas es la inmunoterapia del cáncer, la cual trata de inducir respuestas del sistema inmune contra los tumores malignos mediante diferentes estrategias, entre ellas, la transferencia adoptiva de linfocitos activados, las terapias basadas en el uso de células dendríticas pulsadas con antígenos o el uso de anticuerpos monoclonales quiméricos y/o humanizados en contra de blancos específicos en el tumor.²²

4.4. Tolerancia Fetal

La tolerancia inmunológica se define como el conjunto de mecanismos celulares y moleculares que permiten la sobrevivencia de una célula, bloqueando, inhibiendo o escapando de la acción efectora del SI. Por las razones antes mencionadas, el organismo utiliza mecanismos de evasión inmune durante el propio desarrollo. Los ejemplos más claros son la tolerancia oral a los alimentos y la fetal a la presencia de células con contenido genético paterno.⁶

El embarazo por definición es un mecanismo natural de evasión alogénica, en el cual el útero grávido es un sistema altamente regulado que evita el rechazo fetal. Durante el primer trimestre de gestación se establece la circulación útero-placentaria, interfase donde se genera la regulación del sistema inmune innato de la madre, que actúa en el contacto directo entre células de la circulación de la madre con células del citotrofoblasto proveniente del feto. Éstas últimas dispuestas en forma de vellosidades coriónicas⁶.

La placenta humana es un órgano temporal que otorga protección física y de mecanismos de defensa, suministro de nutrientes al feto y retiro de desechos. Es también un órgano endocrino, donde la secreción de progesterona mantiene el embarazo. Histológicamente, está formada por la estrecha interrelación de células provenientes de dos genotipos diferentes, el de la madre y el del feto.²⁵

Después de ocurrida la fecundación, el huevo se implanta en el tercio superior del útero de la madre en donde células del polo vegetal comienzan a invadir el estroma endometrial, formando así el citotrofoblasto. Esta capa se divide y comienza a profundizar en el estroma. Al entrar en contacto con células de las glándulas endometriales, se fusionan formando un sincicio conformado por núcleos provenientes del feto y de la madre, llamado sinciciotrofoblasto. Más tarde se generan las llamadas vellosidades coriales que son masas de tejido conjuntivo revestidas por células del trofoblasto. Paralelamente, se forman espacios inter-vellosidades que se van fusionando entre si creando un verdadero laberinto de vasos llamados redes lacunares. Al penetrar el crecimiento de la vellosidad corial llegan a las arteriolas del útero, que se encuentran dilatadas, y se produce el llenado de sangre materna en los espacios intervellosidades, estableciéndose la circulación útero-placentaria. Se establece así, la llamada barrera placentaria conformada por, el sinciciotrofoblasto, el citotrofoblasto, el tejido conectivo del centro de la vellosidad, la membrana basal del capilar fetal y las células endoteliales.²⁶ En resumen, en el trofoblasto se ponen en juego elementos de evasión inmune, un escape de tipo alogénico, donde células del sistema inmune de la madre reconocen y tolerizan a antígenos provenientes del feto⁶. Es aquí donde es posible establecer un paralelo entre la placenta y el tejido tumoral, pues que comparten varias características y estrategias evasivas del sistema inmune.

4.5. Tolerancia fetal y evasión inmune antitumoral

El cáncer es un nuevo tejido generado por mutaciones génicas, que resulta en el montaje de variados esquemas de escape de la acción de las células efectoras del SI. Es altamente proliferativo, con capacidades invasivas y que requiere una alta necesidad energética que es suministrada por una angiogénesis activa.¹⁵

Por otro lado, el embarazo por definición es un mecanismo natural de evasión alogénica en el cual el útero grávido es un sistema altamente regulado que evita el rechazo inmune. Y es en la placenta de primer trimestre de gestación donde se establece la circulación útero-placentaria, necesaria para los requerimientos energéticos del feto.²⁶ En suma, es posible correlacionar mecanismos, factores y células, que son compartidos entre la formación tumoral, con el de la placenta humana como fenómenos de evasión inmunológica.

La expresión de productos de proto-oncogenes y de digestión de matriz extracelular que permiten la migración, deben ocurrir bajo un rico suministro vascular. De los factores angiogénicos involucrados, un ejemplo es el papel que cumple el factor inducible por Hipoxia (*Tabla 1*). Se ha descrito que HIF-1 interacciona a nivel transcripcional, pues al unirse al DNA, induce la transcripción de la eritropoyetina. Este factor, se ha asociado al fenómeno de la pre-eclampsia, caracterizado por hipertensión, proteinuria, y edema durante el embarazo. Recientemente se ha descrito una relación entre este factor de transcripción y la secreción de citoquinas, conectando así los fenómenos vasculares con los inmunológicos en la tolerancia fetal.²⁷ Por otro lado HIF-1 está también presente en altos niveles en los tumores humanos, desempeña un papel crucial en la promoción tumoral pues está implicado en el metabolismo de energía anaeróbica, la angiogénesis, la supervivencia celular, la invasión celular, y la resistencia a los medicamentos.²⁸ Además se han descrito similitudes entre los elementos de respuesta del promotor de los genes de MICA/B y los genes de proteínas de shock térmico como HSP70 sugiriendo que las condiciones en los ambientes del tumor que conducen a la HSP70 de inducción, como el estrés oxidativo y la hipoxia, también puede favorecer la expresión de MIC²⁹. Destaca en esto último el factor de transcripción SP-1, el cual se ha descrito que trabaja en forma concertada con variados factores relacionados a la hipoxia como lo es HIF-1³⁰

Otros mecanismos solubles o celulares pueden considerarse denominadores comunes entre el cáncer y la tolerancia fetal, como lo es el factor de crecimiento endotelial, extensamente descrito en la formación de vasos en las masas tumorales³¹ y presente también en la formación de redes lacunares en el útero grávido³². La lista de factores involucrados es amplia y se puede resumir en parte en la *Tabla 1*:

Tenemos entonces por un lado, una evasión no deseada, dada por las neoplasias, y una evasión deseada en el caso de la reproducción inmune. Los fenómenos son opuestos pero los actores son los mismos. Uno de los denominadores comunes en ambas áreas lo constituye la inmunología innata, más específicamente el importante papel de las células *Natural Killer*

Tabla 1: Elementos solubles involucrados en la respuesta inmune y de angiogénesis descritos en la Tolerancia Feto-Placentaria y en el Melanoma maligno. Se indican las citoquinas más reconocidas participantes de la tolerancia fetal que también se han descrito presentes en el desarrollo del melanoma. Factores de vascularización y angiogénesis también se indican descritos para ambos fenómenos.

	Placenta	Melanoma
Citoquinas	GM-CSF ³³ , IL-10 ³⁴ , TGF- β ³¹ CSF-1, IL-1, IL-6, TNF- α , ³⁵	IL-10 ³⁶ , TGF- β ³⁷ IL-8, IL-6, PDGF-A TGF- β , IL-1, GM- CSF, TNF and IFN ³²
Factores de Crecimiento y vascularización	EGF ³¹ , PIGF ³⁸ , VEGF ³³ , IGF-2 ³⁹ , HGF ⁴⁰ , LIF, PDGF ³⁵	VEGF, bFGF, MGSA/GRO, PDGF, EGF, IGF-I, NGF, VEGF ³²

4.6. Células Citolíticas Naturales NK (*Natural Killer Cells*)

Las células NK fueron descritas por primera vez en 1975, observándose que ratones normales poseían células citolíticas que *in vitro* mostraban una especificidad hacia células murinas de leucemia Molones.⁴¹ Son una población de células que corresponde al 10-20% del linfocitos de sangre periférica, en órganos linfoides secundarios como linfonodos, bazo y médula ósea, en tejidos como el hígado, cavidad del peritoneo y placenta. Pueden migrar además a los sitios de inflamación gracias a diferentes quimioattractantes.⁴² Son capaces de reconocer y reaccionar en contra de células aberrantes de tumores que emergen dentro del cuerpo, así como a las células infectadas por virus sin que haya habido una activación previa¹⁵. Por estas características, su función principal apunta a la eliminación de células alogénicas y a la identificación y eliminación de células autólogas en condiciones de estrés, como la infección por microorganismos intracelulares, daño al DNA o bajo transformación maligna,⁴³ siendo muy importantes en el control del crecimiento tumoral y la metástasis.⁴⁴ Ejercen su acción efectora citolítica liberando perforinas y granzimas, provocando la muerte de la célula blanco transformada, como también asociadas a fenómenos de autoinmunidad y al rechazo de trasplantes.⁴⁵⁻⁴⁹

Fenotípicamente, se caracterizan por la expresión en superficie del marcador CD56 y la baja expresión de CD3. Basándose en la expresión de CD56, a nivel general, se

distinguen dos subgrupos de células NK, las CD56^{dim.}, altamente citotóxicas, y las CD56^{bright}, que poseen una alta capacidad de liberación de citoquinas.⁴² Estas últimas se describen como importantes moduladores de la actividad de otras células, tanto del SI innato como del adaptativo, mediante la secreción de citoquinas y la interacción directa con DC.^{9,60}

La activación de las células NK ocurre tempranamente durante la respuesta inmune y, contrariamente a la respuesta inmune adaptativa, no involucra la expansión de células antígeno-específicas. Principalmente, las células NK prefieren atacar células que disminuyen la expresión en superficie de moléculas MHC-I,⁵⁰ ya que las células tumorales o infectadas con virus usan este mecanismo para evadir el reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos. La acción efectora de las NK está controlada por receptores inhibitorios específicos para las moléculas MHC-I. Sin embargo, las NK pueden activarse y atacar a las células que expresan PAMPS o moléculas autólogas inducidas por estrés en un microambiente inflamatorio a través de receptores de activación, entre ellos NKG2D (*Natural Killer Group 2, type D*).⁵⁴⁻⁵⁹

En el útero grávido las NK están íntimamente relacionadas con el trofoblasto de las vellosidades placentarias constituyéndose como el principal linaje linfoide de la mucosa del útero durante el embarazo.^{51 52} Las llamadas NK uterinas (uNK) están muy presentes en la implantación murina, sugiriendo que este sistema es necesario para la activación de estos linfocitos presentes en alto número durante el embarazo normal.⁵³ También se ha descrito que son una población importante de los linfocitos en el endometrio humano, pues son una fuente importante de citoquinas que modifican la respuesta inmune local. Poseen un fenotipo único que es distinto de las células NK de sangre periférica. Se han descrito como CD56+, CD3-, CD57-, CD9+, CD94+, KIR+ y CD16 +/- y son capaces de secretar IL-10 y de ser moduladas por TGF- β , cuya inhibición es un posible mecanismo para regular la función de las células uNK en el endometrio humano.⁵⁴

4.7. Activación, regulación y receptores de NK

La actividad citotóxica y la producción de citoquinas están finamente reguladas por un equilibrio entre señales de receptores de activación e inhibición (*Tabla 2*).⁵⁵ A pesar de que las señales inhibitorias son preponderantes,⁵⁶ se ha documentado que, un aumento en

la expresión de ligandos de los receptores de activación, puede generar una señal capaz de superar a las señales inhibitoras.⁵⁷

Tabla 2: Receptores presentes en células NK humanas y sus ligandos. Modificado de (Ljunggren and Malmberg, 2007).⁵⁸

Receptores activadores	Ligandos
NKG2D	ULBP1–ULBP4 MICA y MICB
NKp30	ND
NKp44	ND
NKp46	ND
NKp80	AICL
DNAM1	(CD226) PVR and nectina-2
CD96	PVR y nectina-2
CD16 (FcγRIIIA)	IgG
KIR2DS1	HLA-C
KIR2DS2	ND
KIR3DS1	ND
BY55 (CD160)	HLA-C
CD2	LFA-3 (CD58)
Receptores inhibidores	
KIR2DL2 y/o KIR2DL3	HLA-Cw3
KIR2DL1	HLA-Cw4
KIR3DL1	HLA-Bw4
KIR3DL2	HLA-A3 y HLA-A
LILRB1 (LIR-1) KLRG1	Moléculas HLA de clase I, HLA-G y UL18 codificado por HCMV
NKR-P1A	Cadherinas
CD94-NKG2A/B	HLA de clase I clásicas y HLA-E

Las moléculas MHC activan los receptores de inhibición, evitando la respuesta ante células autólogas y son reconocidas por receptores de la familia *Killer cell immunoglobulin like receptor* (KIR), KIR2DL, KIR3DL y de la familia de lectinas tipo C, el heterodímero CD94/ NKG2A/B, cuyos ligandos son moléculas HLA de clase I clásicas y HLA-E, respectivamente.^{44, 59} Los receptores de inhibición presentan diferentes estructuras moleculares y especificidades, además tienen un motivo ITIM en su dominio citoplasmático, cuya fosforilación induce el reclutamiento de las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, desencadenando un proceso de señalización consecutiva, impidiendo así la activación de la célula NK. La teoría de la eliminación de lo no propio elaborada por Kärre et al,¹² esta

basada en el reconocimiento de la ausencia de las moléculas MHC clase I, activando la respuesta citotóxica de las NK. Esta teoría no explica la ausencia de respuesta ante células que no expresan moléculas MHC clásicas, como es el caso de los eritrocitos. De esta forma la función efectora está definida por la estimulación de receptores de activación, que reconocen moléculas microbianas exógenas o ligandos inducidos por estrés. Los principales receptores forman parte de la familia de los receptores citotóxicos (*Natural Cytotoxic Receptor*, NCR) (NKp30, NKp44, NKp46, NKp80), CD244, DNAM-1 y el homodímero NKG2D.^{56, 60, 61}

4.8. NKG2D (*Natural Killer Group 2, type D*)

Dentro del grupo de señales activadoras se destaca la molécula NKG2D. Corresponde a un receptor homodímero unidos por un enlace disulfuro a lectinas tipo C, siendo una glicoproteína tipo II anclada a membrana que ha perdido tanto su activación por calcio como el reconocimiento de carbohidratos.⁶² Se ha descrito como el receptor de activación más potente para linfocitos NK efectores en tejidos periféricos, el cual se expresa en forma normal por las NK murinas y humanas,^{63 64} linfocitos T $\alpha\beta$ CD8⁺,⁶⁵ en macrófagos activados,⁶⁶ en células NKT, todos los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁶⁷ de sangre periférica y, en niveles bajos, en casi todas las células T $\gamma\delta$ intestinales intraepiteliales humanas,⁶⁸ y por IKDC mieloide (*interferon produced killer dendritic cell*).⁶⁹ En células NK y macrófagos, el receptor induce señales que conducen a una activación total de las células, por lo que sería un receptor primario de citotoxicidad, mientras que en células T, el receptor aumenta la RI específica para el antígeno, mediando señales co-estimuladoras, colaborando en la generación de células T CD8⁺ de memoria.⁷⁰ También se ha vinculado a linfocitos T CD4⁺CD28⁻ autoreactivos.⁷¹

El receptor NKG2D humano se asocia con dos homodímeros de DAP10, a través del hexámero DNAX que se usa como péptido señalizador en la vía de transducción. Específicamente la asociación entre ambas moléculas se daría entre residuos de Arginina y Aspartato presentes en la región transmembrana de NKG2D y DAP10 respectivamente.⁵⁹ La activación óptima del receptor requiere de citoquinas activadoras, IL2, IL12, IL15, IL18, IL21 que favorecen su actividad citotóxica.⁷²⁻⁷⁷

4.9. Ligandos de NKG2D

Los receptores NKG2D son clave en la identificación de estados de estrés celular, y a diferencia de otras moléculas que son ligando específico, NKG2D es capaz de reconocer hasta el momento 7 ligandos de membrana inducibles por daño celular. En humanos se han descrito dos familias de proteínas como ligandos (NKG2DLs). Las primeras identificadas, fueron las proteínas relacionadas con la cadena de la molécula de clase I del MHC inducible por estrés MICA⁶⁷ y MICB,⁷⁸ descritas por Groh, et al,⁷⁹. Son moléculas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad y presentan similitud a la cadena α del MHC-I con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, pero se diferencian al no unir $\beta 2$ -microglobulina ni presentar antígenos⁸⁰.

El otro grupo de ligandos corresponden a las moléculas ULBP (UL-16 binding protein) son similares a los MIC, pero presentan sólo los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena α y no se codifica dentro del complejo *MHC*. Fueron identificados por la unión a la proteína UL16 de citomegalovirus⁸¹ y hasta el momento se han descrito 5 variantes. Como sólo ULBP 1 y 2 unen realmente a la proteína UL16, la denominación actual es transcritos inducidos por ácido retinoico 1 (RAET1): RAET1I (ULBP1), RAET1H (ULBP2), RAET1N (ULBP3), RAET1E 1 y 2 (ULBP4), RAET1G (ULBP5).^{56, 69, 81-84} Estas proteínas son capaces de modular la función de las NK ya que al ser reconocidas en la membrana activan una respuesta citotóxica, pero también pueden ser liberadas de la membrana por la acción de proteasas y quedar en forma libre en el extracelular. En fase soluble los NKG2DLs son capaces de inhibir la respuesta mediada por NKG2D, sea por la reducción del ligando de superficie de la célula blanco, disminución del receptor en la superficie de la célula efectora o bloqueo del sitio de unión del ligando en el receptor.^{74, 85-88}

Los NKG2DLs se han identificado a nivel de transcrito en múltiples tejidos,⁸⁹ pero existe una regulación a nivel post traduccional que altera su expresión en la superficie.⁹⁰ En tejidos normales, se ha visto la inducción de NKG2DLs en la superficie por infecciones microbianas, así también como la inhibición por algunos virus que evolutivamente han desarrollado estrategias de evasión inmune,⁹¹ ya que el gatillamiento de NKG2D inicia una citólisis mediada por perforinas en contra de células infectadas por parásitos intracelulares.⁹² Los NKG2DL se inducen por factores físico-químicos, calor, estrés oxidativo, daño genotóxico, estrés de retículo endoplásmico (inhibidores del proteosoma),

daño al DNA por luz UV o radiaciones ionizantes y por efecto de drogas quimioterapéuticas (inhibidores de histonas deacetilasas). Se ha descrito que el efecto de inducción de los distintos NKG2DLs es diferente, lo que podría ser indicativo de un efecto redundante de estos sobre la célula NK o que estos presentan diferente efecto sobre la activación de las NK.^{56, 84, 93}

En la evolución de una masa tumoral se ha visto que en estados tempranos, se estimula la expresión de los NKG2DLs, pero con el tiempo se desarrollan distintos mecanismos para alterar su expresión en la superficie.⁹⁴ Se ha descrito que algunas células pueden disminuir la expresión moléculas en la superficie celular, debido a una retención en el retículo endoplásmico. Otro mecanismo de reducción de la expresión de proteínas en la superficie celular es causado por la acción de metaloproteinasas (MMP), o también por la inhibición de su traducción por acción de miRNA.⁹⁵ También ocurre liberación de exosomas que portan NKG2DL y TGF- β . La inducción de estos mecanismos podría estar modulada por el microambiente tumoral y las citoquinas asociadas.^{87, 96}

Se ha descrito que ciertas señales de activación, como la de NKG2D prima por sobre las señales de inhibición.⁹⁷ Esto llevó a la hipótesis de que las moléculas NKG2DLs cumplen un papel crítico en la inmunovigilancia tumoral. A pesar de una marcada diferencia en sus secuencias de aminoácidos, los diferentes ligandos interactúan semejantemente con NKG2D.⁹⁸ En general la afinidad de estos NKG2DLs, es más alta que muchas interacciones de ligandos con inmuno receptores.⁹⁹⁻¹⁰²

4.10. MIC

Los genes *MICA* y *MICB* han sido considerados como genes de respuesta en células estresadas y contienen elementos de respuestas a shock térmico en sus promotores.⁷⁹ Son altamente polimórficos y hasta el momento se han descrito 61 alelos para MIC-A y 30 alelos para MIC-B.⁸⁴

Estas moléculas se han identificado normalmente en muestras de epitelio intestinal, fibroblastos y epitelio de la vía aérea, donde el contacto con el exterior ejerce una presión sobre este tipo de tejidos.^{69 103} Como una respuesta a otros tipos de estrés, MIC puede estar sobrepresado durante ciertas infecciones, como con citomegalovirus (CMV),⁶⁵ *Mycobacterium tuberculosis* en DC y células epiteliales infectadas,¹⁰⁴ *Escherichia coli*

patogénico en el epitelio intestinal y líneas celulares HeLa.¹⁰⁵ Las moléculas MICs son los NKG2DL mejor caracterizados en tumores epiteliales de pulmón, riñón, próstata, ovario, colon, hepático y mamario, en leucemias, en melanomas cutáneos primarios y lesiones metastásicas,¹⁰⁶ como también en hepatomas.¹⁰⁷ Además, se ha observado en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide¹⁰⁸ y enfermedad celíaca.¹⁰⁹ Por otro lado, en condiciones normales, MICA y MICB se expresa en las células epiteliales del intestino, lo cual se debe, probablemente, a la estimulación por parte de la flora bacteriana.¹¹⁰ Específicamente, se encontrarían principalmente en las vellosidades más que en las criptas de las células epiteliales, lo cual podría contribuir a la muerte rutinaria de las vellosidades, favoreciendo la maduración de las criptas.¹¹¹

4.11. NKG2D/NKG2DL en Evasión Inmune

Se ha planteado que podría existir una selección negativa sobre las células tumorales que expresan NKG2DLs sobre su superficie. Investigaciones en melanoma indican que la expresión de estos ligandos depende del estado de avance tumoral, existiendo una alta expresión de estos ligandos en las lesiones primarias, pero disminuye en las lesiones metastásicas. Esto sería una forma de escape de la inmunovigilancia por parte de los tumores, debido a que con el tiempo quedarían sólo las células que no expresan o poseen una baja expresión de los NKG2DLs.¹¹²

Lo anterior también se ha documentado para los gliomas en que los niveles de MICA y ULBP2 son reducidos a niveles basales cuando la progresión maligna llega a nivel metastático. Esto indica que la inmunogenicidad de los gliomas decrece a medida que se incrementa el grado de malignidad, posiblemente mediante un proceso de selección que favorece la sobrevivencia de la célula menos inmunogénica. Los niveles de MICB y ULBP1 no se modifican en el glioma en relación a su estado de avance, solo ULBP3 disminuye levemente en el estadio metastático.¹¹³

Este comportamiento de los NKG2DLs en la membrana en la progresión tumoral se correlaciona directamente con la expresión de citoquinas inmunosupresoras como TGF- β y de MMP.^{114, 115} La expresión de MMP y citoquinas está incrementada en casi todos los cáncer y se ha implicado en la invasión tumoral y metástasis debido a su habilidad de degradar matriz extracelular.¹¹⁶ Existe evidencia que ciertas MMP, que son

sobreexpresadas en los tumores, serían las responsables de la liberación a la circulación de MICA por parte del tumor, las cuales cortarían a MICA en la superficie del tumor generando así una fracción soluble sérica de los NKG2DLs.⁹⁶

Se han detectado formas solubles de MIC-A/B (sMIC) en la circulación, lo cual tendría relación con la disminución de la cantidad y funcionalidad del receptor NKG2D en la superficie de las células T y NK.⁸⁵ Estas formas solubles de MIC A/B desactivan la inmunidad de las células NK, debido a que pueden actuar como inhibidor competitivo bloqueando el reconocimiento de moléculas MIC unidas a la membrana. Incluso, se ha observado una correlación entre los niveles de sMIC en suero y la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de próstata¹¹⁷ con valores significativamente más altos que en individuo sanos o pacientes con enfermedades benignas.¹¹⁸

Recientemente se ha reportado la presencia de sMIC en el plasma de mujeres embarazadas, con niveles aumentados en el primer trimestre de la gestación. Además, se detectó que la actividad NKG2D del suero de las mujeres embarazadas está disminuida, postulándose así un nuevo mecanismo de evasión inmune en el embarazo normal.¹¹⁹ Se evidenció que las células del sincitiotrofoblasto, que están en contacto con la sangre materna, son las que expresan y secretan moléculas sMIC. Además, se identificaron, en vesículas citoplasmáticas, en retículo endoplásmico y complejo de Golgi, moléculas MICs de igual tamaño molecular al de las proteínas de secreción.¹²⁰ Estas evidencias en suma avalan una síntesis *de novo* y activa de MIC en células del sincitiotrofoblasto y liberación del contenido vesicular a la sangre materna. Otro mecanismo planteado es la posibilidad de que las moléculas MIC pierdan su dominio transmembrana por corte catalizado por MMP presentes en alta cantidad en el epitelio trofoblástico,^{121 122}

4.12. Inducción de NKG2DL

La expresión de MICA y MICB aumenta en muchas líneas celulares tumorales y tumores primarios de origen epitelial. Se piensa que esto es el resultado de la activación de la transcripción de elementos de shock térmico, lo cual se sabe que acompaña a la transformación celular en un proceso tumoral. Además, se ha visto en células dendríticas que la expresión de MICA y MICB puede ser inducida por INF- α . Se ha demostrado recientemente que ciertos agentes genotóxicos productores de estrés o inhibidores de la

replicación del DNA pueden aumentar la expresión de NKG2DLs a través de ATM (ataxia telangiectasia mutada) y ATR (ATM y Rad3 relacionada) proteína quinasa en fibroblastos humanos y/o líneas tumorales murinas induciendo su destrucción por las NK.¹²³⁻¹²⁵

La respuesta NKG2D/NKG2DL se ve incrementada por el microambiente inflamatorio generado por la interrelación de vías de la respuesta inmune innata como la maduración de células dendríticas y la producción de citoquinas, el reconocimiento de proteínas liberadas en procesos de necrosis, la activación de TLR, etc. La modulación mediada por citoquinas es un fenómeno que podría explicar la variación en la expresión de estos durante el desarrollo de una masa tumoral. Las citoquinas inmunoactivadoras para NKG2D son inductoras también de la expresión de los ligandos en la célula blanco, estos son IFN γ , IL12, IL15 e IL-18,^{74, 77} aunque aún no se ha descrito los mecanismos por el cual actúan. Si se conoce que los promotores de los NKG2DLs presentan elementos de respuesta para proteínas de shock térmico (HSP), ATF, ERK/JNK y NF κ B, vías inducidas por estas citoquinas y las proinflamatorias en general.²⁹ La liberación de proteínas inducidas en estados de estrés como con las HSP favorece la respuesta mediada por NK y estimulan la inducción de NKG2DLs, además de favorecer el ambiente inflamatorio y la maduración de células dendríticas.^{126, 127} Adicionalmente, en el promotor de los NKG2DLs existen elementos de respuesta a estas proteínas, que podría asociarse a la inducción de los ligandos en casos de shock térmico e indicar vías autocrinas y paracrinas de activación de las células en el microambiente tumoral.²⁹ Las HSP pueden ser reconocidas por TLR4 en un ambiente inflamatorio aséptico, junto a otras moléculas liberadas durante un daño inflamatorio como HMGB1 o proteínas de la matriz,¹²⁸ la función pro-inflamatoria de los TLR se ha asociado a la inducción de NKG2DLs en experimentos *in vitro*. La activación de TLR4 con LPS genera una inducción de MICA en superficie.¹²⁹ Estudios en gliomas indican que la expresión de MICA y ULBP2 decrecen a medida que aumenta el grado de malignidad, mientras que MICB y ULBP1 se expresan independientemente del grado tumoral. En este trabajo se delinean dos mecanismos independientes que pueden explicar estos patrones de expresión, TGF- β se incrementa durante la progresión tumoral y selectivamente decrece MICA, ULBP2 y ULBP4, mientras que MICB, ULBP1 y ULBP3 no se afectan.¹³⁰

4.13. Regulación de NKG2DL

Mecanismos descritos en los últimos años involucran a las citoquinas para explicar la evasión de la inmuno vigilancia por parte del tumor, las cuales, dependiendo del tipo y del contexto, podrían aumentar o disminuir la expresión en superficie de los NKG2DL. Las citoquinas son un grupo heterogéneo de pequeños péptidos solubles o glicoproteínas, las que ejercen efectos pleiotrópicos, como promover el crecimiento, diferenciación y activación de las células. Estas moléculas pueden tener actividad pro o anti-inflamatoria. Además de una función inmunosupresora, lo que depende del microambiente en el que se encuentren. Las células del SI son la fuente principal de citoquinas, aún cuando otros tipos celulares, no pertenecientes al SI como células epiteliales también son capaces de producirlas. El microambiente tumoral es rico en citoquinas y otros mediadores inflamatorios que estimulan la inmuno supresión, crecimiento de las células tumorales, reorganización del tejido y angiogénesis.¹⁷

Se ha observado que el efecto de $IFN\gamma$ y $TGF-\beta$ es inverso, estas citoquinas son capaces de disminuir la expresión de los ligandos, favoreciendo la evasión de la respuesta citotóxica y la sobrevivencia de las células tumorales^{113, 131}. Los mecanismos descritos para estas citoquinas es la disminución de la expresión de NKG2D a través de membranas exocíticas en el caso de $TGF-\beta$ ^{88, 113, 132} y disminución de los ligandos en el caso de $IFN\gamma$, donde hasta el momento se han descrito inducción de MPP e inducción de miRNA anti MIC.¹³¹ Se ha observado que $INF-\alpha$ aumenta la expresión de MICA en la superficie de células tumorales y, contrariamente, $INF-\gamma$ la disminuye.¹³³ Por otro lado, en el embarazo se ha detectado la expresión de sMICA y sMICB en la placenta, y se ha observado que la interacción con NKG2D disminuiría con el paso del tiempo gestacional, como un mecanismo fisiológico para silenciar el SI materno, y así, promover el escape inmune del feto alogénico.¹¹⁹

Por otro lado, se ha descrito la asociación entre el incremento del grado de malignidad y la expresión elevada de moléculas inmunosupresoras como $TGF-\beta$.¹¹⁴ Se ha documentado que la lisis de NK mediada por NKG2D se incrementa al depletar $TGF-\beta$ o al inhibir las MMP¹¹³. Es decir la evasión mediada por la inmuno sobrevida del sistema NKG2D en gliomas *in vivo* puede promoverse por la inhibición de MICA y ULBP2 vía $TGF-\beta$ autocrino y por un corte de moléculas en membrana dependiente de MMP. Los

mecanismos por los cuales TGF- β posee capacidades de inmuno escape tumoral, pueden incluir efectos en señales co-estimuladoras como NKG2D. Existen investigaciones que indican que al parecer la pérdida de MICA y ULBP2 es más importante en el escape en glioma y la regulación diferencial de los NKG2DLs constituyendo así una de las propiedades inmuno evasivas de los gliomas.¹³⁰

4.14. Interleuquina 10

En este sentido IL-10, una citoquina inmunosupresora, es capaz de impedir la producción de un amplio rango de citoquinas producidas por varios tipos celulares involucrados en la respuesta inmune, como por ejemplo IL-2, IL-3, INF- γ y GM-CSF, en células Th1; IL-4 e IL-5 en células Th2; TNF- α e INF- γ , en las células NK. Un aspecto importante del papel de la IL-10 en la regulación de la respuesta del sistema inmune, puede deberse a sus efectos inhibitorios en macrófagos. Más aún, en este tipo celular, la IL-10 suprime la producción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α y MMP-9, además de regular la expresión de MHC-II¹³⁴

Es ya parte de los textos que IL-10 es una citoquina inmunomoduladora gestacional, que interviene principalmente durante el primer trimestre, encontrándose en altas concentraciones en el suero de las embarazadas, coincidiendo así con la elevación de variados mecanismos de evasión inmune trofoblásticos que se mencionan en este proyecto, como lo es MIC soluble. Al término de la gestación, caen los niveles de IL-10 y de otros mecanismos evasivos, dando paso a una señal pro inflamatoria dada principalmente por Prostaglandina E2.¹³⁵ En el mismo contexto, se demostró que el receptor de IL-10R1 está constitutivamente expresado en citotrofoblasto, con mayores niveles en el primer trimestre de la gestación, con una señalización intracelular mediante el sistema Jak1/Stat3.¹³⁶

Finalmente, poco se conoce en cuanto al efecto que ciertas citoquinas podrían tener sobre el sistema NKG2D/NKG2DL. En este sentido, se ha documentado que la expresión de MIC, pueden ser inducidas por ácido retinoico y por IFN- α ¹⁰⁷ y que TGF- β inhibe la transcripción de la molécula MIC en células de glioma.¹³⁰ Por otro lado, no se ha encontrado información que la relacionen con las moléculas NKG2DLs, a pesar de estar relacionada a la síntesis de la cadena alfa de MHC-I y TAP.¹³⁷ Además, está presente en un ambiente tumoral y aumentada durante el embarazo,¹³⁸ donde se ha reportado, en ambos

casos, la presencia de moléculas MIC solubles en los sueros y acumulación en retículo endoplásmico, como mecanismo evasivo de la inmunidad innata.^{117, 119}. IL-10 se expresa en placenta de una forma dependiente de la edad gestacional, y disminuye hacia el final del embarazo, dentro de los cambios asociados con el parto.³⁴

4.15. Calreticulina

El RE es un organelo esencial para la síntesis y maduración proteica. Es un reservorio y fuente de señales de Ca^{2+} . Cualquier perturbación de sus funciones puede resultar en la acumulación de proteínas mal plegadas y posterior falla de su funcionamiento. El RE contiene proteínas chaperonas que están fisiológicamente involucradas en modificaciones post-traduccionales, formación de enlaces disulfuro, plegamiento y control de las nuevas proteínas sintetizadas para preservar la homeostasis celular. En el estrés de retículo, el aumento de las chaperonas es clave para la supervivencia celular, facilitando el correcto plegamiento de proteínas y previniendo su agregación. Estas pueden organizarse en tres grupos: (a) chaperonas de la familia de las HSP, que incluye a GRP78, GRP94 y co-chaperonas; (b) chaperonas tipo lectinas como Calnexina (CNX), Calreticulina (CRT); y (c) chaperonas sustrato específicas como Hsp47. Además, existen dos grupos chaperonas que catalizan el plegamiento proteico, llamadas tioloxidoreductasas de la familia de las PDI, GRP58/Erp57 y PPIs.¹³⁹

CNX y CRT se asocian con la mayoría de las glicoproteínas que pasan a través del RE, pero preferentemente lo hacen entre ellas. Esto dado por el hecho que CNX y CRT son lectinas específicas para oligosacáridos transientes, que estén en un nivel intermedio de procesamiento y que posean un residuo terminal de glucosa específico. También ligan ATP, Ca^{2+} , Zn^{2+} y a Erp57, la cual es una de las principales tioreductasas del RE.¹⁴⁰ Juntas, CNX, CRT y Erp57 forman el sistema CNX/CRT, que es responsable del control de calidad y ensamblaje de las nuevas glicoproteínas sintetizadas. Los sustratos para el ensamblaje se asocian de forma transiente con CNX y CRT, entran a un ciclo de glicosilación/re-glicosilación, proceso que es muy importante en la asociación con chaperonas.

CRT es una proteína que se distribuye de forma ubicua en las células del organismo, se encuentra presente en un amplio rango de especies y es la principal proteína de unión de Ca^{2+} a nivel intracelular. Es una proteína ampliamente conservada, con sobre

un 90% de homología aminoacídica entre humanos, conejos, ratas y ratones, además de presentar un alto nivel de homología en su secuencia de cDNA con CRT de *Drosophila*. Y de plantas.¹⁴¹ Además de las funciones de chaperona tipo lectina, CRT participa en la modulación de la expresión génica, inducción de la fagocitosis de células apoptóticas, procesos autoinmunes, es antiangiogénica, inhibe el crecimiento tumoral, y participa en la actividad lítica de perforinas de células T y NK.¹⁴²

Si bien CRT presenta una secuencia de destinación al RE, KDEL, ha sido detectada en otros compartimentos intracelulares, incluida la superficie celular. En cuanto a su estructura, tiene dominios estructurales y funcionales. Característicamente, todas las proteínas CRT presentan un dominio ácido C-terminal, un dominio P, rico en prolina, y un dominio globular N-terminal. Es importante destacar que: (a) existe un dominio S, el cual está incluido en los dominios N y P, y está involucrado en la unión de componentes del Sistema de Complemento; y (b) que el dominio N incluye 60 aminoácidos del dominio C-terminal, los cuales tienen propiedades antiangiogénicas, debido a su capacidad de inhibir la proliferación celular endotelial.¹⁴²

El dominio N-terminal (aminoácidos 1-180) presenta una estructura globular, con 8 láminas beta antiparalelas y un puente disulfuro. Esta región une Zn^{2+} , e interactúa *in vitro* con chaperonas de RE y con dominios de unión al DNA de algunos receptores nucleares. Este dominio es muy importante, ya que junto al dominio P, es responsable de la función chaperona.¹⁴³ Se ha visto que mediante mutagénesis sitio-dirigida de un residuo de Histidina (H) del dominio N-terminal, se interrumpe la función de chaperona de CRT.¹⁴⁴ La H se localiza en el extremo de un giro de una lámina beta corta, la cual se encuentra en la interfase entre los dominios N y P. Este dominio podría influir significativamente en la forma del bolsillo de unión a sustrato (carbohidratos).¹⁴³

Recientemente, se ha documentado que la inoculación de un vector que transporta el gen que codifica para vasostastina, segmento amino terminal de CRT, afecta la citotoxicidad de las NK al disminuir los receptores MIC en la superficie celular de los tumores.¹⁴⁵ Por otro lado, investigaciones recientes, revelan que CRT regula negativamente la expresión en membrana de proteínas, como es el caso de un regulador de conductancia de fibrosis quística CFTR, donde la utilización de un RNAi de CRT induce aumento de CFTR en la superficie celular.¹⁴⁶ Al igual que las moléculas MIC, se conoce el aumento de

la expresión del CRT en respuesta al estrés.¹⁴⁷ Además CRT y otras chaperonas son fundamentales en el plegamiento de proteínas del complejo de histocompatibilidad,¹⁴⁸ de la cual MIC pertenece. Por todo lo anteriormente expuesto postulamos que Calreticulina participa del plegamiento de los NKG2DL

5. HIPÓTESIS

En síntesis: MIC es una molécula de transmembrana que se encuentra acumulada en el sistema reticular y/o es secretada en modelos de escape inmune, como lo son las células del trofoblasto y neoplasias. Vasostatina, la porción aminoterminal de CRT, altera la expresión de moléculas MIC en la superficie de células tumorales, transfectadas con el gen; CRT regula negativamente la expresión de otras moléculas de transmembrana. Se postula aquí que Calreticulina participa en la expresión en la superficie de MIC y acumulación intracelular. Por otro lado, IL-10 es una citoquina predominante del primer trimestre de la gestación, en donde aparecen los mecanismo evasivos como sMIC, además, esta citoquina regula la actividad de moléculas asociadas al ensamble del complejo principal de histocompatibilidad. Además, IL-10 es un reconocido inmunomodulador de la evasión tumoral.

Con los antecedentes expuestos, se plantea:

Calreticulina se asocia con las moléculas MICA en células de trofoblasto y de melanoma maligno e IL-10 disminuye la expresión del ligando MICA en melanoma maligno reduciendo la capacidad efectora de las células NK medida en un ensayo citotóxico.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Determinar nuevos mecanismos de regulación negativa de los ligandos del receptor NKG2DL relacionados con la evasión inmune

6.2. Objetivos Específicos

O.E.1: *Localizar MIC en compartimentos intracelulares de células de trofoblasto y melanoma, colocalizando con proteínas chaperonas*

O.E.2: *Obtener la proteína MIC de células de trofoblasto por inmunoprecipitación en conjunto con las proteínas asociadas*

O.E.3: *Estudiar unión directa entre MIC y Calreticulina mediante análisis de interacción de proteínas recombinantes*

O.E.4: *Estudiar en un modelo de cultivo de melanoma maligno la modulación de la expresión de MIC por IL-10*

O.E.5: *Estudiar en un modelo de cultivo de melanoma maligno la modulación de la expresión de chaperonas por IL-10.*

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Soluciones Generales

- Tampón Gel Resolutivo: 1,5 M: SDS 1 g, Tris base 45,5 g., agua 250 mL, pH 8,8.
- Tampón Gel de Concentración: SDS 1 g, Tris base 15,5 g, agua 250 mL, pH 6,8.
- Tampón de Carga para proteínas 3x: 1,9 mL de tampón Tris 1M pH 6,8, 3 mL de glicerol 100%, 1,5 mL de β -Mercaptoetanol, 3 mL de SDS 20%, azul de Bromofenol (punta de espátula), 600 μ L de agua destilada.
- Tampón Tris 250 mM/Glicina 2 M: Tris base 30,3 g., Glicina 150,1 g, agua csp, pH 8,15.
- Tampón de Corrida: Tris 250 mM/glicina 2 M 100 mL, SDS 20% 5 mL, agua completar 1L.
- Tampón de Transferencia: Tris 250 mM/glicina 2M 100 mL, metanol técnico 200 mL, agua completar a 1 L.
- Solución de Tinción Azul de Coomassie: Azul de Coomassie brillante R-250 1 g, metanol 500 mL, ácido acético 25 mL, agua 400 mL.
- Solución destinción Azul de Coomassie: Metanol 100 mL, ácido acético 25 mL, agua 800 mL.
- Rojo Ponceau 1%: Rojo Ponceau 1 g, ácido acético 10 mL, agua 90 mL.
- Tampón de lisis RIPA: NaCl 150 mM, Tris pH 7,4 10 mM, EDTA 5 mM, ácido Deoxicólico 1%, SDS 0,1% (luego de ajustar el pH), Tritón 100x 1%, agua, ajustar a pH 7,2.
- Cóctel de inhibidores de proteasas: Pepstatina 1 μ g/mL, Aprotinina 5 μ g/mL, Leupeptina 5 μ g/mL, PMSF 1 mM/mL (agregar a Tampón RIPA justo antes de usar).
- Tampón MOPS: MOPS 0,2 M, acetato de Sodio 50 mM, EDTA 10 mM, agua DEPC estéril, pH 7 (ajustada con NaOH 2 M). Filtrar solución con filtro Milipore 0,45 μ m.
- Tampón TBE 5x: Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3-8,7.
- Tampón de carga de DNA 6x: Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), azul de Bromofenol 0,03%, Xilencianol 0,03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM.
- Tampón TE 20x: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7- 8. Autoclavado
- Medio LB: Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, Agar 15 g/L. Autoclavado.

- Placas LB Agar: Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L. Se ajustó a pH 7,0. Autoclavado.
- Medio crecimiento células HEK completo: DMEM-F12, FCS10%, L-Glutamina 1%, Penicilina Estreptomicina 1%, Tilosina 1 µL/mL de medio.
- PBS: NaCl 250 mM, KCl 20 nM, NaHPO 48 mM, K HPO 1,5 mM. Se autoclavó.

7.2. Muestras de tejido y cultivos celulares

7.2.1. Muestras de placenta humana de abortos espontáneos del primer trimestre

Se obtuvieron 12 muestras de entre 3 a 5 cm² de legrados programados provenientes de placentas humanas de abortos espontáneos del primer trimestre de gestación, donadas gentilmente por el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José del Servicio de Salud Metropolitano Norte, en colaboración con el Jefe del Servicio de Maternidad Dr. Marcos Clavero Pérez. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte a través del Director de ética Dr. Carlos Navarro Cox y el Director del centro asistencial, Dr. Carlos Bottner (*Anexo 1*) También se aprobó el consentimiento informado redactado por la responsable clínica del proyecto Dra. Mercedes López N, del Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM (*Anexo 2*) Se tomaron muestras de 1 mL de sangre a las pacientes que fueron sometidas a legrado post-aborto previa firma de consentimiento informado, para determinaciones séricas en el futuro no comprendidas en esta tesis. Los criterios fueron: De inclusión: Placentas humanas del primer trimestre tardío entre 8 a 15 semanas de gestación, que no presenten infección asociada a la pérdida. De exclusión: Placentas de que no estén entre 8 a 15 semanas, o con diagnóstico de pérdida por infección en útero placentaria. Pacientes portadoras de virus HIV y Hepatitis B y/o C. Embarazos ectópicos y molas. Se elaboró una ficha de muestreo para su clasificación (*Anexo 3*).

7.2.2. Cultivos Primarios de Células de Trofoblasto

Muestras de legrados se seccionaron en pequeños trozos en esterilidad. Se preparó una solución de separación celular consistente en 50 mL de HBSS (*Hanks solution*) (Invitrogen-EEUU) con cloruro de magnesio, 100 IU/mL penicilina y 100 mg/mL de

estreptomina (Hyclone-Canada), Gentamicina 1 µg/mL (Lab.Chile) Hialurodinasa 8 mg/mL (Sigma-EEUU), Colagenasa 8 mg/mL (Sigma-EEUU) y 50 U/mL de Desoxirribonucleasa (Sigma-USA). El tejido en la solución de separación se agitó a 37°C por 2 horas a 5% CO₂ en agitador orbital. La suspensión celular se separó de restos de tejido sin degradar mediante *Cell Strainer* (BD Biosciences, EEUU). Las células se contaron y sembraron en razón de 1x10⁶ /mL en medio RPMI 1640 (Invitrogen-EEUU) 10% Suero fetal bovino (FCS) (Hyclone-Canada).

7.2.3. Cultivo Líneas Celulares

Líneas de melanoma BL mel y FMS mel derivan de lesiones metastásicas de pacientes tratados en el Hospital Radiumhemmet, Karolinska. La línea de melanoma FM55 mel se obtuvo de la Sociedad Danesa de Cáncer, cedida por el Dr. J. Zeuthen. La línea de melanoma ocular OCM-1 mel provino de una donación por parte del Dr. M. Jager de la *University of Leiden* de Holanda. Las líneas de melanoma transducida con el retrovirus Hy-TK-*human* IL-10 (BLH), Hy-TK-*viral* IL-10 (BLV) Hy-TK- *Mock* (BLP) se establecieron por el Dr. Flavio Salazar-Onfray en un trabajo previo.¹⁴⁹ Estas últimas se mantuvieron en cultivo con 20 µg/mL y se seleccionaron con 300 µg/mL de Higromicina B (Invitrogen, EEUU). Todas las líneas de melanoma y la línea de eritroleucemia K562 (ATCC, EEUU) se cultivaron a 37°C y se alimentaron 2 a 3 veces por semana en RPMI 1640 suplementada con 5% suero fetal de bovino (FCS), 1 mM glutamina, 100 IU/mL penicilina y 100 mg/mL de estreptomina (Hyclone, Canada). Las células para transfección HEK 293.T se mantuvieron en medio DMEM F12 (Hyclone, EEUU) suplementado con 5% FCS. Todas las líneas celulares almacenadas en crioviales en nitrógeno líquido, se descongelaron en agua a 37°C y lavadas 3 veces en 2,5 mL de RPMI %5 FBS, centrifugando a 1200 rpm por 3 min. La concentración final de células en la siembra fue de 1 a 1.5 x 10⁶ células/mL aproximadamente.

7.3. Análisis de Microscopía

7.3.1. Inmunohistoquímica

Las muestras para los estudios de inmunohistoquímica de placenta humana de primer trimestre se fijaron en paraformaldehído 1%-PBS (Merck-Alemania) y luego se

deshidrataron en gradiente ascendente de etanol 70, 95 y 100 %, aclaradas en Xilol (TCL-Chile) y se embebieron en parafina líquida en autotécnico automático (Leica-Alemania). Para el estudio en melanoma maligno se seleccionaron muestras de tejidos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Carabineros. Las inclusiones de tejido en parafina se cortaron en micrótopo de rotación RM2125 (Leica-Alemania) del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Cortes de 4 µm se montaron en portaobjetos silanizados, desparafinaron y rehidrataron en escala descendente de etanol hasta agua destilada.

Aquellos cortes de melanoma intensamente pigmentados, se sometieron a un blanqueamiento de melanina en una solución de permanganato de potasio al 0.05% (Sudelab-Chile.) durante 1 a 2 horas y luego revelados en una solución de ácido oxálico al 0,1% hasta la desaparición del color.

La inmunohistoquímica se desarrolló como sigue: Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 min. Después de un lavado con PBS, los cortes se incubaron con PBS-BSA 1% por 10 min. Sin lavar, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales anti: HAI-1 (clon C76/18) gentilmente donado por el Dr. Hiro Kataoka (U. de Miyazaki, Japón) como control positivo de tejido placentario, MART-1 (Dako-Cytomation-Dinamarca) como control positivo de melanoma, MICA y MICB (R&D Systems-EEUU), IL-10 (Santa Cruz Biotechnology-EEUU), anti: MICA/B (clon D7) gentilmente donado por el Dr. Norberto Zwirner (U. de Buenos Aires, Argentina) e IgG como control (E-Bioscience, EEUU). Luego de 3 lavados con PBS de 5 min cada uno, los cortes se incubaron durante 15 min, con anticuerpo policlonal de conejo anti inmunoglobulinas de ratón Biotinilado (KPL-EEUU). Se repitió el lavado y se aplicó por 15 min el sistema de revelado streptavidina-peroxidasa-DAB (Zymed-EEUU). Después del lavado se incubó con el substrato *DAB Plus Substrate Kit* (Zymed-EEUU) por 5-15 min. Los preparados histológicos fueron fotografiados en microscopio Leica con sistema de captura de imagen digital Olympus C3030. (Japón).

7.3.2. Inmunofluorescencia de Células de Trofoblasto y Melanoma en Cultivo

Un número de 1×10^4 células provenientes de cultivo primario de trofoblasto se adhirieron a portaobjetos silanizados mediante centrifugación de portaobjetos (Sakura, Japón), gentilmente facilitada por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Urgencias Asistencia Pública. Por otra parte, entre $1-5 \times 10^4$ células de líneas de melanoma maligno se sembraron en cubreobjetos redondos en placa de 24 pocillos por toda la noche en medio RPMI 1640 suplementado.

Portaobjetos y/o Cubreobjetos con células adheridas se fijaron con metanol frío a -20°C durante 30 s. Se lavó 3 veces con PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con PBS-BSA 1% (Rockland-EEUU), por 15 min a temperatura ambiente. Luego se incubó durante toda la noche a 4°C con 0,1 ng/mL de anticuerpos monoclonales anti: MICA y MICB (R&D Systems-EEUU), previamente conjugados mediante Kit *Alexa Fluor 488 Monoclonal Labeling Kit* (Molecular Probes-EEUU). Los anticuerpos anti calreticulina (BD Bioscience-EEUU), Calnexina y Erp-57 (Santa Cruz Biotechnology-EEUU) se conjugaron con fluorocromo *Zenon Alexa Fluor 647-R-Ficoeritrina* (Molecular Probes-EEUU). Ambos fluorocromos se utilizaron con longitud de onda de excitación para láser de Argón de 488 nm. Se utilizó anticuerpo monoclonal IgG2b Alexa Fluor 488 (Santa Cruz Biotechnology-EEUU) como control negativo. Después de 3 lavados con PBS, se utilizó además 300 nM de tinción nuclear DAPI (Molecular Probes, EEUU) por 30 s, previo al uso de medio de montaje para fluorescencia (Dako-Cytomation-Dinamarca). El análisis se realizó con un Microscopio Confocal (Carl Zeiss-Alemania) con un módulo de escáner LSM5 PASCAL (FONDAP-CEMC, ICBM, Universidad de Chile). Las imágenes se colectaron por separado y se mezclaron mediante el software PASCAL. (Carl Zeiss-Alemania)

7.4. Análisis de Expresión de Proteínas

7.4.1. Inmunoprecipitación

Se lisaron de 0.5 a 1×10^6 células por condición, mediante adición de 200 μL de Tampón RIPA pH 7,2 (150 mM NaCl (Winkler-Chile), 10 mM Tris pH 7,4 (Winkler -Chile), 5 mM EDTA (Winkler -Chile), 1% Ac. Deoxicólico (United States Biochemical Corporation-EEUU), 0.1% SDS (Winkler -Chile), 1% Tritón 100 (Sigma-EEUU))

conteniendo un cóctel de proteasas de Pepstatina 2 ng/mL (Sigma-EEUU), Aprotinina 10 ng/mL (Sigma-EEUU), Leupeptina 50 ng/mL (Sigma-EEUU) y PMSF 1 mM (MPBio, USA). Las muestras se incubaron en rotación a 4°C por 10 min. Luego se centrifugaron a 13.000 g a 4 °C durante 10 min. Se recolectó el sobrenadante, al que primero se le realizó un preclareado. Al sobrenadante recolectado se le agregó una punta de espátula de Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech -Reino Unido) junto con anticuerpo monoclonal del mismo isotipo de la inmunoglobulina utilizada para la inmunoprecipitación específica o suero de conejo sin inmunizar (SNC) cuando el anticuerpo usado para la inmunoprecipitación fue un policlonal de conejo (1 µg/µL), se completó a 1 mL con PBS. Se dejó en rotación a temperatura ambiente durante 1 h (o toda la noche a 4° C). Se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos. Se colectó el sobrenadante al que nuevamente se le agregó una punta de espátula de Sefarosa junto con el anticuerpo de interés (1 µg/µL). Se dejó en rotación a temperatura ambiente durante 2 h (o toda la noche a 4 °C). Se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado 5 veces agregando 1 mL de PBS.

7.4.2. Inmunoelectrotransferencia (*Western Blot*)

Se agregó tampón de carga 3x y se calentó la muestra a 98 °C durante 5 min. Posteriormente, se procedió a separar las proteínas en un gel de SDS-PAGE al 10% v/v montado en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN III (BioRad-EEUU). Se aplicó, en el gel concentrador 50 V y en el gel de corrida 100 V. Luego se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham-Reino Unido), de acuerdo a la metodología descrita por Towbin,¹⁵⁰ utilizando un sistema húmedo de transferencia horizontal de proteínas Mini-PROTEAN III (Bio-Rad-EEUU) Se colocó el gel y la nitrocelulosa entre dos papeles de filtro, a cada lado, orientándose la transferencia hacia el cátodo. Luego, se aplicó una corriente de 100 V, y aproximadamente 0,8 mA, a 4°C, durante 1 h. Se bloquearon los sitios libres con proteínas de leche descremada al 5 % p/v en PBS pH 7,2, durante toda la noche en agitación a 4° C. Posteriormente, se lavó tres veces la membrana con PBS-Tween al 0,05% v/v, cada 5 min, por 4 veces, agitando constantemente y se agregó el anticuerpo primario de interés diluido en PBS-leche al 3% p/v (1:500) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Se lavó 7 veces con PBS-Tween al 0,05% v/v.

Se agregó el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido en PBS-leche al 3% p/v (1:500). Se lavó 5 veces con PBS-Tween al 5% v/v. Finalmente se incubó con sustrato *ECL Western Blotting Substrate* (Pierce-Reino Unido) en agitación a temperatura ambiente durante 5 min y se montó la membrana para una posterior visualización de la reacción de quimioluminiscencia, en chasis de revelado fotográfico utilizando revelador D-76 y fijador E-6 (Kodak, Brasil) y película (Pierce, USA).

7.5. Análisis de Interacción de proteínas recombinantes

7.5.1. ELISA de interacción entre CRT y MICA recombinantes de origen procarionte.

Se sensibilizó durante toda la noche a 4°C una placa dura de fondo plano de 96 pocillos Maxisorp (Nunc-Dinamarca) con 100 µL/pocillo de 0, 3, 6 y 12 µg/mL de proteína MICA recombinante, generada previamente en nuestro laboratorio en un sistema de expresión de *Escherichia coli* BL21. Posterior a la sensibilización se realizaron 5 lavados con PBS-Tween-BSA-1%. Luego se bloqueó con 200 µL/pocillo de PBS-Tween-BSA-1% durante 1 h a 37°C. Utilizando una concentración madre de 0,58 mg/mL, se agregó la muestra de 100 µL/pocillo de Calreticulina recombinante humana, donada gentilmente por el laboratorio del Dr. Arturo Ferreira (ICBM-U. de Chile), en concentración de 0, 3, 6 y 12 µg/mL por triplicado. Se incubó la placa por 2 h a 37°C. Luego se incubó una solución de anticuerpo policlonal de conejo anti-Calreticulina humana en 100 µL/pocillo a una dilución 1:2500 (0,025 ng/mL), durante 1h a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween-BSA-1% se agregó 100 µL/pocillo de conjugado anti conejo en dilución 1:500 (0,5 µg/mL) en incubación por 1h a 37°C. La actividad HRP se evaluó por la adición de 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzotiazolin sulfónico) (ABTS) (Sigma-Aldrich-EE.UU.) con H₂O₂ al 30% en dilución 1:1000. La densidad óptica se leyó a 405 nm en un lector de ELISA automático (Bio-Rad-EE.UU.) a los 5, 10 y 15 minutos.

7.5.2. Transformación de Bacterias

Como hospederos de clonación se utilizó *Escherichia coli* LeDH5α, cultivadas en medio LB (0,5 % p/v Extracto de levadura, 1 % p/v Peptona, 1% p/v NaCl (Merck, Alemania). Se prepararon placas Petri con medio LB 0,25% p/v - Agar 0,15 % p/v, 50

ug/mL ampicilina, se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C. Se usó el pCMV-SPORT6-MICA (Clone ID 4446575) y el pCMV-SPORT6-MICB (Clone ID 6025253, Invitrogen-EEUU). A 40 µL de bacterias *E. coli* DH5α competentes se les agregó 10 µL del producto de la ligación. Se incubó en hielo durante 30 min, seguido de una incubación a 42°C durante 1,5 min y nuevamente en hielo por 2 min. Se sembraron 100 µL en una placa agar-LB con ampicilina 100 µg/mL (Sigma-EEUU). Las placas se incubaron a 37° C durante toda la noche.

7.5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa de Colonias de Bacterias

Transformadas

Una muestra de colonia se tomó con punta de pipeta y se agitó en 50 µL de agua destilada, luego se calentó a 100 °C por 5 min. Se tomaron 5 µL para realizar el PCR en 25 µL totales de reacción. Tal como sigue: 5 µL de vector, 2,5 µL de tampón Taq Polimerasa 10x, 0,5 µL de dNTPs 10mM (New England Biolabs-Reino Unido), 0,5 uL de cada partidor a 10mM, finalmente la 0,25 µL de enzima DNA polimerasa Taq 5 U/ µL (Pyrobest-Japón) en un volumen final de 25 µL, El contenido de la misma punta se expandió en otra placa LB-agar como respaldo de bacterias luego del PCR de colonias. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y tinción con 1 µL de SYBR Green ® (Molecular Probes-EEUU) en 25 µL totales. La expansión de colonias se realizó en 20 mL de LB (Merck-Alemania)-100 µg Ampicilina (Sigma-EEUU) y se incubó a 37° C toda la noche en agitación. Al día siguiente, se realizó el mini preparado para separar el DNA plasmidial del DNA genómico bacterial, utilizando el Kit. *QIAprep Spin*, (Qiagen-EEUU), cuyos productos se cuantificaron mediante nano-espectrofotometría (NanoDrop-EEUU). Finalmente, las muestras se analizaron por secuenciación automático utilizando los servicios de *Nuffield Department of Medicine* de la Universidad de Oxford-Reino Unido.

7.5.4. Digestión con enzimas de restricción

Con el objetivo de separar los fragmentos génicos para la clonación. el DNA plasmidial extraído mediante mini preparados, se digirió mediante enzimas de restricción específicas para el vector de origen pCMV-SPORT6 y para el de destino pHLSec-Avitag¹⁵¹, detallados ambos en el Anexo 5.

Las reacciones de digestión se llevaron a cabo por 4 horas a 37 °C, seguido de un período de calentamiento 65°C por 20 min a y enfriando a 4°C toda la noche. Se utilizó la cantidad de DNA de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Molaridad} = [(\mu\text{g}/\mu\text{L}) / (\text{pares de bases} \times 650 \text{ dalton})] \times 2$$

Se utilizó 1 μL de las enzimas Kpn y AgeI (New England Biolabs-Reino Unido), 0,5 μL de BSA y 5 μL de tampón 10X, completando con agua destilada hasta un volumen de 50 μL totales. Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (BioRad-EEUU) y se extrajo el DNA digerido mediante el kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen-EEUU)

7.5.5. Ligación de DNA en vector de expresión

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando las cantidades adecuadas de inserto y vector para una razón molar de 3:1, respectivamente. Para un volumen final de 10 μL , se utilizaron 3 unidades de *Quick Ligase* y tampón 2X (New England Biolabs-Reino Unido). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 5 min.

7.5.6. Transfección de células eucariontes

Debido a su buena susceptibilidad de transfección se utilizaron las células HEK293T, hasta una confluencia óptima de 90%. Para un pocillo de placa de 6, se requirieron 5 ng de DNA plasmidial disueltos en 2 mL de medio DMEM F-12 (Invitrogen-EEUU). Se generaron 5 μg de vector y se realizó la transfección a un millón de células HEK-293, utilizando (Invitrogen-EEUU) durante cuatro días en condiciones de cultivo estándar en medio DMEM. Al finalizar la incubación se realizó un western blot anti His-Tag, para determinar la efectividad de la transfección de célula total y de sobrenadante de cultivo. Los sobrenadantes positivos para la transfección se cuantificaron mediante nano-espectrofotometría (NanoDrop-EEUU) para los estudios de BIAcore.

7.5.7. Surface Plasmon Resonance BIAcore

La preparación del ligando se realizó como sigue: 2 mL de sobrenadante de cultivo de células HEK293T transfectadas fueron diluidos con 4 mL de PBS. Se agregó 400 μL de resina *Talon* por 24 horas en agitación a 4°C. Esta resina basada en iones cobalto es afín a

segmentos de poli-histidina, con mayor rendimiento que las columnas basadas en níquel. Al otro día se lavaron con 4 volúmenes de 10 mM Tris (pH 8,0) se resuspendieron en 500 μ L de Tris 10 mM pH 8,0. Se transfirió a un tubo eppendorf agregando 100 μ L del componente rojo del *Kit Biotin Protein Ligase* (Avidity, Reino Unido) y 100 μ L del componente azul. Se incubó por 24 h en agitador orbital a 4°C. Se lavó la resina en columna de plástico desechable (Millipore-EEUU) con 4 volúmenes de PBS-10 mM Tris (pH 8,0). Se eluyó con 300 mM imidazol en PBS 10 mM Tris (pH 8,0) diluido en HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl. Se colectó en fracciones de hasta 1 mL. Luego de medir concentración por nanoespectrofotometría (Nanodrop-EEUU), se diluyó hasta una concentración final de 1 μ g/ μ L en tampón Tris pH 8,0.

Se conjugó el chip *Biacore Sensor Chip* CM5 (BIAcore-Reino Unido) con una concentración de 1 μ g/ μ L de proteína MICA recombinante obtenida en tampón 10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% de Tween, con un máximo de muestra de 200 μ L. Se aplicó el analito (CRT recombinante) en una concentración de 1 nM, 5 nM, 20 nM, en Biacore 2000 (BIAcore-Reino Unido). Los datos se obtuvieron utilizando el software Biacore T100 version 2.0 (BIAcore-Reino Unido).

7.6. Análisis de transcripción génica

7.6.1. Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo a partir de 1 millón de células homogenizando con 1 mL de solución de Chomczynski (Winkler, Chile) utilizando el protocolo estándar como se describe:¹⁵² Se incubó a 4° C durante 10 min y se adicionaron 200 μ L de cloroformo, luego se agitó 30 veces por inmersión y se dejó reposando a 4° C durante 10 min. Se centrifugó a 13.000 rpm a 4° C durante 25 min. Se extrajo la fase acuosa y se le agregó un volumen igual de isopropanol, por 2 a 24 horas a -20° C. Transcurrido este período se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C durante 15 min. Se lavó el precipitado con etanol al 75% v/v (diluido en agua DEPC), se agitó durante 30 s y se centrifugó a 8.000 rpm durante 8 min a 4° C. Se dejó secar el precipitado durante 5 minutos y se resuspendió en 10 a 20 μ L de agua libre de RNAsa y finalmente se calentó a 65° C durante 10 minutos. La pureza del RNA se determinó mediante absorbancia a 260 nm/280 nm, considerando $1,8 < x \leq 2,0$ como óptimo. Valores menores corresponden a contaminación con proteínas o fenol. La

concentración de RNA total se determinó mediante absorbancia a 260 nm de acuerdo a la formula:

$$\mu\text{g/mL RNA} = (\text{Abs medida}) \times (40 \mu\text{g/mL}) \times (\text{factor de dilución})$$

La integridad del RNA total extraído se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % p/v en tampón MOPS 1x, utilizando un marcador de RNA (Fermentas, USA). Para esto se mezclaron 5 μL del RNA extraído con 5 μL de tampón de carga para RNA 2x y se corrió el gel durante una hora a 80 V. Finalmente, la integridad del RNA se comprobó en un transiluminador UV, siguiendo el patrón de migración de los RNAs ribosomales 28S y 18S.

7.6.2. Reacción semicuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita (sqRT-PCR).

La síntesis de cDNA se hizo una mezcla compuesta por 5 μL de RNA, 1 μL de oligo dT 100 μM y 7 μL de agua DEPC. Se incubó a 70° C y a 4° C por 5 min. A la mezcla se agregaron 4 μL de tampón StrataScript (Stratagene-EEUU) 5x y 2 μL de dNTPs (Bioaxis-Chile) 10mM y se incubó a 37° C por 5 min. Posteriormente, se agregaron 200 U/ μL (1 μL) de Transcriptasa Reversa SuperScript II (Stratagene-EEUU), y se incubó durante una hora a 37° C y luego a 70° C por 10 min. Mediante los programas Vector NTi y Oligoanalyser. Se diseñaron partidores para la detección de mRNA de MICA.

MICA-Forward	5'-GGGACAGTGGGCAGAAGAT-3'
MICA-Reverse	5'-TTCCAGGGATAGAAGCCAGAA-3'
MICB-Forward	5'-GGGACAGTGGGCAGAAGAT-3'
MICB-Reverse	5'-GGGGCACTGTTCTCCTGAT-3'

Se realizaron las siguientes etapas de PCR: Iniciación: 94°C por 15 s, alineamiento 50°C por 15 s, elongación: 72°C por 30 s, por 30 ciclos y término a 72°C por 30 s. Utilizando Taq polimerasa 5 u/reacción (Stratagene-EEUU) 20 μM de dNTPS (Promega-EEUU). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con Bromuro de Etidio (Winkler-Chile). La intensidad de la banda se calculó usando el software Scion Image (Scion Corp-EEUU). Las razones del mRNA de MICA y MICB se obtuvieron por el cociente de los niveles de mRNA de β -actina. Todos los oligos se sintetizaron por IDT (Coralville-EEUU).

7.6.3. Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita (qRTPCR)

Un millón de células de líneas de melanoma fueron se cultivaron en placa de 6 pocillos (Falcon-EEUU) durante 48 h y seguido de un protocolo de extracción de RNA a través del Kit Invisorb® Spin cell RNA (Invitek-Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se trató con Deoxyribonucleasa I (DNasa I) (Sigma-EEUU), en el cual a 4 µg de RNA extraído se le agregaron 4 µL del buffer 10X de la enzima DNasa I y en un volumen final de 36 µL de agua libre de nucleasas (Fermentas-EEUU), posteriormente se incubó la mezcla con 4 µL de la enzima DNasa I (4U) (Fermentas, USA), por 30 min a 37°C. Finalmente, se añadieron 4 µL de EDTA 25mM y se incubaron por 10 min a 65°C para inactivar la enzima. La integridad del RNA fue confirmado por electroforesis de agarosa en tampón MOPS pH 7,0. La mezcla para la retro-transcripción se realizó según protocolo indicado por el fabricante utilizando Brilliant® II SYBR® Green qPCR Master Mix, AffinityScript (Stratagene-EEUU). En breve, las muestras se incubaron por 5 min a 25°C, luego a 42°C por 5 min y finalmente 15 min a 55°C. El proceso de amplificación en el termociclador MX3000P (Stratagene-EEUU) se realizó con el siguiente programa: un ciclo de 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de: 30 s a 95°C, 30 s a 56°C, 30 s a 72°C, 7 s a 78°C. Posterior al período de amplificación se realizó la curva de disociación de los productos de PCR para la visualización de amplificaciones inespecíficas. Se realizó con un ciclo de 1 min a 95°C, 30 s a 55°C y 30 s a 95°C. Los datos se analizaron mediante el programa Mxpro-Mx3000P (Stratagene-EEUU) y los partidores utilizados fueron sintetizados por Alpha DNA (Canadá):

MICA-qPCR-forward	5'-CTGGCTGGCATCTTCCCTTTT-3'
MICA-qPCR-reverse	5'-CTCCTGGTGCTGTTGTCTTC-3
MICB-qPCR-forward	5'-TCTCACCAGCACTTTCCTCT-3'
MICB-qPCR-reverse	5'- TCTTCCACAGCCCTTCGTATTT-3
GADPH-qPCR-forward	5'-GTCAGCCGCATCTTCTTTTG-3'
GADPH-qPCR-reverse	5'-CATCGCCCCACTTGATTTTG-3

7.7. Análisis de efecto de interleuquina 10 por citometría de flujo

7.7.1. Estímulo con Interleuquina-10 (IL-10)

Las células del melanoma (3×10^5 células en 1,5 mL/pocillo) se incubaron en medio RPMI 1640 (Hyclone-EE.UU.) 3% FCS en placa de 6 pocillos (BD Falcon-EE.UU.) en presencia de 100, 200 o 400 U de IL-10 humana recombinante (IL-10r) (R&D Systems-EEUU), durante 48 h. El medio de cultivo se cambió por nuevo medio con IL-10r durante 24 h antes de los ensayos. La recuperación de células adherentes se realizó con solución de PBS-EDTA 2 mM y agitación por pipeteo.

7.7.2. Citometría de Flujo (FACS)

Células de trofoblasto y células de melanoma (2×10^5 en PBS-FCS 0,1%), sin estimular o estimuladas con IL-10r se incubaron con 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpos monoclonales (AcMo) anti: MICA (Clon: 159227), MICB (Clon: 236511), ULPB1 (Clon 170818), ULBP2 (Clon 165903), ULPB3 (Clon 166510), todos estos comprados a R&D Systems-EEUU. Anticuerpos anti HLA-A, B, C-AcMo (w6/32 Clon), IgG2b e IgG2a murino (como control negativo) se adquirieron a eBioscience-EE.UU. Las células se incubaron durante 30 min en hielo, se lavaron tres veces con PBS-1% FCS, y se tiñeron con 20 mg/mL de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con FITC (KPL-EEUU), durante 30 min en hielo. Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con el 1% de paraformaldehído en PBS-0,1% FCS. La lectura se realizó con un citómetro de flujo FACScanto, adquiriendo con el programa CellQuest (BD Biosciences-Alemania) y analizados utilizando WinMDI versión 2.9 del software (J. Trotter Scripps Research Institute-EEUU). Se adquirieron 1×10^4 eventos por muestra.

7.8. Análisis funcionales

7.8.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se mezclaron 50 mL de concentrados leucocitarios de donantes normales (*buffy coat*), donados por el Banco de Sangre del Hospital San José, con 40 mL de PBS estéril. Cada muestra se separó en tres tubos cónicos de 50 mL que contenían 10 mL de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare-Suecia) y se centrifugó durante 20 minutos a 1200 rpm, sin freno con una temperatura de 4°C utilizando una centrifuga refrigerada IEC modelo MP4R

(Maryland, EEUU). Después se transfirió la banda de mononucleares a tubos cónicos y se lavó tres veces con un volumen de 20 mL de PBS durante 4 min a 1400 rpm, resuspendiéndose en un volumen final de 15 mL para su cuantificación y determinación de viabilidad por exclusión con Azul tripán.

7.8.2. Enriquecimiento de NK y cultivo de células LAK

El enriquecimiento de células NK se obtuvo mediante un kit de selección negativa y columnas magnéticas LS (Miltenyi Biotec-Alemania) a partir de 50×10^6 PBMC siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis del fenotipo de las células NK se realizó por citometría de flujo, utilizando anticuerpo anti-CD14 conjugado con PE (BD Biosciences-EE.UU.) y anti-CD56 conjugado con FITC (BD Biosciences-EE.UU.). Previo al ensayo citotóxico las células se activaron con 150 U/mL de IL-2r (Tecnofarma, Chile) durante 12 h. Para el ensayo de Linfocitos Citolíticos Activados (LAK), $1,5 \times 10^6$ /mL PBMC se cultivaron en RPMI-10% FCS con 300 U/mL de IL-2r por 4 días.

7.8.3. Ensayo de liberación de ^{51}Cr

Se realizaron ensayos de liberación de ^{51}Cr tal como se describe previamente¹⁵³. Brevemente, 1×10^6 líneas de células de melanoma y las células K562 se marcaron con 5-10 μCi del radionúclido cloruro de ^{51}Cr en 0,5 M de HCl (Perkin Elmer-EE.UU.) durante 1 h a 37°C. Después del lavado, las células diana se co-incubaron en diferentes proporciones de NK/células LAK. Después de 4 h, 75 μL de sobrenadantes de cultivo se colectaron y se analizó radiactividad mediante un contador gamma Cobe Spectra (Packard-EEUU). Para determinar la liberación de ^{51}Cr espontánea de las células diana (cpm espontánea), se contabilizaron sobrenadantes de sólo células diana. Para determinar la máxima liberación de ^{51}Cr de las células diana (cpm máxima), se añadió Tween 20 al 1% a los pocillos. La actividad citotóxica se calculó como el porcentaje de liberación específica ^{51}Cr mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lisis} = [(cpm \text{ experimental} - cpm \text{ espontánea}) / (cpm \text{ máxima} - cpm \text{ espontánea})] \times 100.$$

Los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti NKG2D (Clon 1D11) (eBioscience, CA, EE.UU.) en los experimentos para el bloqueo del receptor, añadido a las células NK/LAK durante 30 min a 10 $\mu\text{g/mL}$, luego se lavaron

las células dos veces con PBS antes de la co-incubación con las células diana. Como control, las células efectoras se trataron con un anticuerpo monoclonal de isotipo IgG2b en las mismas condiciones (eBioscience-EE.UU.). Para el tratamiento con IL-10, las células diana se incubaron durante 72 h con 200 U/mL IL-10r (R&D Systems-EE.UU.). La recuperación de las células adherentes se realizó por pipeteo con PBS-EDTA 2 mM frío. Las células se marcaron con ^{51}Cr como se describió anteriormente.

7.8.4. ELISA para IL-10 humana en líneas celulares de Melanoma humano

4 x 10⁵ células del melanoma fueron se cultivaron en 0,5 mL de RPMI 10% FCS durante 48 h en una placa de 24 pocillos (BD Falcon- EE.UU.). Se analizaron triplicados de los sobrenadantes recolectados para cuantificar IL-10, utilizando el Kit *OptEIA* (BD Biosciences, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad HRP se evaluó por la adición de 2-2'-azino-di-(3-ethylbenziazolin sulfónico) (ABTS) (Sigma-Aldrich-EE.UU.) con H₂O₂. La densidad óptica se leyó a 405 nm en un lector de ELISA automático (Bio-Rad-EE.UU.).

7.9. Análisis Estadístico

Las diferencias entre grupos se calcularon con la prueba t de Student. Se utilizó ANOVA de dos vías para evaluar ensayos de cinética de las líneas celulares por citometría de flujo. Para el ensayo de citotoxicidad de liberación de ^{51}C se empleó un modelo lineal utilizando Tukey como prueba de comparación múltiple, así como con los experimentos con la secreción endógena de IL-10 de las líneas de melanoma transducidas con el gen de la citoquina. Todos estos datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 4 (La Jolla-EE.UU.). Un valor de p <0,05 se consideró estadísticamente significativo

8. RESULTADOS

8.1. O.E.1: Localizar MIC en compartimentos intracelulares de células de citotrofoblasto, colocalizando con proteínas chaperonas.

8.1.1. MICA y MICB se expresan en vellosidades coriales de placenta humana provenientes de legrados de abortos de primer trimestre

Luego de la aprobación por parte del comité de Ética del Servicio de salud Metropolitano Norte (*Anexo 1 y 2*), se inició la recolección de muestras de tejido de legrados programados en el Servicio de Maternidad del Hospital San José. Se obtuvieron 11 muestras, las cuales fueron fijadas y/o congeladas para el estudio de RT-PCR (*Anexo 5*) e inmunohistoquímica. Los tejidos para el análisis histológico se procesaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos con una inmunohistoquímica representativa de 3 determinaciones, utilizando anticuerpos específicos para detectar la presencia de MICA, MICB, HAI-1 e IL-10. La tinción con hematoxilina-eosina indica con aumento mayor, la zona histológica analizada (Figura 1). Se observa la marca de una clara distribución epitelial citoplasmática, de antígenos MICA y MICB en el borde de la vellosidad corial. La detección con el anticuerpo que reconoce indistintamente MICA y MICB resultó ser más potente que la de cada ligando por sí sola. Mediante el análisis histológico no es posible distinguir si se trata de sincitiotrofoblasto o citotrofoblasto. También se observa marcación de HAI-1, marcador específico para citotrofoblasto utilizado como control positivo, indicando así la zona de la barrera placentaria.¹⁵⁴ También se observa expresión de la citoquina inmunoreguladora IL-10, propia del útero grávido y presente en el primer trimestre de embarazo¹³⁸.

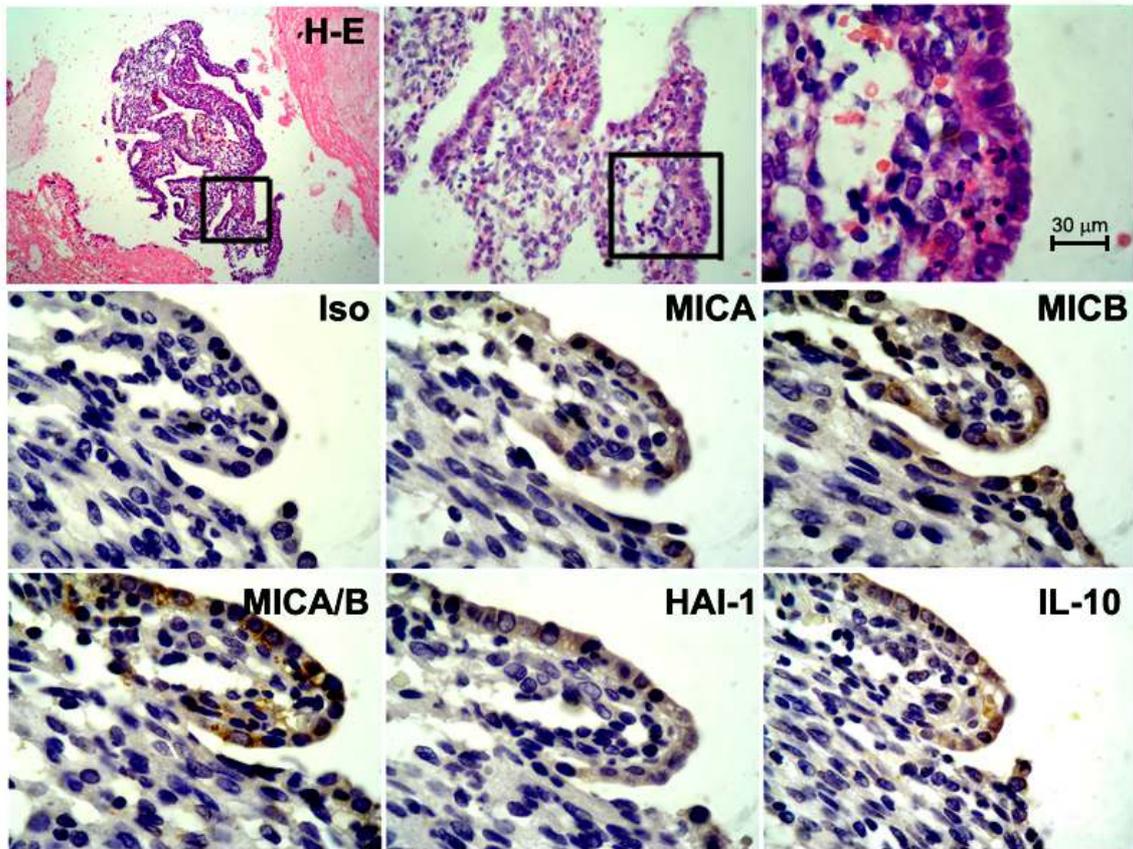


Figura 1.- Ligandos de NKG2D se expresan en vellosidades de trofoblasto de primer trimestre. Fotografías de microscopía óptica de secciones de cuatro micrones de trofoblasto incluido en parafina. Los cortes se incubaron con anticuerpos anti MICA, MICB, MICA/B, HAI-1, IL-10 y control de isotipo IgG2. El color café corresponde al depósito del cromógeno revelado de la tinción HRP-DAB contrastado con hematoxilina nuclear en azul. La figura es representativa de tres biopsias independientes que se analizaron. Se muestra tinción H-E de la zona histológica analizada, con aumento, lupa, menor y mayor. Se indica la barra de escala para del aumento utilizada en todas las fotografías de inmunohistoquímica.

8.1.2. MICA y MICB se expresan en melanoma maligno

Se estudió la presencia de los ligandos MICA y MICB en cortes de tejido de melanoma maligno. Mediante inmunohistoquímica se evaluó la presencia de estos ligandos utilizando anticuerpos monoclonales comerciales, para correlacionar las observaciones con las detectadas para el trofoblasto temprano (*Figura 2*). Se observó una marcada distribución citoplasmática de los antígenos MICA, MICB y MICA/B bajo las mismas condiciones técnicas desarrolladas para la *Figura 1*. Como control positivo del tejido analizado, se utilizó MART-1, antígeno tumoral ampliamente caracterizado para el melanoma

maligno,¹⁵⁵. Se detectó también IL-10 con el mismo patrón de distribución que los ligandos analizados, de acuerdo a la literatura.¹⁵⁶

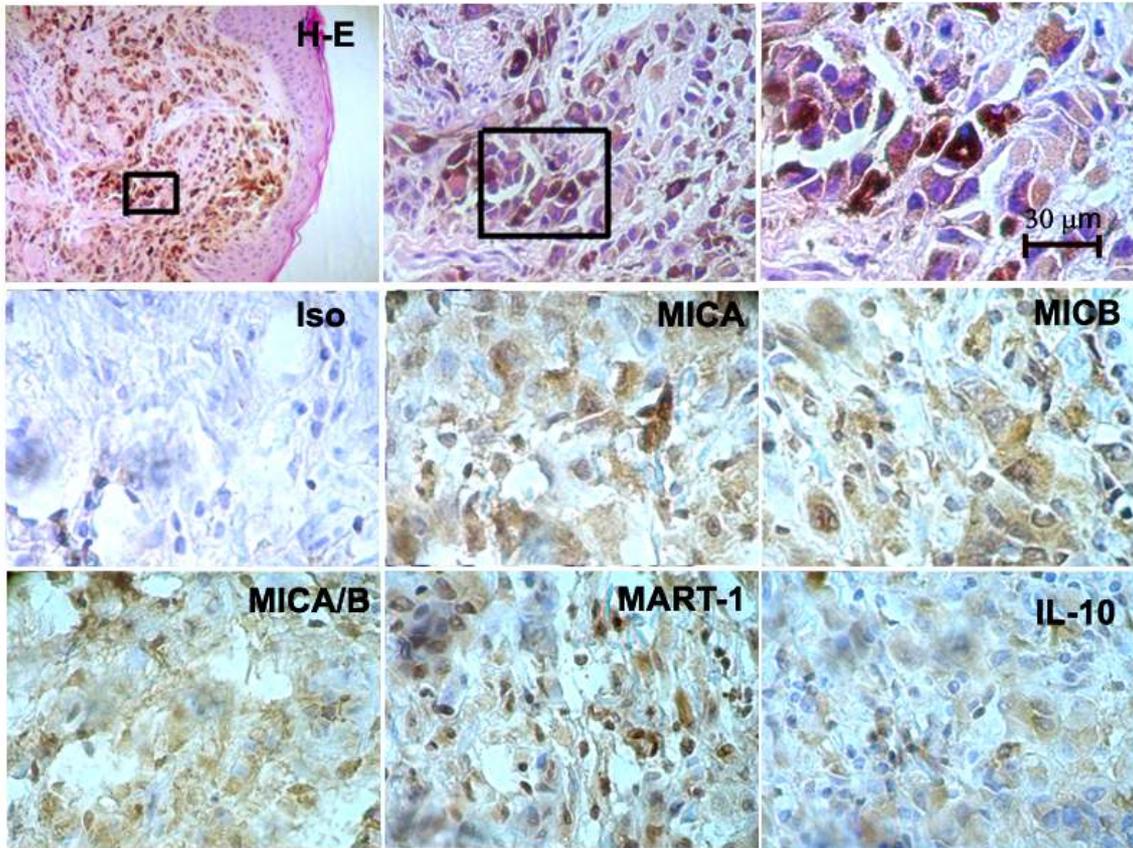


Figura 2.- Ligandos de NKG2D es expresado en melanoma maligno. Fotografías de microscopía óptica de secciones de cuatro micrones de biopsia de metástasis cutánea de un melanoma avanzado. Cortes de tejido incluidos en parafina fueron incubados con anticuerpos anti MICA, MICB, MICA/B, MART-1 e IL-10 o control de isotipo IgG2b detectando la expresión de MICA y MICB en melanoma. El color café es el revelado de la tinción HRP-DAB contrastado con hematoxilina nuclear en azul. Figura representativa de dos biopsias independientes. Se muestra tinción H-E de la zona histológica analizada, con aumento, lupa, menor y mayor. Se indica la barra de escala del aumento utilizada en todas las fotografías de inmunohistoquímica.

8.1.3. Superposición de chaperonas y MICA/B en el sinciotrofoblasto temprano de primer trimestre.

Con el propósito de analizar la expresión de las moléculas MIC por microscopía confocal y FACS, se establecieron cultivos primarios de células provenientes de muestras de legrados de abortos de primer trimestre, siguiendo el protocolo de separación de Percoll descrito recientemente por Stenqvist y colaboradores.¹⁵⁷ Mediante una solución en base a enzimas de degradación de matriz extracelular descrita en Materiales y Métodos se probaron 2 medios de cultivo, siendo el RPMI 10% FCS que mantuvo la viabilidad de las células por 24 h, determinada por tinción de azul tripán. A las 48 horas de cultivo el número de células vivas decreció y comenzaron a aparecer células de tipo fibroblásticas adheridas a la placa de cultivo. El uso del medio AIM-V libre de suero determinó que este último es esencial para la viabilidad de las células de cultivo primario debido a la ausencia total de células vivas a 24 h (*Anexo 6*).

Con el objetivo de detectar la localización celular de moléculas MIC y chaperonas, se realizó una determinación en microscopía confocal de MICA y MICB en las células de trofoblasto antes individualizadas y su colocalización con moléculas chaperonas Calreticulina (CRT), Calnexina (CNX) y Erp57 (*Figura 3*). En primer lugar llamó la atención que la presencia de los ligandos de NKG2D están presentes en células binucleadas, las que corresponden a sinciotrofoblasto, dato que concuerda con las últimas publicaciones del área.^{157, 158} Se detectan ambos ligandos de NKG2D en el interior de las células, con patrones de distribución similares entre sí. Se observa colocalización de CRT, CNX y Erp57 con MICA y MICB en células provenientes de suspensión de legrados de placenta de primer trimestre. En experimentos preliminares del laboratorio, mediante citometría de flujo y utilizando el anticuerpo anti-HAI-1 marcador de citotrofoblasto no se detectó expresión de MICB y solo muy bajos niveles de MICB en células HAI-1 positivas, (*Anexo 7*) lo que concordó con las recientes publicaciones del área que postulan a MICA/B como marcadores de sinciotrofoblasto.¹⁵⁷

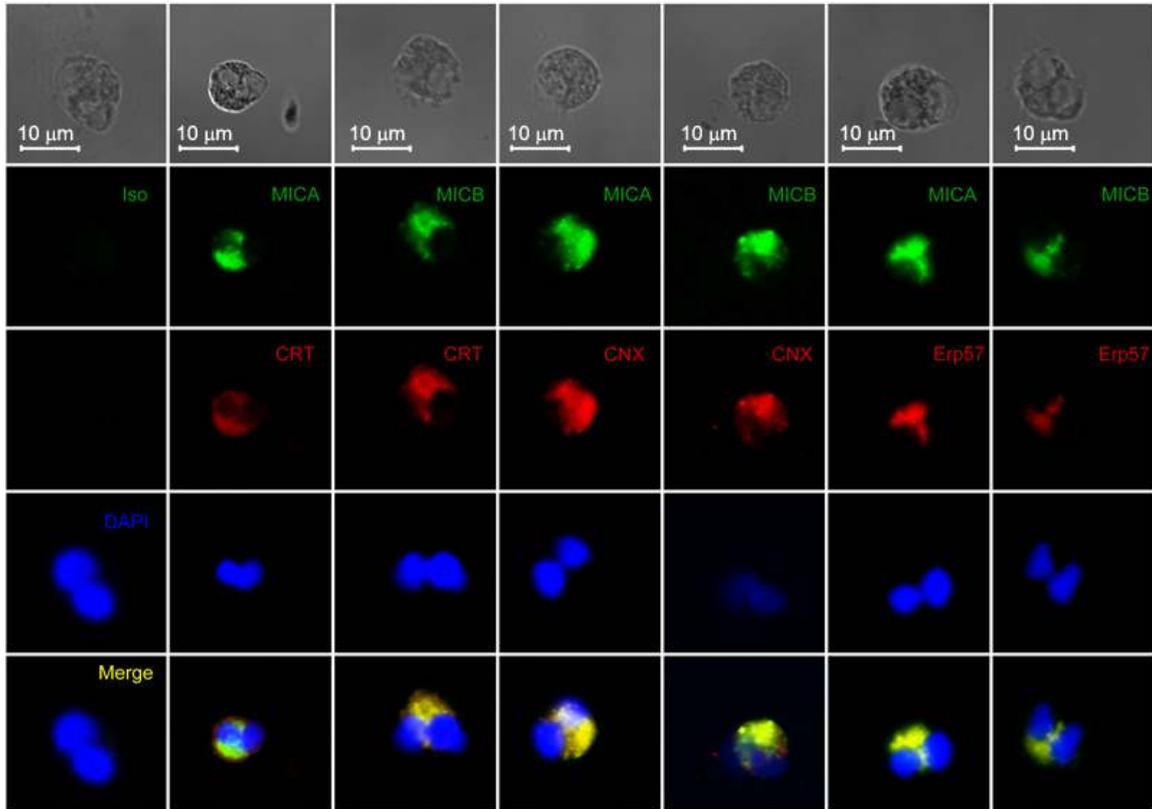


Figura 3.- MICA y MICB se expresan en el citoplasma de células de Sincitiotrofoblasto y se superpone con chaperonas de retículo endoplásmico. Fotografías de microscopia confocal de MICA y MICB (Verde), en células suspendidas a partir de tejido placentario de primer trimestre de embarazo. Moléculas Chaperonas CRT, CNX y Erp57 (Rojo). Se muestra la superposición final (amarillo) con DAPI como marcador nuclear (Azul). Figura representativa de dos análisis independientes.

8.1.4. Superposición de chaperonas y MICA/B en Línea de Melanoma

Maligno.

Similarmente a lo realizado con células de trofoblasto, se analizó la localización celular de moléculas MIC y chaperonas en melanoma maligno, células de la línea FMS, se sembraron en cubreobjetos y se fijaron para su análisis confocal analizando expresión de MICA y MICB y su colocalización con moléculas chaperonas CRT, CNX y Erp57. Previamente se analizaron otras dos líneas de melanoma BL y DF que también presentaron una clara distribución perinuclear de MICA (*Anexo 8*). Se observa que ambos ligandos de NKG2D se encuentran en el interior de las células, con patrones de distribución similares entre si. Al igual que en sincitiotrofoblasto, es posible observar superposición de CRT, CNX y Erp57 con MICA y MICB (*Figura 4*)

En ambos estudios de análisis de distribución celular de MICA y MICB en sinciciotrofoblasto y melanoma se detecta la presencia de estos ligandos en la zona perinuclear, asociada a retículo endoplásmico. Por el contrario no se observa un patrón definido asociado a membrana celular. Además en estas observaciones se detectó la presencia de estos ligandos en el núcleo de algunas células de melanoma maligno, fenómeno no antes descrito en la literatura. (Figura 4, Anexo 8)

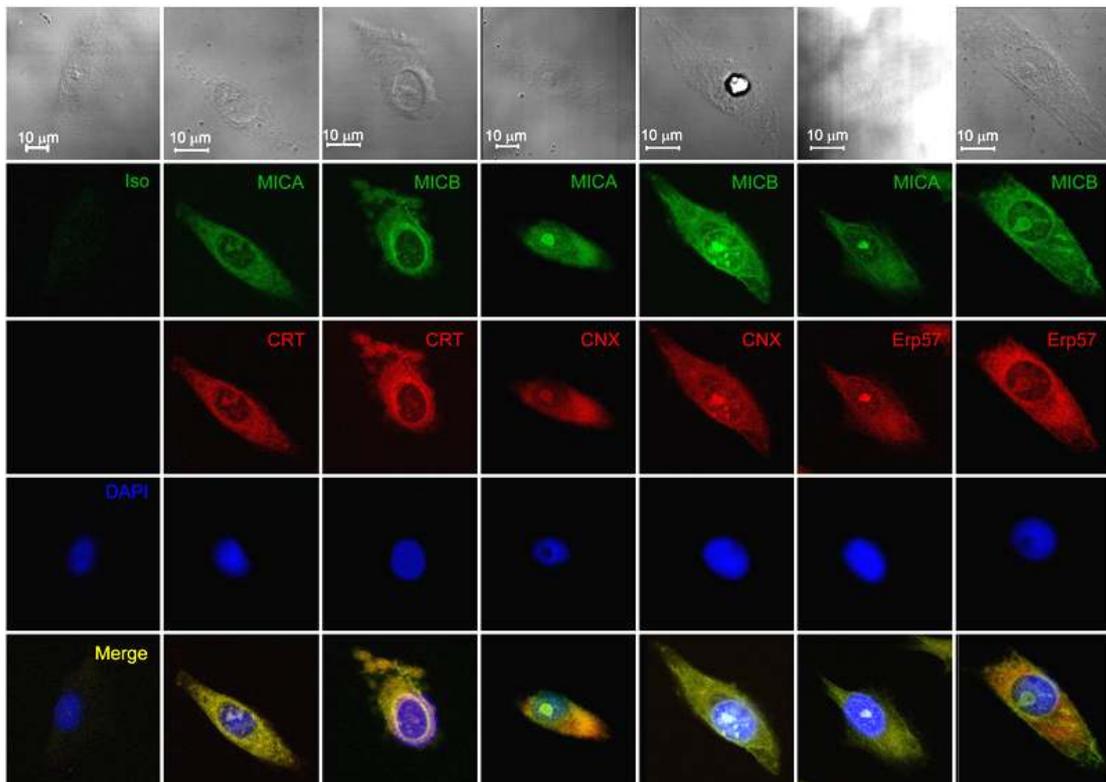


Figura 4.- MICA y MICB se expresan en el citoplasma de células de melanoma maligno y colocaliza con chaperonas de retículo endoplásmico. Fotografías de microscopía confocal de línea de melanoma maligno FMS, detectando MICA y MICB (Verde), Moléculas Chaperonas CRT, CNX y Erp57 (Rojo). Se muestra la superposición final (amarillo) con DAPI como marcador nuclear.(Azul) Fotografías representativas de tres experimentos independientes.

8.2. O.E.2: Obtener la proteína MIC de células de trofoblasto y melanoma maligno por inmunoprecipitación en conjunto con las proteínas asociadas.

En base a los resultados obtenidos mediante microscopía confocal, se estudió la interacción entre MICA, MICB y CRT, mediante inmunoprecipitación con sefarosa-A y anticuerpo específicos, lo que permite detectar las moléculas asociadas a una determinada proteína

8.2.1. MICA co-inmunoprecipita con la molécula chaperona calreticulina en células de melanoma maligno y en trofoblasto temprano

En la figura 5a se muestran los ensayos de inmunoprecipitación en los cuales un lisado de líneas de melanoma BL mel fue incubado con anticuerpos anti MICA y CRT en presencia de Sefarosa A, tal como se describe la sección de Materiales y Métodos. Se observa que al inmunoprecipitar con en anticuerpo MICA es posible detectar CRT en WB cuando se utilizar un anticuerpo específico (*Figura 5a, Línea 2*). Con el propósito de confirmar el resultado se inmunoprecipitó en forma inversa, es decir, con un anticuerpo anti CRT y se reveló el WB con anticuerpo anti MICA (*Figura 5a, Línea 5*). Se realizaron los controles negativos correspondientes, inmunoprecipitados con suero pre-inmune de conejo para el caso del anticuerpo policlonal anti CRT (*Figura 5a, Línea 4, 6 y 7*). Se observó además un bandedo doble para la inmunoprecipitación de MICA revelada con el mismo anticuerpo anti-MICA, de unos 7 kDa de diferencia (*Figura 5a, Línea 1*). Se observan además algunas bandas débiles de alrededor de 46 kDa en los carriles 2, 3 y 4 correspondientes a las cadenas pesadas de los anticuerpos utilizados.

Con el objetivo de determinar la inmunoprecipitación de MICA junto con CRT en un modelo no tumoral, a partir de trofoblasto humano de primer trimestre se realizó la experiencia en la muestra nº 9, en paralelo con la línea BL (*Figura 5b*). De esta forma se correlaciona lo observado en microscopia confocal, detectándose que MICA y CRT interactúan entre si en trofoblasto temprano de primer trimestre.

Según la *Uniprot Data Bank* (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q29983>) MICA está compuesto por 383 aminoácidos otorgándole un peso molecular de 42,9 kDa aproximadamente, 40,7 kDa sin considerar el péptido señal. En el caso de MICB,

(<http://www.uniprot.org/uniprot/Q29980>) también está compuesto por 383 y posee un peso molecular de 42,6 kDa y de 40,4 kDa sin el péptido señal.

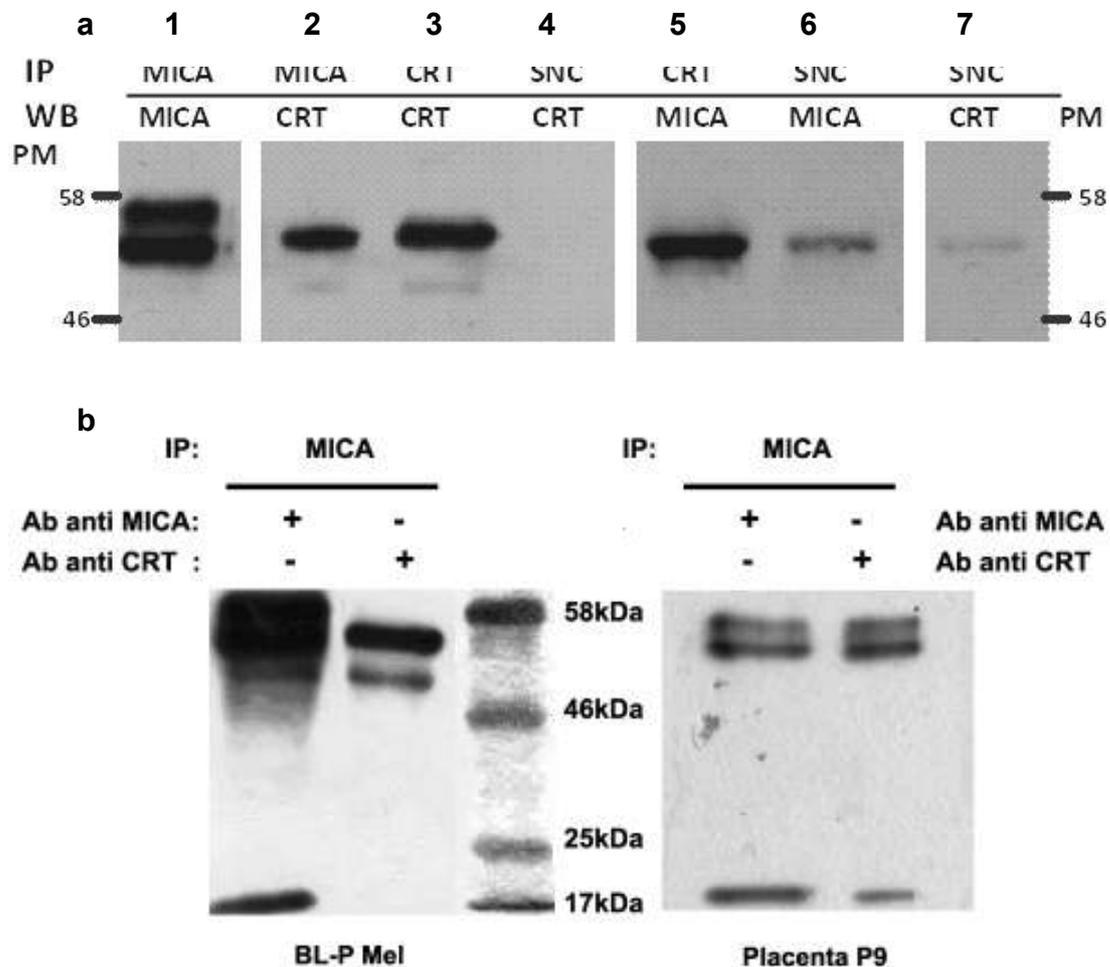


Figura 5.- CRT co-inmunoprecipita con MICA en células de melanoma maligno y en trofoblasto temprano. a) WB de Inmunoprecipitado de lisado de células BL de melanoma. Se utilizó como anticuerpo de precipitación AcMo anti-MICA, AcPo anti-CRT y suero preinmune de conejo como control de precipitación. Se indican en las barras laterales los pesos moleculares aproximados. Figura representativa de 5 inmunoprecipitaciones independientes. b) WB de Inmunoprecipitado de lisado de células BL-P y de trofoblasto de primer trimestre N°9 obtenido de legrado. Ambas muestras corridas en paralelo fueron inmunoprecipitadas con un AcMo Anti-MICA y reveladas con MICA y con CRT respectivamente. Se indican los pesos moleculares aproximados.

8.3. O.E.3: Estudiar la unión directa entre MIC y Calreticulina mediante análisis de interacción de proteínas recombinantes.

En base a los resultados obtenidos en inmunoprecipitación, se estudió la interacción directa entre MICA y CRT. Se realizaron análisis bioinformáticos de glicosilación y generación de proteínas recombinantes en sistema de expresión transiente, y se analizó la interacción directa mediante *Surface Plasmon Resonance* BIAcore

8.3.1. MICA recombinante generado en procarionte y rCRT interactúan directamente

Se realizó un análisis de interacción proteína-proteína mediante un ensayo de ELISA. Proteínas recombinantes MICA y CRT fueron generadas previamente en un sistema de *E coli*. Se sensibilizó una placa de ELISA con 0, 3, 6 y 12 $\mu\text{g/mL}$ de MICA recombinante y se agregaron cantidades crecientes de CRT recombinante. Mediante anticuerpo policlonal anti-CRT humana, se reveló la unión de CRT a la molécula MICA sembrado en la placa (Figura 6).

Se observa una asociación directa entre la señal en densidad óptica de CRT revelada mediante anticuerpos específicos y reacción enzimática, con la cantidad de CRT agregado (cuadrados). Fenómeno que se incrementa al realizar el ensayo de interacción en pocillos que contaron con mayores cantidades de MICA recombinante (triángulos y cruces), todo lo anterior en comparación a una incubación realizada con albúmina de suero de bovino como proteína control (rombos).

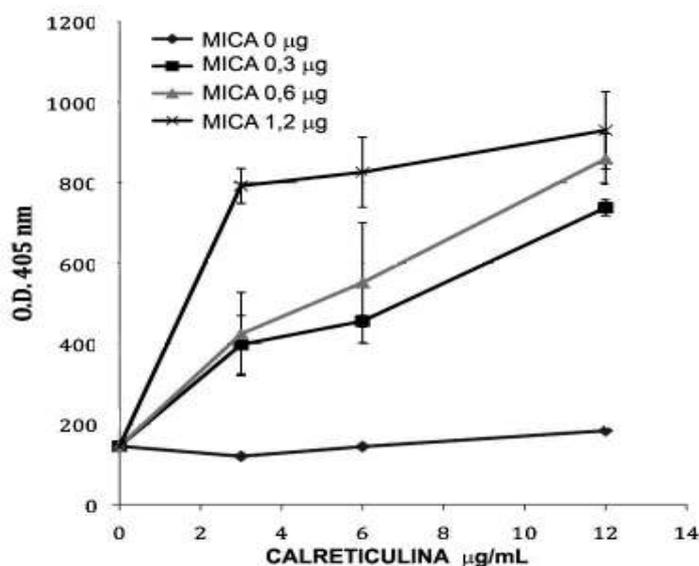


Figura 6.- CRT recombinante y MICA recombinante interactúan en ensayo de ELISA. Gráfico de densidad óptica (O.D) versus concentración de Calreticulina analizada en placa de ELISA sensibilizada con 0,3, 0,6 y 1,2 μg de MICA recombinante. Se utilizó BSA (0 $\mu\text{g/mL}$) como control negativo. La figura representa 3 ensayos independientes. Los datos mostrados corresponden a triplicados con su desviación estándar.

8.3.2. MICA y MICB comparten tres sitios putativos de glicosilación

Se realizó un análisis bioinformático de los sitios putativos de glicosilación de las moléculas MICA y MICB, en comparación con MHC-I (HLA-A2), utilizando las bases de datos de Uni-Prot (<http://www.uniprot.org/>) y como software de alineamiento ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). (Figura 7)

Q29983	-HGLGKPVFLDLAGIFPPFPPGAAARSPHSLSLRYKLTVLSWIDGSSVQSSGFLTEVHLDGQPFLEK	59	MICA_HUMAN
Q29980	-HGLGKRVLGFDAVAFFFPFAAARSPHSLSLRYNLMVLSQDESSVQSSGLAEGHLDGQPFLEAY	59	MICB_HUMAN
FO1892	NAVMAPEETVLELLSGALALQTQMGSSHEHYFFTSVERPPGRGKTRITAVGYVDITQEVAT	60	1A02_HUMAN
Q29983	DRQKC--RAKESQQWAEVDLGGKTNDRBETDLYTGHGKDLKMTSAHIK---DQKESLHSL	113	MICA_HUMAN
Q29980	DRQKR--RAKESQQWAEVDLGAKTNDTETEDLTENGQDLRRTLTHTIE---DQKGGELHSL	113	MICB_HUMAN
FO1892	DSDAASQKMEERAPWLEQE-SPEYMDGSTRKVKKAHSQTHRVDEGTLRQYYNQSRASSHTV	119	1A02_HUMAN
Q29983	QKIRVCHINHEK-SYSSQHFYDGELEFLSQNLETKEMTTPQSSRAQTLANKVKNFLKED	172	MICA_HUMAN
Q29980	QKIRVCHINHEG-SYRQSRHFYDGELEFLSQNLETSQSTVPQSSRAQTLANKVKNFWED	172	MICB_HUMAN
FO1892	QRNYGSDVGSBWFELRQYHQAAYDGGDYIALKEDLRSMVAAD-----NAAQTTEHKWKA	173	1A02_HUMAN
Q29983	ANKTKYTHRAHHADELQENRKYKSG-VVLRRTVPEMVVYVTSSEASEGNIITVTCRASSEY	231	MICA_HUMAN
Q29980	ANKTKYTHRAMQADLQKLOBYKSG-VAIRRTVPEMVVYVTCSEVSEGNIITVTCRASSEY	231	MICB_HUMAN
FO1892	ANVAQLRAYLESTQVWLRKYLEKSKKTLQETDAKTHMTHMAYSDMKATLRWALSXY	233	1A02_HUMAN
Q29983	FNKITLGRQDQVSLSHDITQQNSDVLDDGNGTYQTWVATRICQGEQRTFCYMERSGNHG	291	MICA_HUMAN
Q29980	FNKITLGRQDQVSLSHHTQQNSDVLDDGNGTYQTWVATRIQGEQRTFCYMERSGNHG	291	MICB_HUMAN
FO1892	RAEILTLWRDSDQDQDELV-STREASDGTFRKAAVVVPSQQEQRYTCHVQHEG---	289	1A02_HUMAN
Q29983	THEVPSGKVLVLSQSNQTHMVSAAARAFVIIIFVRCCKHTSRAEGPELVSLQVLDQ	351	MICA_HUMAN
Q29980	THEVPSGKVLVLSQSQRTDFPYVSRAMPCEVIIIIICVPCCKHTSRAEGPELVSLQVLDQ	351	MICB_HUMAN
FO1892	-LRR-----LTLRNEPSSQPTIETIVGIIAGLVLFQ-----AVITGAVVAAMWRRK	330	1A02_HUMAN
Q29983	HPVGTGDHBDATQLGFPQLNEDLGGSTGSTGSA 383 MICA_HUMAN		
Q29980	HPVGTGDHBDAAQLGEPQLNSATGSTGSTGSA 383 MICB_HUMAN		
FO1892	SDREGGSEYSQAASDSDAUGEDVSLTACKV-- 366 1A02_HUMAN		

Figura 7.- Análisis bioinformático de sitios putativos de glicosilación. Las secuencias proteicas se adquirieron de Uni-Prot y el análisis de las secuencias fue realizado por Clustaw2. En rojo se indican los sitios putativos de glicosilación determinados mediante el software GlycoMod Tool, <http://www.expasy.ch/tools/glycomod/>. Se evidencia el único sitio de N-glicosilación del HLA-A2 en N 110 (1A02_HUMAN), el que no coincide con los sitios putativos de MICA y MICB. Se muestra además que MICA posee sitios putativos de N-Glicosilación en N 31, 79, 210, 220 y 261 y MICB en N 164, 201, 220 y 261.

De acuerdo a la secuencia de consenso N-x-S/T, MICA posee 5 sitios de N-glicosilación y MICB 4, Este estudio indicó la importancia de generar una proteína recombinante en un sistema eucarionte, el que es necesario para el estudio *in vitro* de la interacción proteína-proteína, entre MICA y la molécula chaperona CRT. Podemos observar además que, MICA y MICB comparten tres sitios de glicosilación y que ninguno de ellos coincide con los sitios de N-Glicosilación descritos en la literatura para la molécula HLA-A2 (MHC-I) (Figura 7).

8.3.3. MICA recombinante generado en célula eucarionte y rCRT no interactuarían directamente

MICA se clonó en el vector pHLSec-Avitag tal como se describe en materiales y métodos. El constructo expresa el segmento extracelular de MICA el cual fue producido en un sistema de expresión de células mamíferas HEK-293 (*Anexo 12*). El sistema de expresión incluye una secuencia de secreción permitiendo que las proteínas recombinantes se obtengan del sobrenadante de cultivo celular (*Anexo 13*). Utilizando anticuerpos comerciales se pudo comprobar que los constructos pHLSec-Avitag-MICA son mayoritariamente secretados al sobrenadante de cultivo y no en el interior de las células, lográndose así una alta concentración de proteína recombinante (*Anexo 14*). Luego se realizaron inyecciones de 1, 5 y 20 nM de CRT recombinante para determinar su grado de interacción con la proteína MICA conjugada mediante estreptavidina al chip de lectura. Ninguna de las dosis inyectadas en el estudio indicó algún grado de interacción (*Figura 8b*) comparada con un control positivo de interacción de otro analito en la segunda celda del chip (*Figura 8a*). Los blancos de medición de rCRT y rMICA como se esperaba por si solos no entregaron señal alguna (*Datos no mostrados*).

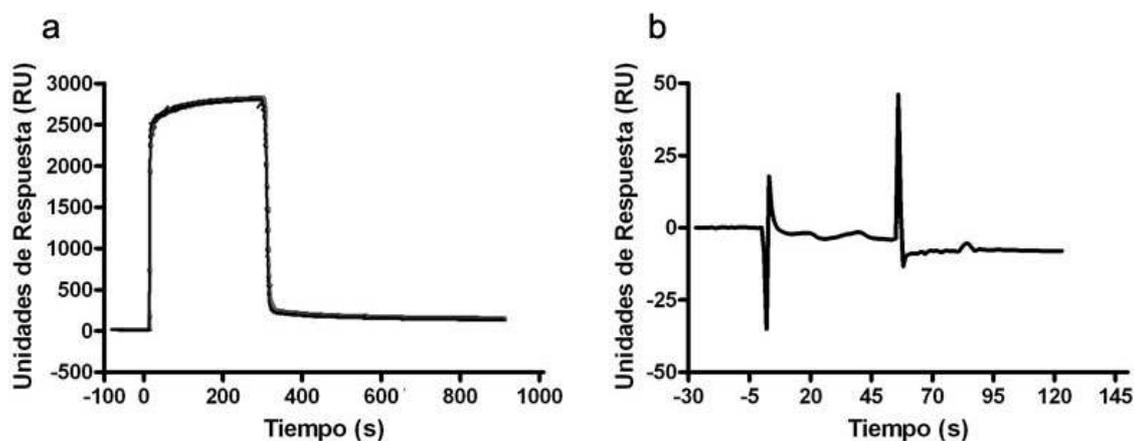


Figura 8.- Lectura en BIAcore de medición de interacción Proteína-Proteína a) Grafico de cinética del receptor Efrina 2 (*EFNB2*) y complejos de ácido siálico utilizado como control de lectura. Indica una clara interacción al momento de la inyección (Tiempo 0) y el rápido decaimiento al término del estímulo (Tiempo 300 s) b) 20nM de rCRT se inyectaron a un chip de BIAcore sensibilizado con MICA-estreptavidina desde el momento de la inyección (0 s), hasta el término del estímulo (120 s) no se observó curva de interacción.

8.4. O.E.4: Estudiar en un modelo de cultivo de melanoma maligno, la modulación de la expresión de MIC por IL-10

8.4.1. Expresión de NKG2DLs en la superficie de células del melanoma es modulada por la IL-10

Para estudiar el perfil de la superficie celular de NKG2DLs en las líneas de células de melanoma, se seleccionaron tres líneas celulares de melanoma metastásico FMS mel, mel, BL y FM55 mel, así como la línea de células del melanoma ocular, OCM-1 mel. La expresión en la superficie de la célula de los ligandos MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3 fue determinada por citometría de flujo (*Figura 9*). Se observa que el perfil de superficie de NKG2DL es diferente para las distintas líneas celulares en estudio. FMS mel y BL mel mostró MICA, MICB, ULBP2 y ULBP3 en la superficie, OCM-1 mel muestra ULBP2, ULBP3 y apenas expresó MICB, y ninguna de las moléculas NKG2DLs analizadas se encontraron en la superficie celular de la línea celular FM55 mel ni mRNA (*datos no mostrados*). Ninguna de las líneas celulares expresaron ULBP1 en su superficie (*datos no mostrados*). La expresión de MHC-I en la superficie de las células fue positivo en todas las líneas celulares excepto en FM55 mel.

Para determinar la influencia de la IL-10 en los patrones de la superficie de NKG2DLs, se analizó la expresión de NKG2DLs mediante citometría de flujo en las líneas de melanoma de células incubadas con esta citoquina (*Figura 9*). En las células de FMS mel, IL-10r disminuye la expresión de MICA en la superficie celular, mientras que la expresión de superficie MICB se incrementó en presencia de la citoquina recombinante (*Figura 9, fila superior*). Células de BL de melanoma mostraron una respuesta diferente de expresión con el tratamiento IL-10r, MICA y ULBP2 presentan disminución de los niveles de superficie, mientras que MICB no mostró cambios (*Figura 9, segunda fila*). En FMS mel y OCM-1 mel la expresión de ULBP2 se redujo ligeramente. Los niveles de superficie de MHC-I y ULBP3 no cambiaron significativamente con la incubación de IL-10 en cualquiera de las líneas celulares estudiadas. En síntesis, después de la estimulación con IL-10r, la expresión de MICA en la superficie de las células de melanoma disminuyó.

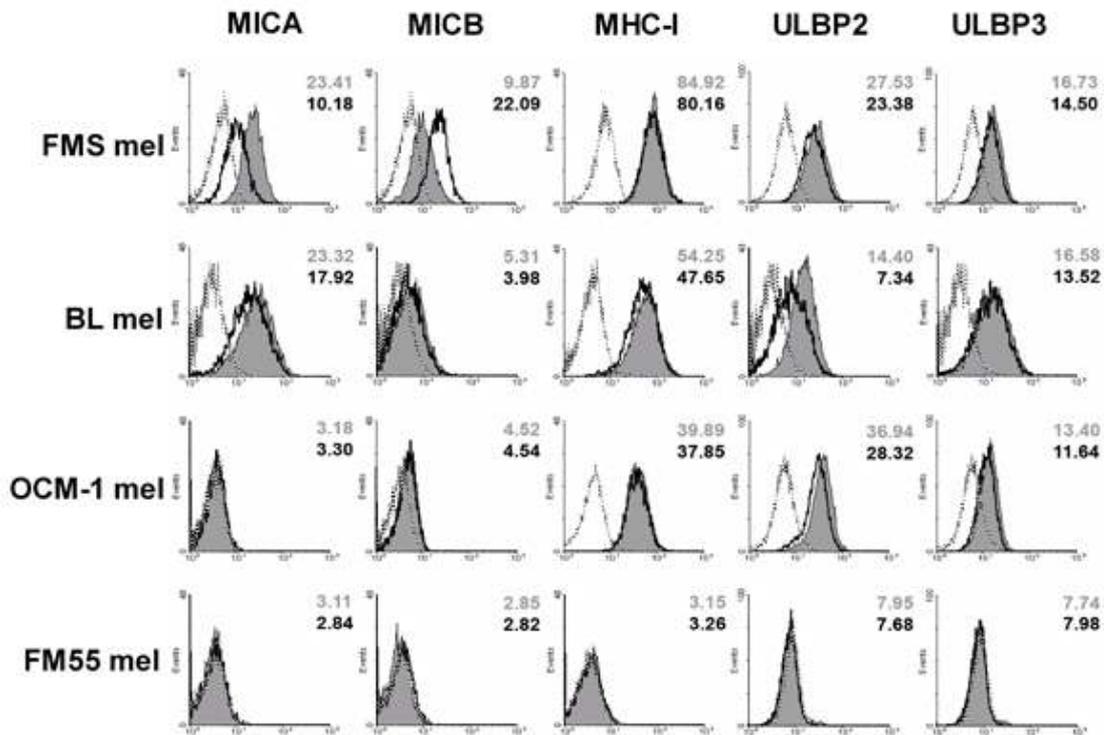


Figura 9.- Modulación de la expresión en la superficie de NKG2D ligando después del tratamiento con IL-10. Las líneas de células metastásicas de melanoma cutáneo FMS mel, BL mel, BL y FM55 mel y ocular OCM-1 mel se incubaron durante 72 horas en ausencia y en presencia de IL-10r (200 U/mL). La expresión en superficie de MICA, MICB, MHC-I, ULBP2 y moléculas ULBP3 fue determinada por citometría de flujo. Los histogramas muestran la expresión de NKG2DLs en células no tratadas (histogramas grises) y tratadas con IL-10r (líneas gruesas). Histogramas de puntos negros muestran los resultados obtenidos con anticuerpos IgG2b utilizado como control negativo de isotipo. Figura representativa de 3 experimentos independientes. Los números indican valores de fluorescencia media de cada determinación de cultivos no tratados (gris) y cultivos tratados con IL-10r (negrita).

8.4.2. La expresión de NKG2DLs es modulada en la superficie celular de líneas de melanoma transducidas con gen de IL-10

Con el propósito de estudiar si IL-10 autocrina también modula la expresión de MICA y MICB, hemos utilizado las líneas de células de melanoma, BLP, BLH y BLV, transducidas previamente¹⁴⁹ con los siguientes constructos: *Hy-TK mock-retrovirus* (BLP), *Hy-TK Human IL-10 retrovirus*, (BLH) y el gen BCRF de citomegalovirus, *Hy-TK IL-10 viral-retrovirus* IL-10 (BLV) (Figura 10a). Estas líneas celulares se incubaron durante 48 h y la secreción de IL-10 se cuantificó por el ensayo ELISA (Figura 10b). BLH y BLV

produjeron 0,5 y 0,9 pg/mL de IL-10, respectivamente. Estos niveles fueron significativamente más altos que los observados en el control de transducción (BLP) ($p < 0,001$). Para determinar la influencia autocrina de IL-10 sobre la expresión de las moléculas NKG2DLs, las células del melanoma BL transducidas se incubaron durante 12, 24 y 48 h y después se analizó la expresión de superficie de MICA y MICB mediante citometría de flujo. Luego de 48 h de la cultivo, la expresión de MICA en las células secretoras de IL-10, BLH y BLV, se redujo significativamente en comparación con el control de transducción (BLP) ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente) (*Figuras 10c y 10d*). A pesar de que los valores de índice de fluorescencia media para MICB y en particular para MHC-I mostraron cambios en las líneas celulares estudiadas (*Figura 10c*), el análisis de las variaciones de intensidad de fluorescencia media de MICB y MHC-I no fueron estadísticamente significativas en los tres experimentos independientes (*Figura. 10d*).

En resumen, los datos demostraron que la expresión de superficie de MICA en las líneas de melanoma, disminuyó en las células transducidas con IL-10 humana y viral, y que esta reducción está directamente relacionada con la cantidad de citoquinas secretadas. Mediante microscopía confocal no se detectaron diferencias en la distribución intracelular de MICA y MICB en las células BLP, BLH y BLV ni en las células tratadas con IL-10r exógenas (datos no mostrados).

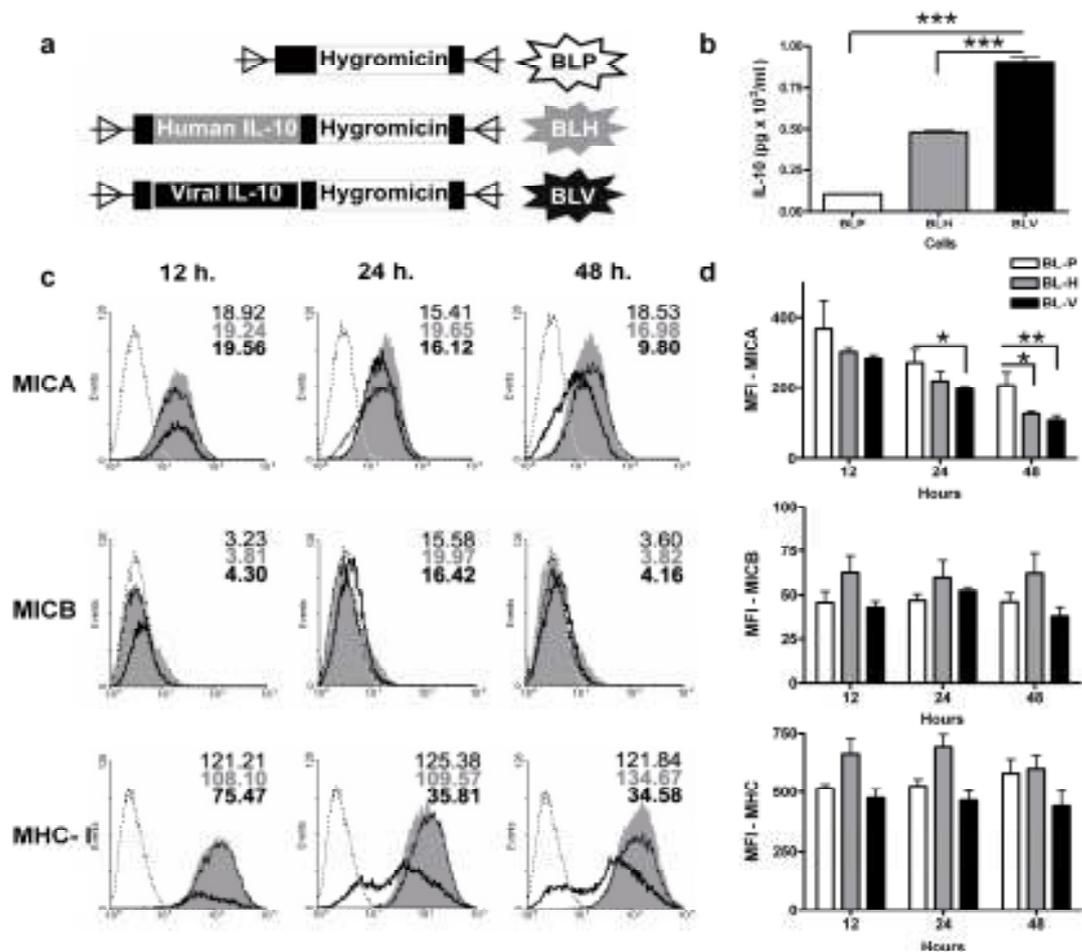


Figura 10 Líneas celulares de melanoma transducidas con IL-10 expresan diferenciamen- te MICA y MICB. (a) Esquema de las células transducidas BL con construcciones retrovirales de: vector HyTK Mock (BLP), gen de interleuquina-10 humana (BLH) y gen de IL-10 viral (BLV). (b) Niveles de IL-10 en el sobrenadante de células de melanoma BLH, BLV y BLP. Los sobrenadantes de cultivos de 4×10^5 células de melanoma se cosecharon a las 48 h y se analizó la presencia de IL-10 por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados. (c) La expresión en la superficie de MICA, MICB, y las moléculas de MHC-I se determinó a las 12, 24 y 48 h de cultivo por citometría de flujo. Los histogramas muestran la expresión en la superficie de estos ligandos sobre las células IL-10-transducidas, BLV (líneas gruesas) y BLH (líneas finas) y el vector vacío BLP (histogramas grises). También se muestra la intensidad de Fluorescencia media para cada determinación, BLP (números de negro), BLH (números de gris), y BLV (números en negrita). Se muestra el valor de un resultado representativo de 3 experimentos independientes (d) La expresión en la superficie de MICA, MICB y MHC-I se indica como valores de fluorescencia media. Para cada valor fue sustraída la intensidad del control negativo (tinción con un anticuerpo de control de isotipo IgG2b). Se muestra los resultados de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

8.4.3. IL-10 decrece los niveles de mRNA de MICA.

La disminución de la expresión de MICA podría ser la consecuencia de una reducción en el mRNA específico, por lo que se determinó la influencia de IL-10 en los niveles de mRNA de MICA de células FMS tratadas con 100, 200 y 400 U/mL IL-10r durante 48 h utilizando PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los niveles específicos de mRNA de MICA disminuyeron significativamente después del tratamiento con 100 U/mL de citoquinas, como se muestra en la Figura 11a ($p < 0,05$, y $p < 0,01$ respectivamente). Sin embargo, la expresión MICB con dosis de 200 y 400 U/mL de IL-10r aumentó en la línea de células de melanoma FMS (*Figura 11d*). También se determinó la influencia del gen de la IL-10 transducidas sobre los niveles de mRNA en de MICA y MICB en las líneas BL-transducidas por RT-PCR semi-cuantitativa y qRT-PCR. En ambas técnicas, la secreción de IL-10 induce una respuesta de disminución de los niveles de mRNA en comparación con el control de transducción (BLP) ($p < 0,05$) (*Figuras 11b y 11c*). Mientras que los niveles de mRNA de MICB aumentaron en las mismas líneas celulares (*Figuras 11e y 11f*) ($p < 0,05$). En síntesis, tanto la expresión endógena como el tratamiento con IL-10r disminuyó los niveles de mRNA de MICA y aumentó los niveles de mRNA de MICB en las líneas de células de melanoma ensayadas.

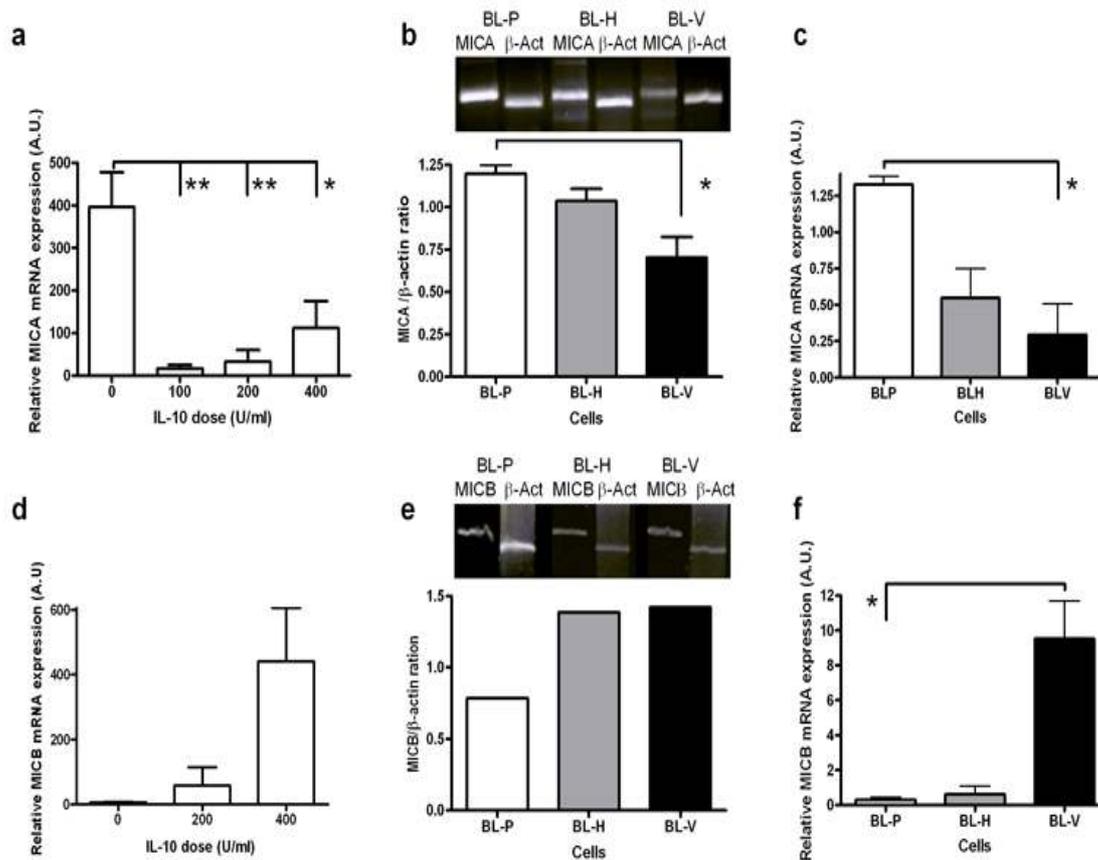


Figura 11.- Cambios relativos de los niveles de expresión de mRNA de MICA y MICB en líneas celulares de melanoma inducido por IL-10. Las células de la línea de melanoma FMS se incubaron con dosis creciente de IL-10r humana (0, 100, 200 y 400 U/mL) durante 48 h, y se evaluaron los niveles de mRNA MICA (a) y MICB (d) mediante RT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. El gráfico muestra los resultados de las unidades arbitrarias en comparación con el gen GAPDH como control interno de referencia del experimento. Expresión del mRNA (b) MICA y de MICB (e) de las células BL transducidas con el gen de IL-10 (BL-H y BL-V) y línea células de melanoma transducidas con el vector de HyTK-vacio (BL-P) incubadas por 48 h, determinada por RT-PCR semi-cuantitativo. Se indican cambios de niveles de mRNA del ligando analizado normalizado con β -actina. Se muestra el análisis de densidad de 3 experimentos independientes para MICA y de un ensayo para MICB y qRT-PCR de los niveles de mRNA de MICA (c) y MICB (f) en las mismas líneas celulares. La gráfica muestra los resultados de las unidades arbitrarias en comparación con el gen GAPDH de control interno del experimento. Cada gráfico representa uno de cada tres experimentos similares, excepto en (e), que representa un experimento. Las barras de error muestran la desviación estándar de triplicados (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

8.4.4. IL-10 reduce la lisis de las células del melanoma mediada por NKG2D

A continuación, se evaluó el efecto de la IL-10 en la citotoxicidad mediada por el sistema NKG2D/NKG2DL, seleccionando aquellas células de melanoma por su expresión diferencial de NKG2DLs modificada por la IL-10. Se desafiaron células de melanoma FMS mel, OCM-1 mel y BL mel contra linfocitos activados (LAK) en razones diferentes de efector:blanco 20:1, 10:1 y 5:1, tal como se describe en Material y Métodos. Las células LAK lisaron células FMS a 65% de lisis a una razón efector-blanco de 20:1 (*Effector:Target ratio. E: T*) (*Figura 12c*). Para asegurarse de que la lisis de las células de melanoma por células LAK estuviera mediada por el NKG2D, las células efectoras se incubaron con el anticuerpo monoclonal bloqueador dirigido contra NKG2D (Clon 1D11). Se observó que la citotoxicidad hacia estas tres líneas de células de melanoma fue inhibida por el anticuerpo anti-NKG2D.

Para determinar el efecto de IL-10r en el reconocimiento de las células del melanoma, se incubaron FMS mel, OCM-1 mel y BL mel, con 200 U/mL de IL-10r durante 72 h. Los resultados mostraron una disminución en la susceptibilidad de las células LAK de lisar melanomas FMS cuando son tratados con IL-10 ($p < 0,05$) (*Figura 12a*), pero este efecto no fue significativo para la OCM-1 (*Figura 12b*) y para las células BL (*Figura 12c*). También se analizaron las líneas de células de melanoma transducidas con el gen de IL-10 (BLP, BLH y BLV) observándose una menor susceptibilidad de lisis en líneas de células que sobreexpresan IL-10 (*Figura 12d*). Para aislar el efecto de la MICA y MICB sobre la citotoxicidad, se incubaron las células BLP, BLH y BLV antes del ensayo citotóxico con un cóctel de 10 mg/mL AcMo dirigido contra MICA (Clon: 159227), MICB (Clon: 236511) y MICA/B (Clon D7), para luego desafiar las células blanco con un cultivo enriquecido con células NK en una razón de 20:1 efector:blanco. Se comparó esta prueba con el efecto inhibitorio del anticuerpo de bloqueo anti-NKG2D (Clon 1D11) utilizado sobre las células efectoras. En este ensayo, el porcentaje de lisis de cada línea de células de melanoma transducidas no cambió significativamente cuando se utilizó el cóctel de anticuerpos anti MICA/B, en comparación con la lisis de las líneas celulares de melanoma incubadas sin los anticuerpos (*Figuras 12e y f*). Se usó en todos los experimentos la línea celular K562, como control positivo, con un porcentaje de lisis de más del 50% (datos no mostrados).

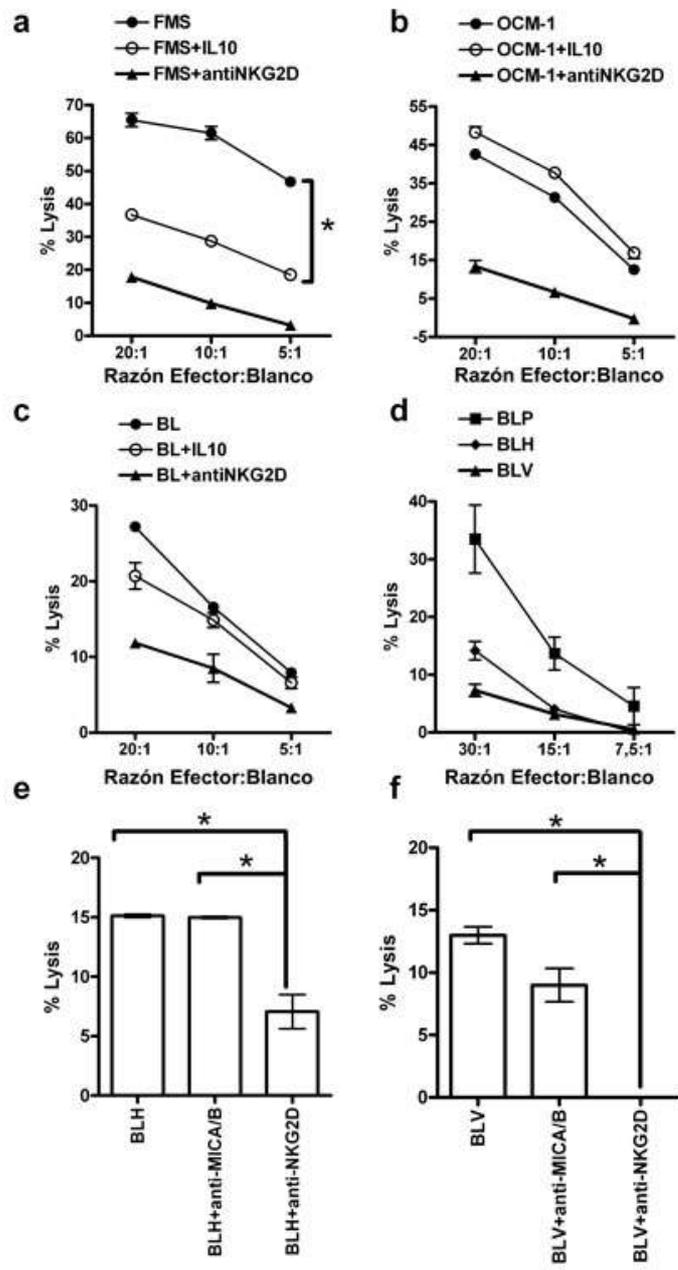


Figura 12.- IL-10 modifica la sensibilidad de las células de melanoma para la lisis.

Citotoxicidad dependiente de células LAK. Líneas de células de melanoma (a) FMS, (b) OCM-1 y (c) BL se incubaron durante 72 h en ausencia (círculos negros) o la presencia de 200 U/mL IL-10r (círculos blancos) y se analizaron en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr usando LAK como células efectoras, como se describe en materiales y métodos. Para determinar el impacto de las señales mediadas por NKG2D en la muerte de las células tumorales, las células LAK se incubaron con un anticuerpo anti-NKG2D de bloqueo 1D11 (5 mg/mL) durante 30 min antes de la co-incubación con las células del melanoma marcadas con ^{51}Cr (triángulos negros). Los valores de lisis se expresan como la media de triplicados en la relación Efector:Blanco de 20:1, 10:1 y 5:1. Se representa un ensayo de 3, uno de 5 y uno de 2 para, FMS mel, OCM-1 mel y BL mel, respectivamente. (d) Células BLP (cuadrados), BLH (rombos) y BLV (triángulos) se incubaron durante 48 h y se analizó la susceptibilidad a la lisis utilizando NK como efectores en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . Se muestra un ensayo representativo de 3 de 5 experimentos independientes. Las líneas celulares (e) BLH y (f) BLV fueron incubadas con un cóctel de 10 mg/mL AcMo contra MICA, MICB y MICA/B previo al ensayo citotóxico de liberación de ^{51}Cr en relación Efector: Blanco de 20:1, desafiados con un cultivo enriquecido de NK, se muestra las células incubadas con el AcMo anti NKG2D. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados (* $p < 0,05$).

(triángulos) se incubaron durante 48 h y se analizó la susceptibilidad a la lisis utilizando NK como efectores en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . Se muestra un ensayo representativo de 3 de 5 experimentos independientes. Las líneas celulares (e) BLH y (f) BLV fueron incubadas con un cóctel de 10 mg/mL AcMo contra MICA, MICB y MICA/B previo al ensayo citotóxico de liberación de ^{51}Cr en relación Efector: Blanco de 20:1, desafiados con un cultivo enriquecido de NK, se muestra las células incubadas con el AcMo anti NKG2D. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados (* $p < 0,05$).

8.5. O.E.5: Estudiar en modelo de cultivo de Melanoma Maligno la modulación de la expresión de Chaperonas por IL-10

8.5.1. IL-10 no afecta la expresión en membrana de CRT, CNX y Erp57

De acuerdo a la ubicación intracelular descrita en el O.E.1 para los ligandos de NKG2D se propone que CRT, como molécula chaperona de MICA, participa en el mecanismo de retención intracelular. Por otro lado IL-10 una citoquina pleiotrópica, provoca una reducción en los niveles de expresión en membrana celular de MICA. De esta forma se propuso averiguar una posible relación de IL-10 como factor regulador de la expresión en membrana de las moléculas chaperonas estudiadas CRT, CNX y Erp57. Las células de melanoma FMS se estimularon con 200 U/mL de IL-10 durante 48 h, y se analizó la expresión de CRT, CNX, y Erp57 mediante citometría de flujo. Ninguna de las chaperonas analizadas se expresó en la membrana de las células de melanoma y en este mismo sentido ninguna de ellas presentó variación alguna de expresión al ser incubada con IL-10 (Figura 13).

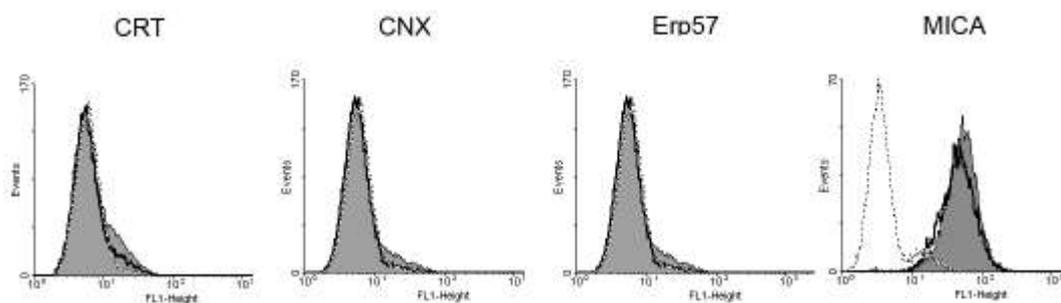


Figura 13.- La IL-10 no altera expresión en membrana de moléculas chaperonas. Las líneas de células metastásicas de melanoma cutáneo FMS mel, se incubaron durante 48 horas en ausencia y en presencia de IL-10r (200 U/mL). Se analizó por citometría de flujo la expresión en la superficie de CRT, CNX, ERP57 y MICA. Los histogramas muestran la expresión de estas moléculas en células no tratadas (histogramas grises) y tratadas con IL-10 (líneas gruesas). Histogramas de línea punteada indican control de tinción con isotipo IgG. Figura representativa de uno de 3 experimentos independientes.

9. DISCUSIÓN

En esta tesis se ha investigado sobre en la biología de los ligandos del receptor NKG2D de las células NK y T en dos áreas principales: la interacción de MICA/B con proteínas chaperonas partícipes del plegamiento y el efecto de la citoquina inmunomoduladora IL-10 sobre la expresión de MICA y MICB en la célula blanco. Se utilizaron dos modelos celulares de estudio, el trofoblasto humano temprano de primer trimestre y líneas celulares de melanoma maligno humano. Ambos modelos con el denominador común de montar respuestas evasivas a la acción del sistema inmune, ya sea en el embarazo o en la malignización tumoral. Todo lo anterior se desarrolló con el propósito de conocer modos de regulación negativa que la célula blanco establece para evitar la acción de las células NK, con el objetivo de abrir nuevas ventanas para potenciarlo, en el caso de la tolerancia fetal o para anularlo, en el caso de la evasión del cáncer.

9.1. Expresión de MICA y MICB en Trofoblasto y Melanoma

En la literatura se ha descrito que MICA y MICB se expresan en la superficie celular, principalmente ante estímulos de estrés, infección viral o en células tumorales.¹¹⁰ Hasta la fecha se ha descrito expresión normal de los NKG2DL en epitelios con alta tasa de recambio como lo son la piel,⁸² epitelio pulmonar¹⁵⁹ e intestino delgado.¹⁶⁰ En este último se asocia la expresión de MICA/B al continuo estrés producido por la flora bacteriana. En esta tesis describimos además la presencia de MICA y MICB en trofoblasto.

Los resultados obtenidos en el O.E.1, (*Figura 1*) indican que en el trofoblasto temprano de primer trimestre se encuentra expresados MICA y MICB en la barrera hemato-placentaria. Se demuestra que ligandos de NKG2D e IL-10 se co-expresan en la zona de intercambio entre la vellosidad corial y el espacio intervillosidades, interfaz donde se monta la respuesta de tolerancia. Mediante el análisis por microscopía confocal se determinó que MICA y MICB se expresan específicamente en el sinciciotrofoblasto (*Figura 3*) confirmando lo publicado por el grupo de Apps et al¹⁵⁸ y Mincheva-Nillson.¹¹⁹ Este último grupo incluso designa a MICA/B como marcador específico de sinciciotrofoblasto en conjunto a otros como fosfatasa alcalina placentaria.¹⁵⁷

El análisis se realizó en muestras de primer trimestre. Es en este periodo que se establecen los mecanismos tolerantes de la inmunología de la reproducción y cuando ocurren la mayoría de los abortos espontáneos. Por ello, las muestras obtenidas en este período, no serían las ideales debido a los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la pérdida, pero es el modelo más cercano a un aborto electivo, ya que este último es penalizado en nuestro país. La legislación en países como Inglaterra, Dinamarca y Suecia, han permitido el desarrollo de los estudios científicos en esta área, donde es posible acceder a muestras de placenta humana provenientes de términos electivos del embarazo, lo que constituyó una desventaja para el desarrollo de esta tesis.

Por otra parte, se pretendió correlacionar las observaciones en trofoblasto con los mecanismos evasivos en el modelo de melanoma maligno realizando un paralelismo de los actores participantes de la regulación de los NKG2DL en ambos modelos. Se lograron visualizar mediante inmunohistoquímica niveles detectables de MICA, MICB, MICA/B e IL-10, en tumor de melanoma MART-1 positivo, este último utilizado como marcador específico de la neoplasia. (*Figura 2*). La anisocitosis de la zona tumoral indicó un alto grado de malignidad celular, en cuyos citoplasmas se detecta NKG2DL e IL-10 al igual que los observados en el trofoblasto temprano.

En la tolerancia fetal y la evasión tumoral, las células somáticas adquieren señales mitóticas y logran escapar de la inmunidad materna y de los mecanismos supresores tumorales, respectivamente. Se ha descrito que el microambiente, que es rico en citoquinas y mediadores inflamatorios, capaces de influenciar la inmunosupresión, remodelamiento del tejido y angiogénesis.^{6, 17} Los resultados obtenidos muestran que MICA, MICB e IL-10, están presentes en ambos tejidos, suponiendo un posible paralelismo entre la tolerancia fetal y la evasión tumoral que involucre a los NKG2DL y citoquinas inmunomoduladoras.

9.2. Localización intracelular de MICA y MICB

La estandarización del protocolo de disgregación de tejido e individualización de células, permitieron el análisis por microscopía confocal de muestras, de trofoblasto temprano. En ellas se observó una morfología irregular de las células analizadas. Sin embargo, la característica fundamental que determinó el tipo celular descrito, fue la binuclearidad detectada mediante tinción nuclear con DAPI, patognomónica del

sinciciotrofoblasto (*Figura 3*). Para el caso de melanoma, la anisocitosis es la característica principal de las líneas de melanoma maligno metastático. En el caso de la línea FMS analizada, la forma fusada es preponderante, con evidencias de aberraciones nucleares y nucléolos prominentes (*Figura 4*)

El análisis de la localización de MICA y MICB en las células de melanoma y de sinciciotrofoblasto mostraron una distribución preferentemente en el interior del citoplasma, rodeando al núcleo y ocasionalmente formando pequeños gránulos indicando una organización asociada a retículo endoplásmico. Esta fue confirmada en otros estudios de nuestro laboratorio que indicaron que al igual que las proteínas chaperonas estudiadas, la Proteína Disulfido Isomerasa colocalizó en un alto porcentaje con MICA y MICB, resultados no incluidos en esta tesis.

En los análisis de microscopía confocal, la localización de MICA/B en la periferia celular, indicativo de expresión en membrana, fue escasa. Sumado a que MICA/B son proteínas muy poco abundantes en la célula, no se pudieron correlacionar los hallazgos cuantitativos de la influencia de IL-10 en la expresión en superficie, con un patrón de distribución nítido asociado a membrana. Otros autores se han encontrado con el mismo problema, desarrollando modelos de sobre-expresión de proteínas de fusión NKG2DL-fluoróforo para visualizar la dinámica de las moléculas en el contexto de la membrana celular.⁸⁷

Se encontró un alto grado de colocación de las tres moléculas chaperonas estudiadas, CRT, CNX y Erp57 con los ligandos MICA y MICB, en las células de trofoblasto y en las células de melanoma maligno. Indicando así que los ligandos de NKG2D presentan una distribución intracelular preferencial por zonas perinucleares o de retículo endoplásmico, en donde las chaperonas de plegamiento de proteínas realizan su función. Estas observaciones podrían dar indicios de un mecanismo de retención intracelular de los NKG2DL, para evitar ser expuestos a la superficie celular y a la acción de las células NK, permitiendo la tolerancia fetal en el caso del trofoblasto y la evasión tumoral por parte de las células de melanoma.

Se detectó en algunas líneas celulares de melanoma la presencia de MICA y MICB en el interior del núcleo (*Anexo 8*), fenómeno presente en algunas fotografías de publicaciones pero no discutido en la literatura previamente¹⁶¹. Esta presencia colocaliza

con CRT, por lo que podría estar relacionado con algunas funciones descritas para esta chaperona en el núcleo¹⁶². Sin embargo la respuesta más probable es que el hallazgo corresponda a un producto de la alta tasa de mutaciones y desorden metabólico propios de las líneas celulares derivadas de metástasis de melanoma maligno, pues no fue detectado en los cultivos primarios de sinciciotrofoblasto (*Figura 3*).

9.3. Interacción MIC y CRT

Los datos de colocación de sinciciotrofoblasto y melanoma indicaron que la ubicación intracelular de los NKG2DL se superpone al patrón de las moléculas chaperonas estudiadas partícipes del plegamiento de otra cadena presente en el mismo locus génico, como lo es la cadena alfa del MHC-I.⁹ Esta disposición mayoritariamente asociada a retículo endoplásmico se confirmó con el O.E.2 en donde lisados provenientes de cultivos de líneas de melanoma (*Figura 5a*) y de cultivo primario de trofoblasto temprano (*Figura 5b*) se logró detectar MICA al inmunoprecipitar con CRT.

Al inmunoprecipitar CRT y, posteriormente, revelar el WB con un anticuerpo contra esta misma proteína (*Figura 5A, Línea 3*), se obtuvo una única banda de un tamaño aproximado de entre 46-55 kDa, tal como se ha descrito en la literatura^{143, 163}. Luego, cuando se realizó un ensayo de IP para MICA y se reveló el WB con anticuerpos contra CRT (*Figura 5a, Línea 2*), se obtuvo una sola banda correspondiente a CRT. Esto indica que MICA inmunoprecipita con CRT, por lo cual, efectivamente están interaccionando. Sin embargo, al realizar lo contrario, es decir, realizar un ensayo de IP con CRT y revelar el WB con anticuerpos contra MICA, se obtuvo una sola banda, en vez de las dos detectadas para MICA revelado con MICA (*Figura 5a, Línea 1*) Lo anterior, si bien nos confirma la interacción CRT-MICA, indicaría que CRT se une sólo a la banda de menor PM de MICA. Este fenómeno podría deberse a que CRT posee un mayor grado de interacción con alguna isoforma de MICA, las cuales han sido descritas en carcinoma de colon, con una diferencia de 13 kDa entre ellas¹⁶⁴. Esto es indicativo de una edición alternativa que involucra diferentes exones, incluyendo además, la variabilidad génica propia de las líneas tumorales derivadas de metástasis.

Al analizar el patrón de bandas de MICA, se observó que su peso molecular excedía en casi 10 kDa el peso teórico entregado por la base de datos Uni-prot, indicando una

posible modificación postraduccional que explicaría la diferencia con el valor de la secuencia primaria de la proteína. Investigaciones recientes en el área de la regulación de otros NKG2DL como ULBP1, han revelado que este ligando siempre está ubiquitinado, como mecanismo de control de su expresión en membrana¹⁶⁵, lo cual podría repetirse en MICA, tal como veremos más adelante.

Si bien la microscopía confocal puede indicar superposición espacial, no es en absoluto indicativo de interacción directa. Por décadas la inmunoprecipitación ha sido la técnica preferida por los investigadores para demostrar interacción proteína-proteína. Sin embargo, es sabido que muchas de estas uniones pueden corresponder a multicomplejos proteicos. Es por ello que se decidió indagar en un modelo *in vitro* de interacción entre MICA y CRT mediante un ELISA en una placa sensibilizada con MICA recombinante, generada en un sistema procarionte (*Figura 6*). La generación de rMICA produjo cuerpos de inclusión en la bacteria huésped del vector de expresión, indicando así que la proteína estaba con alteraciones del plegamiento. El alto nivel de interacción detectado entre CRT y MICA recombinantes mediante este ensayo, se condice con las funciones descritas para CRT como chaperona participante de la correcta conformación tridimensional de las moléculas generadas en el retículo endoplásmico. Otro aspecto que también fundamenta la unión CRT/MICA detectada es que el ligando generado en este sistema carece de todas las modificaciones post-traduccionales propias de los organismos eucariontes, incluyendo a las glicosilaciones (*Figura 7*).

En esta línea y para evaluar la importancia de las modificaciones post traduccionales en el sistema CRT/MICA, se realizó un ensayo de interacción de Resonancia de Superficie (*Surface plasmon resonance*) BIAcore, que permitiera además determinar la constante de afinidad entre ellas. MICA fue generado en un sistema de transfección transientes en células eucariontes cuyo vector permitía la secreción al medio de cultivo de la proteína de interés, la cual posee todas las modificaciones post traduccionales propias del sistema. Al realizar el análisis de interacción no se detectó unión alguna entre rMICA y su analito rCRT en ninguna de las concentraciones medidas (*Figura 8*).

El alto grado de unión detectado mediante ELISA en sistema de expresión procarionte versus la nula interacción de ambas proteínas en un sistema procarionte, es indicativo de que esta unión podría estar mediada por la conformación de la proteína y sus

modificaciones post-traduccionales. Otra de las razones, es la que se discutió en el recién pasado *9th International Calreticulin Workshop*, en el que se destacó el rol fundamental del ión Calcio, como modulador de la actividad de esta chaperona, factor que no fue considerado en el desarrollo de esta tesis. Sin embargo cabe la posibilidad que no exista interacción entre MICA y CRT en forma directa, sino que sea a través de una proteína intermediaria desconocida o mediante alguna chaperona como CNX, ERP57, o la recientemente descrita Erp5¹⁶⁶, hipótesis que amplía el espectro de moléculas recombinantes a generar, lo que conlleva a una profundización en la investigación.

En este sentido, los estudios recientes que indican a ERp57 catalizador de la formación de puentes disulfuro en la cadena pesada de MHC-I en ausencia de interacciones con CNX y CRT, abre la pauta para indagar en Erp57 como molécula responsable directa de la retención de MICA y MICB en el citoplasma de células blanco a la acción de las NK.¹⁶⁷

En conclusión, si bien se logró evidenciar interacción de CRT con MICA, a la luz de los antecedentes y de los resultados, ésta ocurra sólo en los estadios temprano de la formación de la molécula, previos a la glicosilación, o también la formación del complejo CRT/MICA sea a través de una chaperona intermediaria no analizada

9.4. MICA y MICB

Desde su descripción por Groh en 1998¹⁶⁰ MICA y MICB se han descrito en conjunto con una función activadora de la citotoxicidad de las células citolíticas a través de la unión con el NKG2D, esto basado en su 85% de homología entre ambas secuencias, distribución celular y fisiopatología asociada. Sin embargo, en los últimos años, y con el aumento de la competitividad por aparición de nuevos grupos de investigación interesados en el área, se ha intentado indagar en las diferencias funcionales de ambos ligandos. Se han detectado como denominadores comunes, algunos factores de transcripción como, NF- κ B, Sp1, Sp3 y Sp4^{129, 174}. A su vez, se ha descrito un alto polimorfismo de la secuencia de los elementos de respuesta del promotor que controla la expresión de MICB,¹⁶⁸ lo que radicaría en diferencias funcionales. Por otro lado, también se han medido diferencias de un orden de magnitud de la constante de afinidad (Kd) de MICA y MICB, con su receptor. (0,6–1 x 10⁻⁷

M y $0,8 \times 10^{-6}$ M, respectivamente), lo que podría ser indicativo de un papel diferente a la unión con su receptor.⁹³

Lo anterior apoya lo observado en el O.E.3 en donde bajo un estímulo único, como IL-10, el comportamiento de MICA y MICB puede ser diferente encontrándose diferencias cuantitativas de expresión superficial de MICA y MICB y de sus mRNA, en células de melanoma según en el contexto en que se encuentren, si se exponen a una u otra citoquina. Otros grupos de investigación también sostienen la hipótesis de que existen vías de expresión diferentes de los NKG2DL^{113, 131, 169}. En esta tesis se muestra que MICA y ULBP2 muestran un comportamiento similar en el mismo estímulo (*Figura 9*), a diferencia de lo observado para MICB (*Figura 10*). Sin embargo, este fenómeno, por el momento se ha demostrado en solo una línea celular. Experimentos preliminares de nuestro laboratorio, indican que el fenómeno de independencia de estímulo entre MICA y MICB se repite con otras citoquinas como IL-4 y TNF- α

9.5. IL-10

En el O.E.3 se demostró que en las células de melanoma, IL-10 puede regular la expresión de NKG2DL, agregando esta propiedad a otras funciones inmunorreguladoras descritas anteriormente para esta citoquina. Hay varios mecanismos descritos que participan en la regulación de la expresión NKG2DL en las células tumorales como la liberación enzimática de las moléculas de la superficie de la célula,^{96, 170-172} retención en el sistema vesicular,¹⁷³ regulación a través de micro RNA,^{95, 174, 175} y el efecto de diversas citoquinas. En esta área, desde el inicio de esta tesis, se ha descrito que MICA puede ser regulada a la baja en la mayoría de los análisis de líneas celulares de melanoma en conjunto con una disminución de la expresión de ULBP2, descrito para el tratamiento con IFN- γ .^{131, 169} Otra citoquina implicada en la regulación de la expresión de superficie NKG2DL es TGF- β , donde se demuestra que esta citoquina regula a la baja la transcripción de MICA, ULBP2 y ULBP4¹¹³.

En este trabajo se demuestra que IL-10, una citoquina pleiotrópica secretada por varios tumores, afecta la expresión de los ligandos NKG2D en líneas celulares de melanoma. IL-10 fue capaz de disminuir la expresión en la superficie de MICA y ULBP2 en todas las líneas celulares que lo expresan (*Figura 9*) tal como se ha visto en otras citoquinas.^{113, 131,}

¹⁶⁹ Sin embargo, IL-10 no afectó significativamente el nivel de la superficie de ULBP3.) También se observó una correlación inversa en las líneas celulares BL transducidas con los genes humanos para IL-10 (BLH) e IL viral-10 (BLV), donde la más alta expresión de IL-10 se correlacionó con una baja expresión de MICA en la superficie celular (*Figura 10*). En este modelo también se detectó una ligera reducción de MICA con el tiempo de cultivo. Además, los análisis revelaron una disminución del nivel de mRNA de MICA en línea celular de melanoma FMS tratadas con IL-10 exógena, un efecto que podría explicar parcialmente la reducción de MICA en la superficie celular (*Figura 11*), sugiriendo mecanismos de regulación a nivel transcripcional.

Nuestros resultados mostraron patrones de expresión diferentes de superficie para NKG2DL en cada línea de células de melanoma. Curiosamente, en la línea celular FMS hemos detectado que MICB aumenta su expresión en la superficie y los niveles de mRNA bajo el tratamiento con IL-10. Este fenómeno se correlaciona con los niveles de mRNA de MICB en líneas celulares BL transducidas con los genes de IL-10, sin embargo, los niveles en superficie celular de MICB en este modelo no mostró ninguna tendencia estadísticamente significativa.

Se ha descrito que MICA y ULBP2 se comportan de una manera similar bajo la influencia de TGF- β e IFN- γ ^{113, 131, 169} En este trabajo se pudo observar que FMS mel presentó la mayor variación en la expresión NKG2DL con el tratamiento de IL-10 reduciendo los niveles de membrana de MICA y ULBP2 en conjunto, lo que puede traducirse en una reducción a la susceptibilidad a la lisis por células NK en casi un 50% (*Figura. 12*). Aunque MICB aumentó en la superficie celular, este estímulo no fue suficiente para mantener la susceptibilidad a la citotoxicidad, y esto puede ser debido al hecho de que normalmente MICB se expresa por un período corto de tiempo en la membrana celular. ¹⁷⁶ El tratamiento de la línea celular OCM-1 con la IL-10 indujo una ligera disminución en la expresión ULBP2. Esta línea no mostró diferencias entre las células no tratadas y tratadas con IL-10 en cinco ensayos independientes de lisis mediada por LAK. Sin embargo, el bloqueo del receptor de NKG2D redujo esta lisis, lo que implica que la citotoxicidad es dependiente de este receptor. Por lo tanto, es posible que OCM-1 mel exprese otro NKG2DL no analizado en esta tesis.

Los resultados mostraron una ligera reducción de la expresión MHC de clase I de la

superficie celular, un fenómeno también descrito por Matsuda et al ¹⁷⁷, donde se demostró que disminuye el haplotipo HLA-A2 en líneas de células del melanoma tratadas con IL-10. Es posible que esta reducción no sea suficiente para modificar el efecto inhibitorio de estas moléculas en la citotoxicidad mediada por los receptores KIR. Lo anterior se sustenta en que la lisis celular es claramente provocada por la activación de los mecanismos de citotoxicidad mediados por el sistema NKG2D/NKG2DL, debido a que el bloqueo de la lisis fue altamente efectivo al utilizar anticuerpos anti-NKG2D. El efecto real de cada ligando NKG2D no se pudo demostrar de manera fiable debido a que los anticuerpos monoclonales utilizados para inhibir MICA y MICB no fueron tan eficaces como el bloqueador de NKG2D. Otros estudios han demostrado diferencias entre los donantes de células NK en ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo,¹³¹ siendo esta la hipótesis que puede explicar la variabilidad de resultados de nuestros ensayos.

Se ha descrito que IL-10 regula la expresión de MHC-I, afectando la citotoxicidad antígeno específico de linfocitos CD8 ¹⁷⁷. En esta tesis se describe la participación de IL-10 en la alteración de la citotoxicidad mediada por el sistema NKG2D/NKG2DL, ampliando el conocimiento del efecto del microambiente en la capacidad de las células malignas para evadir el sistema inmunitario. De esta manera, a la actividad inmunosupresora de la IL-10 podría añadirse una nueva propiedad como regulador negativo de la superficie de NKG2DL, tal como IFN- γ y TGF- β ^{113, 131, 169}. También se logró detectar que la IL-10 viral podría modular la expresión de MICA de superficie tan eficientemente como IL-10 humana, mostrando una función novedosa del gen BCRF-1 como mecanismo de evasión inmune por parte del citomegalovirus. ^{178, 179}

Como corolario de este trabajo, se sugirió relacionar el posible papel de las moléculas chaperonas CRT, CNX y Erp57 y la citoquina inmunomoduladora IL-10. Antecedentes previos que interrelacionen ambos fenómenos, solo se habían descrito bajo la señalización intracelular de IL-10 vía moléculas STAT, las cuales como factores de transcripción pueden agruparse formando verdaderos agregados macromoleculares llamados “Statosomas”. Estos agregados funcionarían como estructuras de andamiaje que se relacionan con chaperonas en el citoplasma como ERp57.¹⁸⁰ Otros antecedentes indicaban que CRT aparece soluble en el suero de mujeres durante el embarazo,¹⁸¹ al igual como MICA ¹¹⁹ coincidiendo con los altos niveles de IL-10 en el desarrollo del útero

grávido ³⁴. Sin embargo no fueron detectadas variaciones de ninguna de las moléculas chaperonas analizadas bajo la influencia de IL-10. Razón por la cual no se indagó en profundidad, aspecto que requeriría mayor investigación

9.6. Mecanismos de regulación de los NKG2DL

Los resultados obtenidos en relación al efecto de la IL-10 como regulador negativo de la expresión de MICA, podría estar relacionado a algunos mecanismos que involucren desde la transcripción de este ligando, hasta la inducción de su degradación o proteólisis desde la membrana celular.

Se ha descrito que IL-10 participa en la expresión de el factor de transcripción PPAR γ ,¹⁸² el cual recientemente se demostró que es capaz de controlar la regulación de otra molécula perteneciente al locus de MHC clase I, como lo es CD1d durante el proceso de maduración de las células dendríticas.¹⁸³ Otros antecedentes que van de la mano con nuestra hipótesis, indican que se ha descrito un nuevo subtipo de células NK,¹⁸⁴ que se caracteriza por la secreción de altas cantidades de IL-10, llamadas NKr. Podrían ser estas NK regulatorias las que secretando IL-10 disminuyen la expresión de ligandos de NKG2D por parte de la célula blanco. Todo lo anterior sería indicio de una especie de retroalimentación negativa de la regulación de la actividad lítica de las NK, a través de mecanismos de señalización intracelular que IL-10 gatilla para que se produzca la inhibición de la expresión en membrana de los ligandos de NKG2D

Por otro lado, en la literatura han aparecido nuevos mecanismos de regulación desde el inicio de esta tesis, como lo son los micro RNA descritos para MICA⁹⁵ y MICB¹⁷⁶ como vías de degradación y control de la expresión en la membrana celular. Así, este fenómeno puede ser añadido a otros mecanismos de traslación de la evasión inmune, tales como endocitosis, o proteólisis de NKG2DL de la membrana.^{166, 176} Un mecanismo de evasión recientemente descrito, es el que utiliza el Virus Herpes asociado al Sarcoma de Kaposi, en el cual se ha detectado disminución de MICA de superficie en las células infectadas. Este virus posee un gen que codifica para la proteína K5 que corresponde a una ubiquitin-ligasa, enzima que une una ubiquitina a una proteína blanco y estas son endocitadas.¹⁸⁵ El sistema de ubiquitinación fue descrito como un mecanismo de degradación de proteínas que son destinadas al proteosoma y lisosoma que se encuentra

funcionando de manera ATP dependiente. Sin embargo, en el último tiempo al sistema de ubiquitinación se le han asignado otras funciones como la de reparación del daño a DNA, señalización intracelular, endocitosis y distribución de proteínas en el citoplasma. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos que es acoplada principalmente en lisinas, y en este sentido MICA, posee 3 sitios putativos de ubiquitinación en su tallo citoplasmático, indicando así un posible mecanismo de regulación y de distribución celular, homólogo al descrito para MHC-II, el cual bajo este mismo mecanismo, es regulado a la baja en la membrana celular. Se han descrito enzimas responsables de la ubiquitinación, las llamadas ubiquitin ligasas, que pueden ser inducidas bajo la acción de la IL-10. De esta forma, los antecedentes de esta tesis y los de la literatura aquí mencionados, han abierto una nueva área de investigación en nuestro laboratorio.

Sería importante que en trabajos posteriores se abordaran temas como, posibles efectos sinérgicos que pudiesen existir entre IL-4 y TNF- α . Además es necesario estudiar si las variaciones de MICA y MICB mediada por estas citoquinas tienen efectos funcionales, es decir, analizar si existen variaciones en el reconocimiento entre las NK y las células de melanoma, tratadas con IL-10, IL-4 y TNF- α .

Dado que en este estudio se trabajó solo con líneas celulares, no se puede asegurar que los efectos acá descritos sean reproducibles *in vivo*, es necesario considerar la utilización de modelos experimentales murinos para después abordar el área de futuras terapias anti-tumorales para humanos.

9.7. Plasticidad del NKG2D

En la acción de un ligando agonista, el evento principal es la unión de un ligando a su receptor, lo cual conduce a un efecto intracelular. El resultado final es una función de las características de enlace de la interacción ligando-receptor, como lo son la afinidad y la vida media ¹⁸⁶ Existen numerosos ejemplos donde la activación de un receptor único puede conducir a la activación de múltiples eventos de señalización intracelular. ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

Sin embargo, datos recientes de una variedad de sistemas sugieren que algunos ligandos que actúan en un receptor único, de preferencia puede activar un efecto mientras que otros ligandos del mismo receptor, puede activar otra vía de señalización. Este

fenómeno se ha denominado: "Selectividad funcional de los receptores de señalización"¹⁸⁶, "Disociación de las vías de señalización intracelular"¹⁹⁰ o "Discriminación de Ligando"¹⁸⁸.

Los NKG2DL interactúan directamente con las células NK y células T CD8⁺ en forma dependiente de NKG2D, participando en la activación de la capacidad citolítica de estas células.¹⁹¹⁻¹⁹³ Se han esgrimido variadas teorías acerca de que la capacidad de unir multiligandos de NKG2D. Una de las más actuales es que la interacción NKG2D/NKG2DL podría ocurrir en presencia de moléculas accesorias presentes en la misma sinapsis inmune¹⁷⁶, como lo son las recientemente descritas DNAM y NKp30¹⁹⁴.

El NKG2D humano se asocia con la molécula adaptadora DAP10,^{195, 196} que posee un motivo de homología YxxM para el dominio Src 2 (SH2)⁵⁶. DAP10 potencialmente puede fosforilarse en asociación tanto con la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-kinasa)¹⁹⁷ y la proteína adaptadora Grb2¹⁹⁶. En este sentido, se ha demostrado que la estimulación NKG2D puede inducir la fosforilación de JAK2, STAT5¹⁹⁸, Itk¹⁹⁹, ERK²⁰⁰, Vav1²⁰¹, y Jnk²⁰⁰.

Una cuestión clave es si los diferentes ligandos son equivalentes en su capacidad para activar los receptores NKG2D y sus rutas de señalización posterior. Se han realizado estudios estructurales y de unión ligando-receptor se han realizado para algunos de los NKG2DL que sugieren que estos ligandos pueden competir entre sí por la unión al NKG2D.⁵⁶

Los argumentos mecanísticos por los cuales este receptor homodímero simétrico puede unir varios ligandos asimétricos como los NKG2DL, se han basado en la hipótesis de la plasticidad y la reorganización espacial.²⁰² Esta flexibilidad en la conformación permitiría que un receptor único pueda adoptar las conformaciones diferentes necesarias para las interacciones con ligandos estructuralmente diferente con un conjunto particular de residuos involucrados energéticamente dominantes en la interfaz para cada ligando²⁰³. Se ha propuesto que la degeneración del NKG2D puede ser explicada a través de un mecanismo de ajuste inducido del receptor.^{202, 204} De esta forma se podría plantear que la unión de múltiples ligandos al receptor NKG2D podría resultar en la activación de diferentes vías de señalización en las células NK humanas.

El estudio de la discriminación de ligandos y de señalización diferenciada de las vías de NKG2D podría añadir una nueva dimensión a los mecanismos subyacentes de este

receptor, cambiando el énfasis de la identidad del receptor activado por un ligando, por el de la cascada de señales específicas gatilladas por cada ligando, con probables y potenciales funciones diferenciales *in vivo* relacionadas también a las actividades específicas de cada tejido. Estas variaciones podrían contribuir a una aproximación más detallada de la etiología de las enfermedades, a la especificidad de tejido de un tratamiento, o de la variabilidad individual en la respuesta a un medicamento.

10. CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral, se estudiaron principalmente dos aspectos relativos a la fisiología celular de los NKG2DL. Por una parte, la interacción por parte de ligandos de NKG2D con proteínas chaperonas en sinciciotrofoblasto y melanoma maligno, y segundo, la función reguladora de IL-10 de la expresión en membrana celular de estos ligandos, en la superficie celular de melanoma maligno. Se postuló que calreticulina se asocia con las moléculas MICA en células trofoblasto y de melanoma maligno y que la expresión de los ligandos MICA está influenciada por la IL-10 en melanoma maligno.

Mediante varios análisis utilizando herramientas de la biología celular y molecular se puede concluir que:

- MICA y MICB se expresan en melanoma maligno y en trofoblasto temprano, preferencialmente en el citoplasma, con bajos niveles en la membrana celular
- CRT interactúa con MICA, pero esta relación podría estar mediada por una proteína chaperona intermedia o dependiente de modificaciones postraduccionales o dependiente de cationes, aspectos no analizados en esta tesis y que requieren mayor investigación.
- IL-10 endógena, proveniente de células transducidas con el gen e IL-10 exógena decrece la expresión en la superficie de MICA en las líneas celulares de melanoma
- La reducción de la expresión en la superficie de MICA, impacta en la disminución de la citotoxicidad celular mediada por células citolíticas activadas

Con estas conclusiones es posible elaborar un diagrama de regulación de los NKG2DL, contribuyendo con estos resultados a los ya descritos en la literatura.

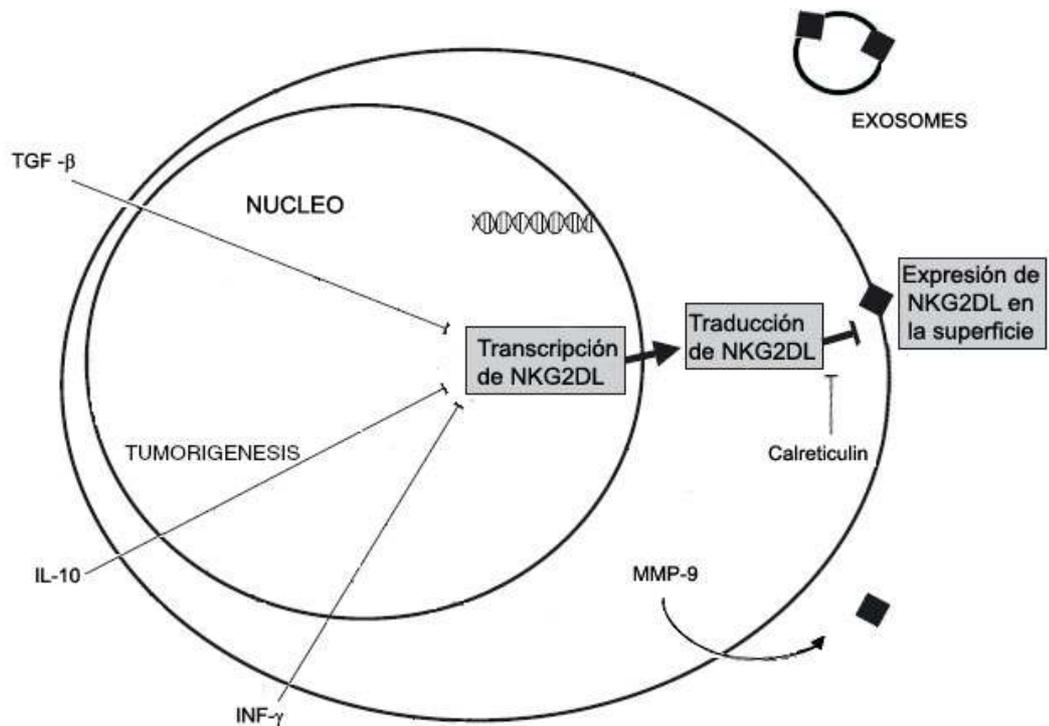


Diagrama 2. Reguladores negativos de la expresión de NKG2DL. Esquema resumen que plantea dos nuevos sistemas de control de la expresión en superficie de NKG2DL. Uno de ellos es el rol de la IL-10 como inmunomodulador, y el otro es la interacción que tendría MICA como retención intracelular en el retículo endoplásmico asociado a un conjunto de moléculas chaperonas. (Adaptado de Mistry et al ⁹³). TGF-β¹¹³ se ha descrito como citoquina que decrece los niveles de MICA en glioma e INF-γ¹³¹ realiza el efecto reductor de los niveles en modelo de células Hela. Esto se suma como mecanismos que decrecen los niveles de NKG2DL en superficie de célula blanco a los ya descritos como la presencia de Metaloproteinasas ¹⁶⁶ y de exosomas ⁸⁸, descritos en la inmuno evasión tumoral, como en la tolerancia fetal.¹¹⁹

11. ANEXO

11.1. Aprobación comité de Ética Servicio de Salud Metropolitano Norte.(SSMN)



Anexo 1: Aprobación del comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte a través del Director de ética Dr. Carlos Navarro Cox y el Director del centro asistencial, Dr. Carlos Bottner

11.2. Consentimiento Informado Aprobado por Comité de Ética SSMN

CONSENTIMIENTO INFORMADO

"ESTUDIO DE PROTEÍNAS CHAPERONAS ASOCIADAS A LA MOLECULA MIC EN PLACENTA HUMANA"

INVESTIGADOR PRINCIPAL: TM ANTONIO E. SERRANO GOMEZ
PROGRAMA DE INMUNOLOGIA
UNIVERSIDAD DE CHILE
FOND 978 6734

Yo _____

Carnet de Identidad No. _____ declaro que estoy en conocimiento de que mi embarazo llego a su fin en forma prematura y que deben nacer la placenta de mi útero para evitar complicaciones. Acepto donar parte de mi placenta, una vez que me la hayan retirado a través del legado. Además acepto donar 10 cc de sangre venosa para lo cual, se me puncionará con una aguja, lo que me pudiera causar dolor al momento de la punción y posteriormente pudiere producirse un pequeño hematoma, el cual se disolverá con el tiempo. Acepto que ambas muestras se utilicen para investigación científica en el marco del Proyecto "ESTUDIO DE PROTEÍNAS CHAPERONAS ASOCIADAS A LA MOLECULA MIC EN PLACENTA HUMANA" que ayudará a entender mejor como la madre interactúa con su feto. Entiendo que toda información derivada de este estudio será confidencial y anónima. Mi participación en esta investigación es totalmente voluntaria.

Después de haber recibido y comprendido la información que aquí se me ha entregado y de haber podido aclarar mis dudas, he aceptado participar en este estudio, otorgando mi consentimiento.

Firma del Paciente

Sr. Antonio E. Serrano Gómez
Tecnólogo Médico, candidato a Ph.D.

Santiago,

Dra. Mercedes López Nibeché
Médico Inmunólogo Clínico


CEL-SSM NORTE
Comité de Ética de Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte
10 NOV. 2006

Anexo 2: Consentimiento Informado Aprobado por el comité de Ética Del SSMN. Documento aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte redactado por la responsable clínico del proyecto Dra. Mercedes López N.

11.3. Ficha de registro muestras de placenta humana de primer trimestre



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE MEDICINA
 INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS (ICBM)
 PROGRAMA DISCIPLINARIO DE INMUNOLOGÍA

FICHA MUESTRAS PLACENTA
ESTUDIO 1er TRIMESTRE

Se solicita muestra de:

- 1) Tejido para Cultivo celular (TUBO TAPA NARANJA) con medio de cultivo y antibióticos.
- 2) Un (1) ml de Sangre en tubo vacutainer [VACUTAINER, TAPA ROJA].

FAVOR AVISAR AL TELEFONO FIJO 978-6088 o al móvil 9865-1277 para el retiro de la muestra tomada a la brevedad. Gracias

Nombre Rut / Nº Ficha

Fecha Nacimiento Edad Gestacional Multiparidad G
 A
 P

Patología asociada al embarazo

Infecciones Asociadas No Sí Patógeno

Fiebre No Sí

Tipo Pérdida Espontánea
 Inducida
 Programada

Nombre Profesional Responsable _____

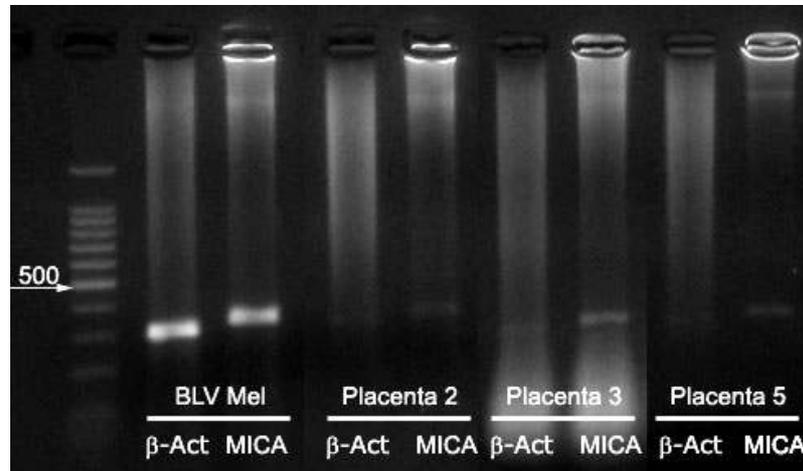
Av. Independencia 1027, Santiago – Chile. Fono: 56-2-9786088, FAX: 56-2-9786979,

Anexo 3: Ficha de ingreso de muestras de pacientes al estudio. Esquema redactado en conjunto con la por la responsable clínico del proyecto Dra. Mercedes López N. Incluye datos personales de la paciente, enfermedades concomitantes y datos relacionados a la paridad y causa probable y tipo de pérdida.

11.4. Tabla de muestras de suero colectadas de embarazos de 1er Trimestre.

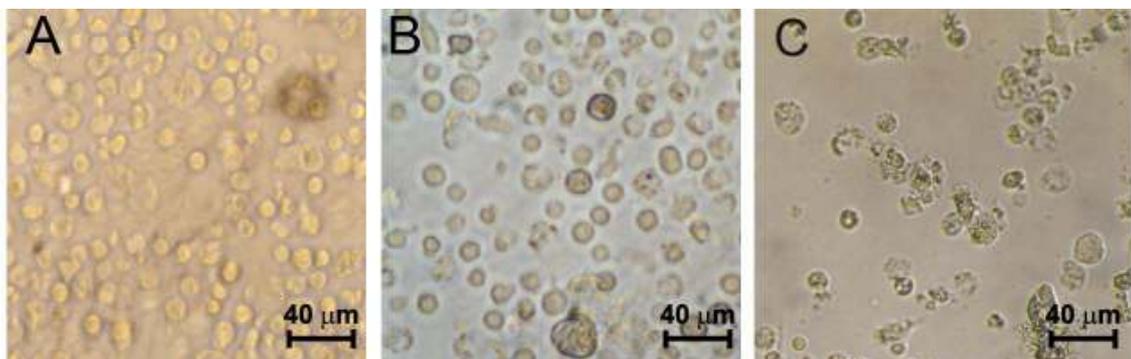
N°	Edad	Edad Gestacional /semanas	Multiparidad			Patología Asociada	Infeccion Asociada	Fiebre	Tipo Pérdida
			G	A	P				
2	48	11	1	0	0	Ezquizofrenia	No	N	Espontánea
3	31	8	6	5	0	No	No	No	Inducida
4	24	9	1	0	0	No	No	No	Inducida
5	34	9	1	0	0	No	No	No	Inducida
6	33	8	2	1	1	No	No	No	Espontánea
7	19	13	1	0	0	No	No	No	Inducida
8	32	12	3	0	3	No	No	No	Espontánea
9	39	9	4	1	2	Ab. Retenido	No	No	Espontánea
10	38	9	1	0	0	No	No	No	Espontánea
11	24	11	2	0	1	No	No	No	Espontánea
12	17	8	2	1	0	No	No	No	Inducida

11.5. RT-PCR para MICA de Trofoblasto de Primer Trimestre.



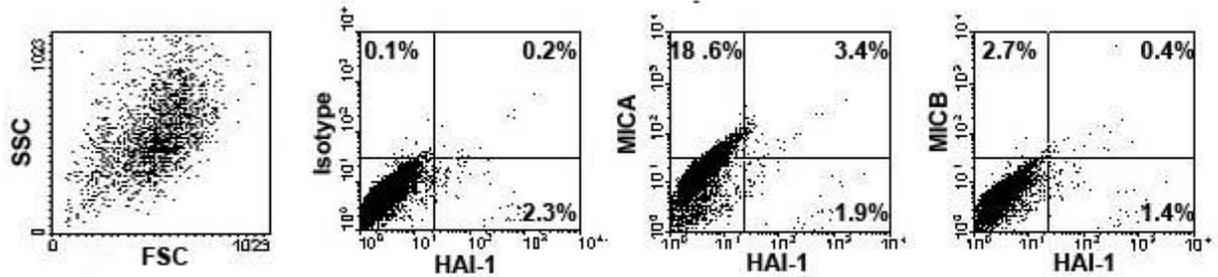
Anexo 5. Expresión del mRNA de MICA en legrado de abortos de primer trimestre. RT-PCR de muestras de tejido que detecta mRNA del ligando de NKG2D MICA a partir de homogenizado de legrado. Se utilizó la línea de melanoma BLV como control positivo y beta actina como control positivo de la reacción

11.6. Separación de células de trofoblasto veloso a partir de placenta de primer trimestre.



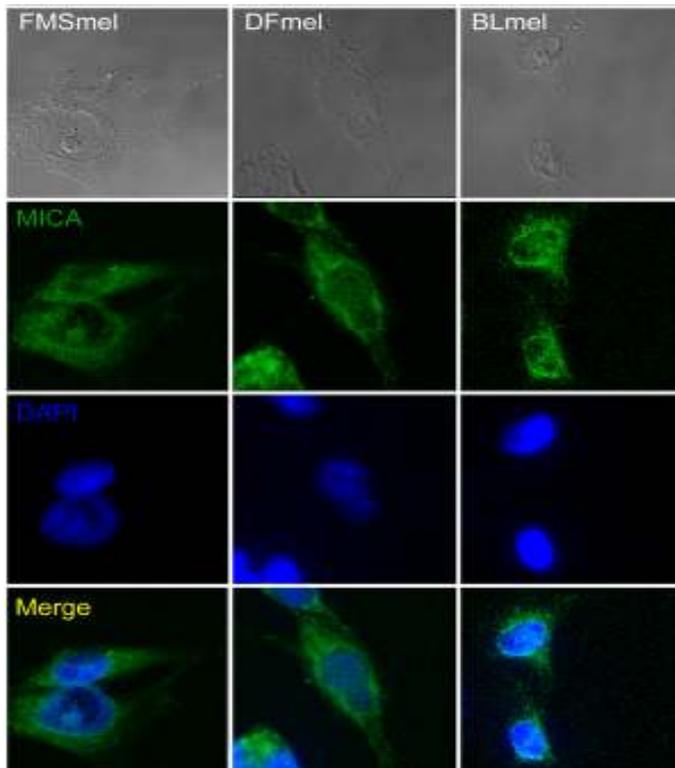
Anexo 6. RPMI 10% FCS y DMEM 10% FCS mantiene viabilidad por 24 horas de cultivo primario de trofoblasto. Fotografías de microscopia de luz invertida de cultivos primarios de células de citotrofoblasto individualizadas como se describe en materiales y métodos provenientes de una placenta de 8 semanas. 48 horas de cultivo en A) DMEM 10% FCS, B) RPMI 10% FCS y C) AIMV.

11.7. MICA se expresa en concentraciones bajas en la superficie de células de citotrofoblasto temprano



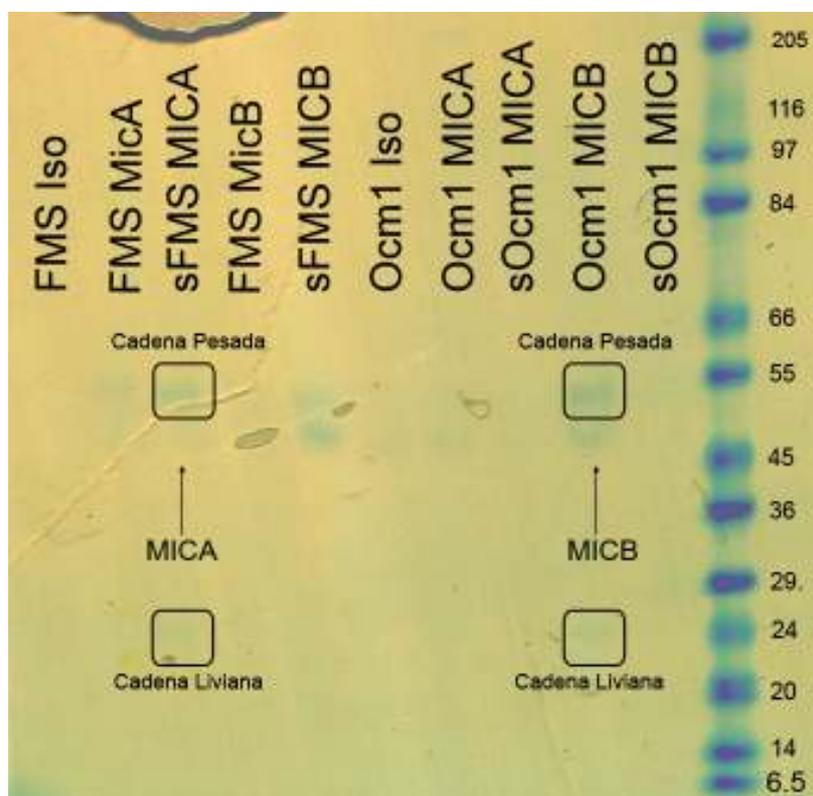
Anexo 7. NKG2DL se expresa en baja densidad en superficie de células HAI-1 positivas. Expresión en la superficie celular de los ligandos MICA y MICB en trofoblasto temprano evaluado por citometría de flujo. Muestra de trofoblasto temprano fue tratada con cóctel de proteasas para la individualización celular, de acuerdo a los Materiales y Métodos. Se indican el porcentaje de células positivas y doble positivas. Resultado representativo de 2 lecturas independientes.

11.8. Células de melanoma maligno expresan MICA intracelular.



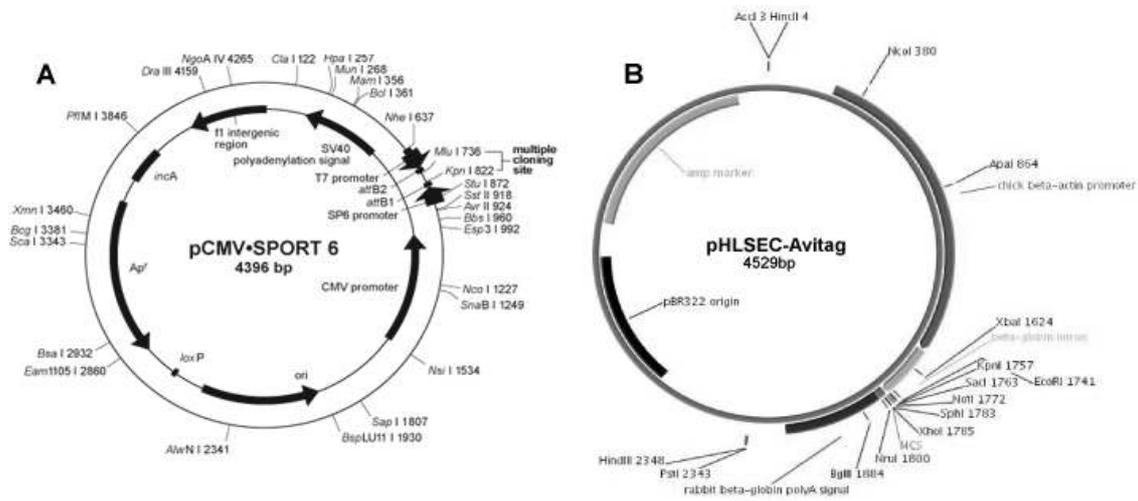
Anexo 8. MICA se expresan en el citoplasma de líneas de células de melanoma maligno. Fotografías de microscopia confocal de línea de melanoma maligno FMS, DF y BL detectando MICA (Verde) en mayoritaria distribución perinuclear. Se detectan además algunas señales intranucleares. Se muestra la superposición final con DAPI (Azul) como marcador nuclear. Fotografías representativas de dos detecciones independientes

11.9. Gel denaturante de proteínas totales de líneas celulares de melanoma inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-MICA y MICB.



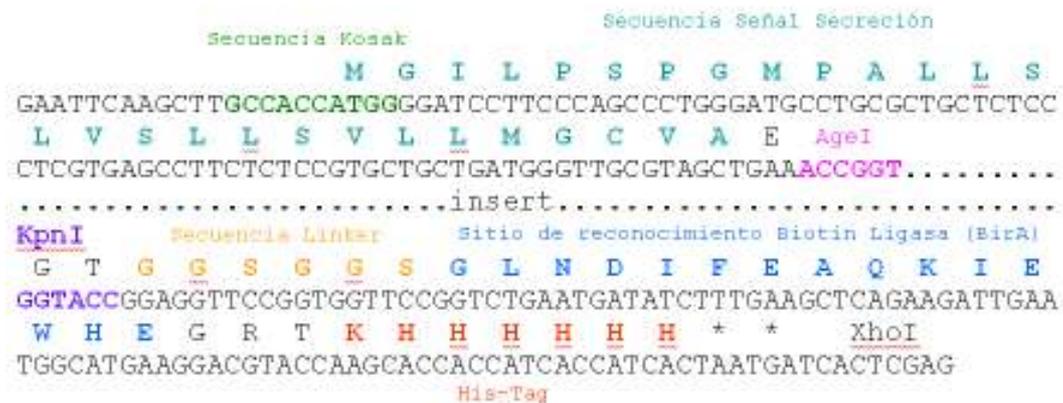
Anexo 9 Inmunoprecipitación y análisis de proteínas totales en gel denaturante, no detecta interacción con otras proteínas. Gel SDS-PAGE la gradiente de 4-12% (Invitrogen .EEUU) cargado con 35 μ L de inmunoprecipitado de líneas celulares de melanoma FMS y OCM-, según Materiales Y Métodos. Se realizó electroforesis durante 1 hora a 100 V, para evidenciar proteínas por tinción de Azul de Coomassie coloidal (SimplyBlue™ SafeStain, Invitrogen EEUU). Se indican los pesos moleculares según patrón de peso molecular de proteínas de amplio rango (Sigma-EEUU). Se indican además los carriles que corresponden a inmunoprecipitado de sobrenadante o de célula total. Se marca cadenas pesada y liviana de los anticuerpos utilizados según peso molecular y se indica MICA/B según peso molecular calculado en base a su secuencia proteica. Se utilizó anticuerpo irrelevante en la inmunoprecipitación como control negativo.

11.10. Mapa de vectores de origen y destino en clonación de genes de NKG2DL



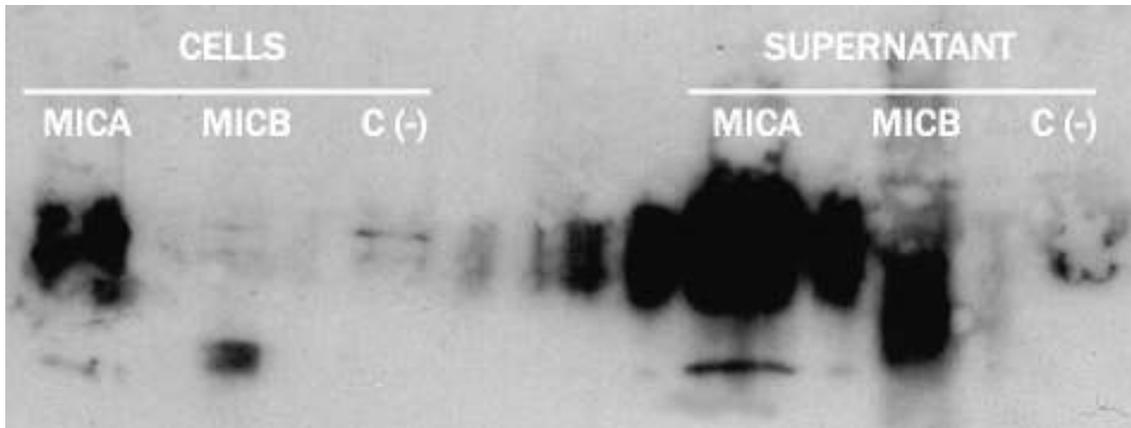
Anexo 10- Mapa de los vectores utilizados en el clonamiento. A) Vector comercial pCMV-SPORT6 de Invitrogen, que codifica para MICA y MICB independientemente. B) Vector de destino pHLsec-Avitag, diseñado para la secreción al extracelular de proteínas recombinantes en células Hek-293 para su uso en Biacore generado en la División de Biología Estructural. Universidad de Oxford¹⁵¹

11.11. Clonamiento del vector pHLSEC-Avitag



Anexo 11. Esquema del sitio de clonamiento del vector pHLSEC-Avitag, utilizado en la expresión recombinante de MICA y MICB en células Hek 293. Este vector cuenta con una Secuencia Kosak, necesaria para su expresión en procarionte, una secuencia señal de secreción para células mamíferas, un sitio de clonamiento flanqueado por secuencias de restricción AgeI y KpnI, una secuencia intermedia que une a el sitio de reconocimiento de la Biotin Ligasa, enzima que permite la unión a la Biotina, necesaria para la unión al chip de lectura de Biacore, y por último una secuencia His-Tag para la identificación y purificación de los transfectos.

11.12. Determinación Proteína recombinante de sobrenadante de cultivo



Anexo 12. pHLSec-Avitag-MICA y pHLSec-Avitag-MICB se secretan al sobrenadante de cultivos de células HEK-293. Inmunoblot anti His-tag de células completas y del sobrenadante de cultivo de HEK-293 de células transfectados con pHLSec-Avitag-MICA y pHLSec-Avitag-MICB y sin transfectar como control negativo. Se generaron 5 μ g de vector y se realizó la transfección a un millón de células Hek-293, utilizando Lipofectin (Invitrogen-EEUU) durante cuatro días en condiciones de cultivo estándar en medio DMEM. Al finalizar la incubación se realizó un western blot anti His-Tag, para determinar la efectividad de la transfección. Utilizando anticuerpos comerciales se pudo comprobar que los constructos pHLSec-Avitag-MICA y pHLSec-Avitag-MICB están mayoritariamente siendo secretados al sobrenadante de cultivo y no en el interior de las células, lográndose así altos títulos de proteína recombinante

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1 de Visser KE, Coussens LM. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol* 2006; **13**: 118-37.
- 2 Burks AW, Laubach S, Jones SM. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **121**: 1344-50.
- 3 Langlois RA, Legge KL. Respiratory dendritic cells: mediators of tolerance and immunity. *Immunol Res* 2007; **39**: 128-45.
- 4 Mayer L, Sperber K, Chan L, Child J, Toy L. Oral tolerance to protein antigens. *Allergy* 2001; **56 Suppl 67**: 12-5.
- 5 Upham JW. The role of dendritic cells in immune regulation and allergic airway inflammation. *Respirology* 2003; **8**: 140-8.
- 6 Riley JK. Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance. *Immunol Invest* 2008; **37**: 395-426.
- 7 Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". *J Immunol* 1998; **160**: 3086-90.
- 8 de Visser KE EA, Coussens LM Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews* 2006; **6**: 24-37.
- 9 Abbas AK LA, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 2007; **6th Ed**.
- 10 Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* 2007; **23**: 1-10.
- 11 Wolska A, Lech-Maranda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett* 2009; **14**: 248-72.
- 12 Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; **319**: 675-8.
- 13 Blair GE, Cook GP. Cancer and the immune system: an overview. *Oncogene* 2008; **27**: 5868.
- 14 Luci C, Tomasello E. Natural killer cells: Detectors of stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**: 2335-40.
- 15 Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008; **27**: 5932-43.
- 16 Erten G, Aktas E, Deniz G. Natural killer cells in allergic inflammation. *Chem Immunol Allergy* 2008; **94**: 48-57.
- 17 Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 887-99.
- 18 Alba A, Planas R, Clemente X, Carrillo J, Ampudia R, Puertas MC *et al*. Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon-beta. *Clin Exp Immunol* 2008; **151**: 467-75.
- 19 Lopez MN, Pereda C, Ramirez M, Mendoza-Naranjo A, Serrano A, Ferreira A *et al*. Melanocortin 1 receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 1219-27.
- 20 Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; **18**: 159-70.
- 21 Woodhead AD, Setlow RB, Tanaka M. Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer. *J Epidemiol* 1999; **9**: S102-14.
- 22 Fauci AS. New and reemerging diseases: the importance of biomedical research. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 374-8.
- 23 Kaempffer EMaA. Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. *Rev Med Chil* 2001; **129**: 1195-202.
- 24 Ebert EC GV. Dissection of spontaneous cytotoxicity by human intestinal intraepithelial lymphocytes: MIC on colon cancer triggers NKG2D-mediated lysis through Fas ligand. *Immunology* 2008; **124**: 33-41.
- 25 Geneser F. *Textbook of histology*, 1st edn. Copenhagen Philadelphia: Munksgaard ; Lea & Febiger, 1986.

- 26 Soares MJ, Hunt JS. *Placenta and trophoblast : methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2006.
- 27 Scharte M, Han X, Bertges DJ, Fink MP, Delude RL. Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; **284**: G373-84.
- 28 Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**: 1061-9.
- 29 Venkataraman GM, Suci D, Groh V, Boss JM, Spies T. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 2007; **178**: 961-9.
- 30 Miki N, Ikuta M, Matsui T. Hypoxia-induced activation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha4 gene by an interaction between hypoxia-inducible factor-1 and Sp1. *J Biol Chem* 2004; **279**: 15025-31.
- 31 Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**: 3676-80.
- 32 Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000; **12**: 547-54.
- 33 Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG *et al*. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy* 2005; **88**: 181-99.
- 34 Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D *et al*. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000; **164**: 5721-8.
- 35 Guilbert L, Robertson SA, Wegmann TG. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. *Immunol Cell Biol* 1993; **71 (Pt 1)**: 49-57.
- 36 Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer* 1994; **56**: 755-60.
- 37 Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR *et al*. Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**: 4684-8.
- 38 Zhang H, Palmer R, Gao X, Kreidberg J, Gerald W, Hsiao L *et al*. Transcriptional activation of placental growth factor by the forkhead/winged helix transcription factor FoxD1. *Curr Biol* 2003; **13**: 1625-9.
- 39 Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factor in pregnancy: studies in a growth hormone-deficient dwarf. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; **54**: 1101-3.
- 40 Hernandez J, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Characterization of the effects of human placental HGF on rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1992; **150**: 116-21.
- 41 Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; **5**: 112-7.
- 42 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; **22**: 633-40.
- 43 Andoniou CE, Coudert JD, Degli-Esposti MA. Killers and beyond: NK-cell-mediated control of immune responses. *Eur J Immunol* 2008; **38**: 2938-42.
- 44 Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L *et al*. NK cells and cancer. *J Immunol* 2007; **178**: 4011-6.
- 45 Perricone R, Perricone C, De Carolis C, Shoenfeld Y. NK cells in autoimmunity: a two-edged weapon of the immune system. *Autoimmun Rev* 2008; **7**: 384-90.
- 46 Morandi B, Bramanti P, Bonaccorsi I, Montalto E, Oliveri D, Pezzino G *et al*. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol Res* 2008; **57**: 1-5.
- 47 Kroemer A, Xiao X, Degauque N, Edtinger K, Wei H, Demirci G *et al*. The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. *J Immunol* 2008; **180**: 7818-26.
- 48 Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Baltar JM, Ortega F, Lopez-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant* 2009; **9**: 251-7.
- 49 Tanaka J. [Role of NK cell receptor-expressing cells in the regulation of GVHD and GVL]. *Rinsho Ketsueki* 2008; **49**: 598-606.

- 50 Sentman CL, Olsson MY, Karre K. Missing self recognition by natural killer cells in MHC class I transgenic mice. A 'receptor calibration' model for how effector cells adapt to self. *Semin Immunol* 1995; **7**: 109-19.
- 51 van den Heuvel MJ, Chantakru S, Xuemei X, Evans SS, Tekpetey F, Mote PA *et al.* Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest* 2005; **34**: 273-93.
- 52 van den Heuvel MJ, Xie X, Tayade C, Peralta C, Fang Y, Leonard S *et al.* A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 2005; **54**: 322-31.
- 53 Xie X, He H, Colonna M, Seya T, Takai T, Croy BA. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. *Biol Reprod* 2005; **73**: 510-8.
- 54 Eriksson M, Meadows SK, Wira CR, Sentman CL. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. *J Leukoc Biol* 2004; **76**: 667-75.
- 55 Seaman WE. Natural killer cells and natural killer T cells. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 1204-17.
- 56 Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008; **14**: 179-89.
- 57 Poggi A, Prevosto C, Massaro AM, Negrini S, Urbani S, Pierri I *et al.* Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of Nkp30 and NKG2D receptors. *J Immunol* 2005; **175**: 6352-60.
- 58 Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 329-39.
- 59 Lanier L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; **5**: 495-502.
- 60 Anfossi N, Andre P, Guida S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA *et al.* Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006; **25**: 331-42.
- 61 Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; **9**: 503-10.
- 62 Diefenbach A, Raulet DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 2001; **181**: 170-84.
- 63 Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 2008; **27**: 5944-58.
- 64 Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000; **1**: 119-26.
- 65 Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; **2**: 255-60.
- 66 Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 2004; **172**: 2001-5.
- 67 Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; **285**: 727-9.
- 68 Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC *et al.* NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* 2001; **167**: 5527-30.
- 69 Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 737-44.
- 70 Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood* 2004; **103**: 3065-72.
- 71 Caillat-Zucman S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2009; **73**: 1-8.
- 72 Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; **7**: 524-32.
- 73 Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F, Coligan JE. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol* 2006; **176**: 1490-7.
- 74 Song H, Hur DY, Kim KE, Park H, Kim T, Kim CW *et al.* IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol* 2006; **242**: 39-45.

- 75 Horng T, Bezbradica JS, Medzhitov R. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol* 2007; **8**: 1345-52.
- 76 Colucci F. Unexpected partnership between IL-15 and DAP10. *Nat Immunol* 2007; **8**: 1289-91.
- 77 Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Tian Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol* 2008; **69**: 490-500.
- 78 Perez-Rodriguez M, Corell A, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SG *et al.* A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 2000; **55**: 162-5.
- 79 Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 12445-50.
- 80 Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1998; **47**: 139-48.
- 81 Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; **14**: 123-33.
- 82 Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **305**: 129-35.
- 83 Eagle RA, Flack G, Warford A, Martinez-Borra J, Jafferji I, Traherne JA *et al.* Cellular expression, trafficking, and function of two isoforms of human ULBP5/RAET1G. *PLoS ONE* 2009; **4**: e4503.
- 84 Nausch N CA. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 2008; **27**: 5944-58.
- 85 Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; **419**: 734-8.
- 86 Salih HR GD, and Steinle A. Release of MICB Molecules by Tumor Cells: Mechanism and Soluble MICB in Sera of Cancer Patients. *Human Immunology* 2006; **67**: 188-95.
- 87 Roda-Navarro P, Vales-Gomez M, Chisholm SE, Reyburn HT. Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 11258-63.
- 88 Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008; **180**: 7249-58.
- 89 Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum Immunol* 2006; **67**: 159-69.
- 90 Cerwenka A. New twist on the regulation of NKG2D ligand expression. *J Exp Med* 2009; **206**: 265-8.
- 91 McSharry BP, Burgert HG, Owen DP, Stanton RJ, Prod'homme V, Sester M *et al.* Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. *J Virol* 2008; **82**: 4585-94.
- 92 Hayakawa Y, Kelly JM, Westwood JA, Darcy PK, Diefenbach A, Raulet D *et al.* Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J Immunol* 2002; **169**: 5377-81.
- 93 Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 2007; **121**: 439-47.
- 94 Strid J, Roberts SJ, Filler RB, Lewis JM, Kwong BY, Schpero W *et al.* Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis. *Nat Immunol* 2008; **9**: 146-54.
- 95 Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanitsky N *et al.* Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1065-73.
- 96 Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A *et al.* Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; **68**: 6368-76.
- 97 Regunathan J, Chen Y, Wang D, Malarkannan S. NKG2D receptor-mediated NK cell function is regulated by inhibitory Ly49 receptors. *Blood* 2005; **105**: 233-40.
- 98 McFarland BJ, Kortemme T, Yu SF, Baker D, Strong RK. Symmetry recognizing asymmetry: analysis of the interactions between the C-type lectin-like immunoreceptor NKG2D and MHC class I-like ligands. *Structure (Camb)* 2003; **11**: 411-22.
- 99 Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 2002; **169**: 4079-83.

- 100 Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2001; **2**: 443-51.
- 101 O'Callaghan CA, Cerwenka A, Willcox BE, Lanier LL, Bjorkman PJ. Molecular competition for NKG2D: H60 and RAE1 compete unequally for NKG2D with dominance of H60. *Immunity* 2001; **15**: 201-11.
- 102 Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Kinder J, Ho EL, Fremont DH, Yokoyama WM. Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 597-605.
- 103 Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *Embo J* 2004; **23**: 255-9.
- 104 Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T *et al*. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001; **15**: 83-93.
- 105 Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A *et al*. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 2977-82.
- 106 Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 6879-84.
- 107 Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T *et al*. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* 2003; **104**: 354-61.
- 108 Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 9452-7.
- 109 Martin-Pagola A, Perez-Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R *et al*. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics* 2004; **56**: 549-54.
- 110 Raulet D. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 781-90.
- 111 Ebert EC, Groh V. Dissection of spontaneous cytotoxicity by human intestinal intraepithelial lymphocytes: MIC on colon cancer triggers NKG2D-mediated lysis through Fas ligand. *Immunology* 2008; **124**: 33-41.
- 112 Vetter CS, Lieb W, Brocker EB, Becker JC. Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma. *Br J Cancer* 2004; **91**: 1495-9.
- 113 Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A *et al*. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 2006; **129**: 2416-25.
- 114 Stiles JD, Ostrow PT, Balos LL, Greenberg SJ, Plunkett R, Grand W *et al*. Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 435-9.
- 115 Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I *et al*. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer* 2000; **89**: 251-8.
- 116 Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; **295**: 2387-92.
- 117 Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 2004; **114**: 560-8.
- 118 Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 2006; **118**: 684-7.
- 119 Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I *et al*. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol* 2006; **176**: 3585-92.
- 120 Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 122-31.
- 121 Bischof P, Meisser A, Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review. *Placenta* 2000; **21 Suppl A**: S55-60.
- 122 Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG *et al*. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; **102**: 1389-96.

- 123 Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 2006; **31**: 402-10.
- 124 Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulat DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; **436**: 1186-90.
- 125 Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, Iannitto ML, Ricciardi MR, Di Galleonardo V *et al.* ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* 2009; **113**: 3503-11.
- 126 Elsner L, Flugge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY *et al.* The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *J Cell Mol Med* 2009.
- 127 Qiao Y, Liu B, Li Z. Activation of NK cells by extracellular heat shock protein 70 through induction of NKG2D ligands on dendritic cells. *Cancer Immunol* 2008; **8**: 12.
- 128 Kluwe J, Mencin A, Schwabe RF. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med* 2009; **87**: 125-38.
- 129 Kloss M, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee HG *et al.* Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol* 2008; **181**: 6711-9.
- 130 Friese MA, Wischhusen J, Wick W, Weiler M, Eisele G, Steinle A *et al.* RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 2004; **64**: 7596-603.
- 131 Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I *et al.* Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer* 2009; **124**: 1594-604.
- 132 Li K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Suzuki A, Yagi H *et al.* Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 2009; **58**: 641-52.
- 133 Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H. IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *J Clin Invest* 2008; **118**: 1398-404.
- 134 Huang DR, Zhou YH, Xia SQ, Liu L, Pirskanen R, Lefvert AK. Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL-10) gene in myasthenia gravis: implications of diverse effects of IL-10 in the pathogenesis of the disease. *J Neuroimmunol* 1999; **94**: 82-7.
- 135 Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol* 2002; **57**: 217-24.
- 136 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683-765.
- 137 Kurte M, Lopez M, Aguirre A, Escobar A, Aguilon JC, Charo J *et al.* A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *J Immunol* 2004; **173**: 1731-7.
- 138 Power LL, Popplewell EJ, Holloway JA, Diaper ND, Warner JO, Jones CA. Immunoregulatory molecules during pregnancy and at birth. *J Reprod Immunol* 2002; **56**: 19-28.
- 139 Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007; **581**: 3641-51.
- 140 Williams DB. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 2006; **119**: 615-23.
- 141 Coppolino MG, Dedhar S. Calreticulin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 553-8.
- 142 Ferreira V, Molina MC, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends Parasitol* 2005; **21**: 169-74.
- 143 Gelebart P, Opas M, Michalak M. Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 260-6.
- 144 Guo L, Groenendyk J, Papp S, Dabrowska M, Knoblauch B, Kay C *et al.* Identification of an N-domain histidine essential for chaperone function in calreticulin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 50645-53.
- 145 Liu M, Imam H, Oberg K, Zhou Y. Gene transfer of vasostatin, a calreticulin fragment, into neuroendocrine tumor cells results in enhanced malignant behavior. *Neuroendocrinology* 2005; **82**: 1-10.
- 146 Harada K, Okiyonedo T, Hashimoto Y, Ueno K, Nakamura K, Yamahira K *et al.* Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 2006; **281**: 12841-8.

- 147 Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Ferreira A. Parasite Calreticulin: Possible Roles in the Parasite /host Interface. *Inmunología* 2002; **21**: 156-68.
- 148 Molinari M, Helenius A. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* 2000; **288**: 331-3.
- 149 Petersson M, Charo J, Salazar-Onfray F, Noffz G, Mohaupt M, Qin Z *et al.* Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. *J Immunol* 1998; **161**: 2099-105.
- 150 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 4350-4.
- 151 Aricescu AR, Lu W, Jones EY. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2006; **62**: 1243-50.
- 152 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156-9.
- 153 Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chappuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968; **14**: 181-96.
- 154 Potgens AJ, Kataoka H, Ferstl S, Frank HG, Kaufmann P. A positive immunoselection method to isolate villous cytotrophoblast cells from first trimester and term placenta to high purity. *Placenta* 2003; **24**: 412-23.
- 155 Salazar-Onfray F, Lopez M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A *et al.* Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer* 2002; **87**: 414-22.
- 156 Salazar-Onfray F. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med Oncol* 1999; **16**: 86-94.
- 157 Stenqvist AC, Chen T, Hedlund M, Dimova T, Nagaeva O, Kjellberg L *et al.* An efficient optimized method for isolation of villous trophoblast cells from human early pregnancy placenta suitable for functional and molecular studies. *Am J Reprod Immunol* 2008; **60**: 33-42.
- 158 Apps R, Gardner L, Traherne J, Male V, Moffett A. Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48. *Hum Reprod* 2008; **23**: 2535-48.
- 159 Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; **291**: L222-31.
- 160 Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; **279**: 1737-40.
- 161 Furtges MB GM, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, Barrio MM, Mordoh J, Rabinovich GA, Zwirner NW. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity *The Journal of Immunology* 2008; **180**: 4606-14.
- 162 Kobayashi S, Uchiyama S, Sone T, Noda M, Lin L, Mizuno H *et al.* Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 2006; **115**: 10-5.
- 163 Kobayashi S US, Sone T, Noda M, Lin L, Mizuno H, Matsunaga S, Fukui K. Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 2006; **115**: 10-15.
- 164 Zou Y, Stastny P. Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunogenetics* 2002; **54**: 671-4.
- 165 Butler JE, Moore MB, Presnell SR, Chan HW, Chalupny NJ, Lutz CT. Proteasome regulation of ULBP1 transcription. *J Immunol* 2009; **182**: 6600-9.
- 166 Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH *et al.* Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 2007; **447**: 482-6.
- 167 Zhang Y KG, Pocanschi CL, Brockmeier U, Ireland BS, Maattanen P, Howe Ch, Elliott T, Gehring K, Williams DB ERp57 does not require interactions with Calnexin and Calreticulin to promote assembly of class I Histocompatibility Molecules and it enhances peptide loading independently of its redox activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2009: JBC Papers in Press.

- 168 Rodriguez-Rodero S, Gonzalez S, Rodrigo L, Fernandez-Morera JL, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A *et al.* Transcriptional regulation of MICA and MICB: a novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 1938-53.
- 169 Zhang C, Niu J, Zhang J, Wang Y, Zhou Z, Tian Z. Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors. *Cancer Sci* 2008; **99**: 1279-86.
- 170 Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; **169**: 4098-102.
- 171 Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 2520-6.
- 172 Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C *et al.* Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 2004; **6**: 558-68.
- 173 Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, Barrio MM *et al.* Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 2008; **180**: 4606-14.
- 174 Spies T. Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1013-5.
- 175 Yadav D, Ngolab J, Lim RS, Krishnamurthy S, Bui JD. Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA. *J Immunol* 2009; **182**: 39-43.
- 176 Aguera-Gonzalez S, Boutet P, Reyburn HT, Vales-Gomez M. Brief residence at the plasma membrane of the MHC class I-related chain B is due to clathrin-mediated cholesterol-dependent endocytosis and shedding. *J Immunol* 2009; **182**: 4800-8.
- 177 Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P *et al.* Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 1994; **180**: 2371-6.
- 178 Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; **248**: 1230-4.
- 179 Zdanov A, Schalk-Hihi C, Menon S, Moore KW, Wlodawer A. Crystal structure of Epstein-Barr virus protein BCRF1, a homolog of cellular interleukin-10. *J Mol Biol* 1997; **268**: 460-7.
- 180 Ndubuisi MI, Guo GG, Fried VA, Etlinger JD, Sehgal PB. Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem* 1999; **274**: 25499-509.
- 181 Gu VY, Wong MH, Stevenson JL, Crawford KE, Brennecke SP, Gude NM. Calreticulin in human pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2008; **14**: 309-15.
- 182 Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Jin SM *et al.* Involvement of IL-10 in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated anti-inflammatory response in asthma. *Mol Pharmacol* 2005; **68**: 1568-75.
- 183 Szatmari I, Pap A, Ruhl R, Ma JX, Illarionov PA, Besra GS *et al.* PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* 2006; **203**: 2351-62.
- 184 Deniz G, Erten G, Kucuksezer UC, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E *et al.* Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 2008; **180**: 850-7.
- 185 Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 679-90.
- 186 Simmons MA. Functional selectivity, ligand-directed trafficking, conformation-specific agonism: what's in a name? *Mol Interv* 2005; **5**: 154-7.
- 187 Hruby VJ, Cai M, Dedek M, Qu H, Palmer E, Mayorov A *et al.* Peptide and non-peptide mimetics utilize different pathways for signal transduction. *Adv Exp Med Biol* 2009; **611**: 305-7.
- 188 Sweeney C, Carraway KL, 3rd. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* 2000; **19**: 5568-73.
- 189 Belleudi F, Leone L, Nobili V, Raffa S, Francescangeli F, Maggio M *et al.* Keratinocyte growth factor receptor ligands target the receptor to different intracellular pathways. *Traffic* 2007; **8**: 1854-72.
- 190 Chau LA, Bluestone JA, Madrenas J. Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor. *J Exp Med* 1998; **187**: 1699-709.

- 191 Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE *et al.* Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 2005; **6**: 928-37.
- 192 Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E, Cebecauer M, Colonna M, Vivier E *et al.* Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood* 2005; **106**: 1711-7.
- 193 Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T *et al.* Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 2005; **175**: 720-9.
- 194 Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L *et al.* NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1251-63.
- 195 Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig KW. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 7641-6.
- 196 Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL *et al.* An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; **285**: 730-2.
- 197 Giurisato E, Cella M, Takai T, Kurosaki T, Feng Y, Longmore GD *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required to form the NKG2D immunological synapse. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 8583-99.
- 198 Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002; **168**: 671-9.
- 199 Khurana D, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. Differential regulation of human NK cell-mediated cytotoxicity by the tyrosine kinase Itk. *J Immunol* 2007; **178**: 3575-82.
- 200 Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN *et al.* Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004; **21**: 357-66.
- 201 Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 2003; **4**: 557-64.
- 202 Radaev S, Rostro B, Brooks AG, Colonna M, Sun PD. Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity* 2001; **15**: 1039-49.
- 203 O'Callaghan CA, Jones EY. Structural and energetic aspects of multispecific immune recognition by NKG2D. *Structure* 2003; **11**: 360-1.
- 204 Radaev S, Kattah M, Zou Z, Colonna M, Sun PD. Making sense of the diverse ligand recognition by NKG2D. *J Immunol* 2002; **169**: 6279-85.

*Tan difícil entender
este universo vasto
Que cabe gracioso
en la punta de mi alfiler.*

*Cerrar los ojos y creer
que solo un electrón juguetero
cierra el circuito perfecto
que le da forma a mi éxito
a mi trabajo
a mi sueldo
y también a mis sueños.*

*¡Salta Electrón Salta!
Y dale forma a mi vuelo*

23G08

<http://xideral.blogspot.com>

Octubre 2009