

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**DESARROLLO DE CÉLULAS NK DE TIPO MEMORIA ESPECÍFICAS DE
LA NUCLEOPROTEÍNA PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN
POR EL VIRUS DE INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Por:

Q.C.B. EDGAR IVÁN MONTES ZAPATA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

Junio 2025

**DESARROLLO DE CÉLULAS NK DE TIPO MEMORIA ESPECÍFICAS DE LA
NUCLEOPROTEÍNA PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS
DE INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Aprobación de la tesis.



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Director



Dr. C. Eduardo Vázquez Garza

Miembro de la comisión



Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona

Miembro de la comisión



Dr. Med. Felpe Arturo Morales Martínez

Subdirector de estudios de posgrado

**DESARROLLO DE CÉLULAS NK DE TIPO MEMORIA ESPECÍFICAS DE LA
NUCLEOPROTEÍNA PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR
EL VIRUS DE INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Presentado por:

Q.C.B. Edgar Iván Montes Zapata

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular del Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" con el número de registro: **IN24-00001.**



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Director de Tesis



Dr. C. Eduardo Vázquez Garza

Miembro de la comisión



Dra. C. María de los Ángeles

Castro Corona

Miembro de la comisión

DEDICATORIA

A mi madre, María Luisa

Quien siempre me ha incentivado a tomar nuevos proyectos y oportunidades a fin de dar lo mejor de mí.

A mi padre, Jesús Ignacio

Que me ha enseñado el significado del trabajo arduo, la responsabilidad y el estar siempre abierto a nuevos retos y aprendizajes.

A mi hermana, Diana Lucía

Quien siempre me ha apoyado, tanto durante esta etapa de mi vida, como en todas las demás.

A mis tías, Claudia y Esther

Quienes siempre están para mí y me brindan su ayuda y su cariño en cada etapa de mi vida.

A mis amigos

Quienes han sido mi espacio seguro y mi segunda familia.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Adrián Rosas por aceptarme como su alumno, asesorarme y guiarme en este proyecto que realizamos juntos.

A la Dra. Alma Yolanda Arce por siempre brindarme su apoyo en cada paso que decido tomar dentro de mi formación y facilitarme la estancia en su laboratorio.

Al Dr. Mario César Salinas por incentivar me y brindarme la oportunidad de realizar el posgrado.

Al Dr. Eduardo Vázquez y la Dra. María de los Ángeles Castro por todos sus consejos, cuestionamientos y retroalimentación durante el desarrollo de este proyecto.

A los profesores del Servicio de Inmunología por cada una de las clases impartidas, la crítica constructiva recibida y las enseñanzas transmitidas, sepan que cada uno dejó algo en mí que me ayudó a comprender mejor la ciencia.

A la Q.C.B. Azalia Martínez por ser un gran apoyo y siempre brindarme ánimo.

A todos los miembros del Laboratorio de Inmunomolecular por su apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

A mis amigos de posgrado: Luis, Luisa, Tomás, Armando, Cristina y Ana Melissa por acompañarme en esta travesía que fue la maestría, por apoyarme en mis seminarios y clases, por responder cualquier duda que tenía, por orientarme en mis errores y motivarme en mis aciertos, y por estar para mí ante cualquier situación académica o personal.

Por último, agradezco a la convocatoria de PROACTI Fase I y Fase II por brindar el apoyo financiero que hizo posible la realización de este proyecto.

RESUMEN

Q.C.B. Edgar Iván Montes Zapata

Fecha de titulación: 24/06/2025

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título de estudio: Desarrollo de células NK de tipo memoria específicas de la nucleoproteína para el control de la infección por el virus de influenza A H1N1pdm09

Número de páginas: 82

Candidato para la obtención del grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Área de estudio: Inmunología

Propósito y diseño del estudio: Las células NK son linfocitos innatos que actúan frente a células infectadas por virus. El propósito de este estudio fue desarrollar células NK de tipo memoria específicas para la NP del virus de influenza A H1N1pdm09, con el fin de evaluar su capacidad para eliminar células infectadas. Se realizó la expansión de células NK humanas utilizando IL-2 e IL-2/IL-15. Estas células fueron estimuladas con péptidos de la NP y se analizó su inmunofenotipo por citometría de flujo, así como la capacidad citotóxica frente a células A549 infectadas con el virus mediante ensayo de MTT.

Contribución y conclusión: La expansión con IL-2/IL-15 mejoró significativamente el número ($P=0.0035$), viabilidad ($P=0.0197$) y pureza ($P<0.0001$) de células NK. Las células estimuladas con NP mostraron mayor expresión de NKp46 ($P=0.0078$), NKG2C ($P=0.0239$) y LAMP-1 ($P=0.0158$). Las células NKp46⁺NKG2C⁺ expresaron niveles elevados de IFN- γ ($P<0.0001$) y Granzima B ($P=0.0012$). Además, mostraron mayor citotoxicidad contra células infectadas ($P<0.0001$). En conclusión, las células NK de tipo memoria específicas de la nucleoproteína del virus de influenza A H1N1 incrementan la eliminación de células infectadas con el virus.

FIRMA DIRECTOR DE TESIS



Dr. C. Adrián Giovanni Rosas Taraco

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Influenza.....	1
1.1.1 Virus de Influenza A.....	2
1.1.2 Nucleoproteína.....	4
1.2 Células NK.....	6
1.2.1 Subpoblaciones de células NK.....	7
1.2.2 Células NK y citocinas.....	9
1.2.3 Células NK de tipo memoria.....	11
CAPÍTULO 2	
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Primeras evidencias de células NK de tipo memoria frente a virus..	14
2.2 Células NK de tipo memoria frente a virus en humanos.....	16
CAPÍTULO 3	
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
CAPÍTULO 4	
4. HIPÓTESIS.....	21
CAPÍTULO 5	
5. OBJETIVOS.....	22

5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO 6	
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1 Población de estudio.....	23
6.2 Aislamiento células NK.....	24
6.3 Prueba de viabilidad y pureza.....	25
6.4 Expansión de células NK y estimulación con NP del VIA.....	25
6.5 Fenotipificación.....	26
6.6 Ensayos de citotoxicidad celular.....	27
6.7 Análisis estadísticos.....	29
CAPÍTULO 7	
7. RESULTADOS.....	30
7.1 Características de los sujetos de estudio.....	30
7.2 IL-2 en combinación con IL-15 logró una mayor expansión y pureza de las células NK.....	30
7.3 Las células NK estimuladas con nucleoproteína presentan un fenotipo de tipo memoria y un perfil de activación.....	34
7.4 El fenotipo de las células NK estimuladas con nucleoproteína es Similar entre sujetos vacunados y no vacunados.....	37
7.5 La evaluación mediante t-SNE revela subpoblaciones de células NK de tipo memoria específicas de la NP de VIA.....	39
7.6 Existe correlacion entre los marcadores de tipo memoria y la expresión de marcadores de activación LAMP-1 e IFN- γ	40

7.7 Las células NK tipo memoria NKp46 ⁺ NKG2C ⁺ expresan marcadores de activación.....	42
7.8 Las células NK tipo memoria específicas de la NP del VIA muestran una mayor citotoxicidad contra células A549 infectadas con VIA.....	46
CAPÍTULO 8	
8. DISCUSIÓN.....	48
CAPÍTULO 9	
9. CONCLUSIÓN.....	55
CAPÍTULO 10	
10. PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS.....	57
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Tabla 2. Características de los sujetos de estudio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del VIA

Figura 2. Tipos de receptores de células NK.

Figura 3. Subpoblaciones de células NK.

Figura 4. Receptores de citocinas IL-2 e IL-15.

Figura 5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para el reclutamiento de sujetos aparentemente sanos.

Figura 6. Imágenes representativas de las células NK en expansión en las dos condiciones empleadas y a diversos días de expansión.

Figura 7. Estrategia de análisis empleada para determinar pureza y subpoblaciones de células NK previo y después de la expansión.

Figura 8. Análisis de la cantidad, viabilidad, pureza y subpoblaciones previo y posterior a la expansión de células NK.

Figura 9. Estrategia de análisis de fenotipo de células NK de tipo memoria.

Figura 10. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56^{DIM} estimuladas con nucleoproteína (NK NP) y sin estimular (NK SE).

Figura 11. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56^{BRIGHT} esrimuladas con nucleoproteína (NK NP) sin estimular (NK SE).

Figura 12. Expresión de marcadores de fenotipo de células NK CD56^{DIM} y células NK CD56^{BRIGHT} de sujetos vacunados y no vacunados.

Figura 13. Proyección bidimensional de tSNE de células NK.

Figura 14. Correlcación de los marcadores de células NK

Figura 15. Porcentaje de células NK doble positivas y doble negativas.

Figura 16. Expresión de marcadores de activación de células NK doble positivas.

Figura 17. Porcentaje de citotoxicidad de células NK frente a células A549.

Figura 18. Potencia citotóxica total de células NK.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Del inglés “Protein kinase B”
ARN	Ácido ribonucleico
ARNv	Ácido ribonucleico viral
CMV	Citomegalovirus
CTD	Del inglés “C-terminal domain”
CTLR	Del inglés “C-Type Lectin Receptors”
HA	Hemaglutinina
HLA	Del inglés “Human leukocyte antigen”
IFN	Del inglés “Interferon”
IFNG	Del inglés “Interferon Gamma gene”
JAK	Del inglés “Janus kinase”
MEK	Del inglés “Mitogen-activated extracellular signal-regulated
kinase”	
MHC	Del inglés “Major histocompatibility complex”
mTOR	Del inglés “mammalian target of rapamycin”
NA	Neuraminidasa
NP	Nucleoproteína
NK	Del inglés “Natural Killer”
NS1	Del inglés “Non structural 1”
NS2	Del inglés “Non structural 2”
NTD	Del inglés “N-terminal domain”
PA	Proteína ácida

PB1	Proteína básica 1
PB2	Proteína básica 2
PI3K	Del inglés “Phosphatidylinositol 3-kinase”
RNP	Ribonucleoproteínas
STAT	Del inglés “Signal transducers and activation of transcription”
SE	Sin estímulo
VEB	Virus del Epstein-Barr
VHB	Virus de hepatitis B
VHC	Virus de hepatitis C
VHS	Virus del herpes simple
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de inmunodeficiencia en simios
VSV	Virus de estomatitis vesicular
VVZ	Virus de varicela zóster

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Influenza

Los virus de la influenza son un grupo de virus que pertenecen a la familia Orthomyxoviridae. Esta familia está compuesta por virus con envoltura cuyo genoma consiste en segmentos de ARN monocatenario de polaridad negativa. Existen cuatro géneros de esta familia: A, B, C y D, de los cuales, solo los géneros A y B tienen relevancia clínica en humanos (1). Los virus de la influenza se transmiten principalmente por aerosoles conteniendo gotas relativamente grandes ($>5 \mu\text{m}$) generadas al hablar, toser o estornudar, y que penetran en las mucosas por contacto a corta distancia. Por otro lado, la transmisión también podría ocurrir por los llamados núcleos de gotas más pequeños ($<5 \mu\text{m}$) y pueden permanecer en el aire durante períodos más largos de tiempo. (2) Además, la transmisión puede ocurrir por contacto directo con superficies contaminadas con el virus y el posterior contacto boca-nariz. Después de la infección, los virus se replican en las mucosas nasal y laríngea. Esta replicación también afecta las vías respiratorias inferiores a medida que la infección progresa. Una característica clínica de la influenza humana es un aumento repentino de la temperatura corporal mayor a $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$ entre 1 y 3 días posteriores a la infección. Otros síntomas incluyen cefalea, dolor en las extremidades, cansancio, debilidad

general, rinorrea y tos seca. La infección suele persistir de 3 a 5 días. Los niños pequeños pueden excretar los virus antes y durante un período más prolongado que los adultos. Las consecuencias más graves son la muerte en pocas horas y la neumonía primaria, en algunos casos puede producirse encefalitis o miocarditis (2,3).

1.1.1 Virus influenza A

De manera más específica los virus de la influenza A son virus de ARN de polaridad negativa, que como se mencionó anteriormente pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Su genoma consta de ocho fragmentos de ARN monocatenario de polaridad negativa que codifican diez proteínas esenciales (4). La partícula viral de la influenza A contiene una envoltura lipídica, derivada de la membrana celular del hospedero durante el proceso de gemación viral. Tres proteínas virales, hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y proteína M2, están incrustadas en la envoltura lipídica. La HA y la NA son glicoproteínas ancladas en la bicapa lipídica mediante secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos. Las micrografías electrónicas del virus de la influenza muestran que la HA y la NA tienen forma de bastón y de hongo, respectivamente. La HA es un homotrímero responsable de la unión al receptor y la fusión de la membrana. La NA es un homotetrámero cuya función es destruir los receptores de la célula diana hidrolizando los grupos de ácido siálico de las glicoproteínas liberando a la progenie viral. La proteína M2 es un homotetrámero integral de la membrana, que funciona como canal iónico para la acidificación del interior de la partícula

viral durante la infección. Mientras debajo la envoltura lipídica viral se encuentra la capa de proteína M1 (5–7). Dentro del virión, los ocho segmentos de ARN viral (ARNv) se unen a la nucleoproteína (NP) y a las ARN polimerasas del virus de la influenza para formar complejos de ribonucleoproteínas (RNP) (8). Además de M1, la NP es la proteína más abundante en el virión y se asocia con la columna vertebral de fosfato-azúcar del ARNv de una manera independiente de la secuencia (9). Cada monómero de NP interactúa con aproximadamente 20 nucleótidos del ARNv. El complejo ARN polimerasa está compuesto por tres subunidades de polimerasa (PB2, PB1 y PA). Las micrografías electrónicas de RNPs aisladas indicaron que ambos extremos del ARNv interactúan entre sí para formar una estructura circular o superbobinada (10,11), la ARN polimerasa interactúa con un extremo de la RNP (12), sugiriendo que la ARN polimerasa interactúa con ambos extremos del ARNv dentro de la partícula viral (13). La proteína NS1 es un actor clave en la inhibición de la respuesta antiviral en las células hospederas, facilitando así su replicación (14) . Por último, la proteína NS2 también está presente en los viriones en bajas cantidades (15,16) y que parece funcionar como una proteína de exportación nuclear para el ARNv en las células infectadas, figura 1 (17).

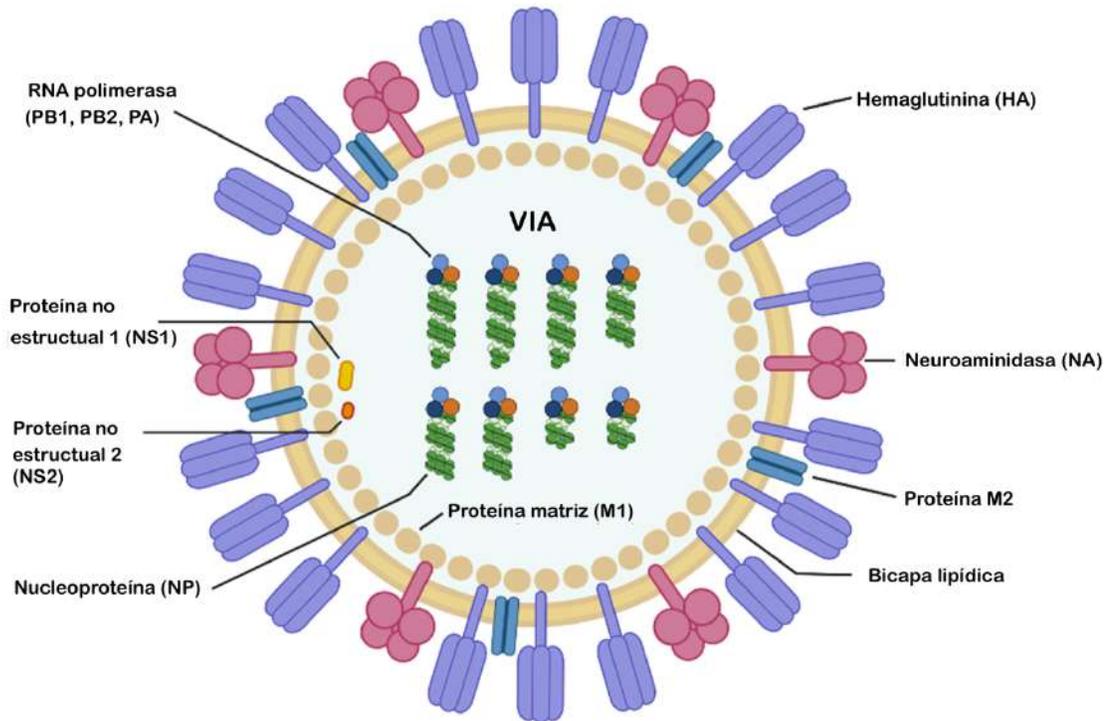


Figura 1. Estructura del VIA. Conformación de la partícula del VIA y ubicación de las proteínas de dicho virion. Nota: imagen adaptada de Jung H. *et al.* Host Protective Immune Responses against Influenza A Virus Infection, *Viruses* publicado online en 2020 (18).

1.1.2 Nucleoproteína

La NP una proteína interna muy abundante en el virus de influenza A, esta proteína está involucrada en la transcripción y replicación del genoma viral, que influye en la especificidad del hospedero y la virulencia del virus (19,20). Estructuralmente el protómero de NP incluye dos dominios plegados: un dominio N-terminal (NTD) y un dominio central C-terminal (CTD). El sitio de unión del

ácido nucleico viral generalmente se encuentra entre NTD y CTD, formando una pinza para el genoma viral (21). La molécula de NP del virus de la influenza se une a 24 nucleótidos, y este número es fijo (22,23). Debido a que la NP tiende a unirse al ARN de la célula hospedera en ausencia de ARNv, sus protómeros son acompañados por fosfoproteínas para mantener el estado monomérico y evitar la formación de viriones vacíos o defectuosos (24).

La NP tiene múltiples funciones en el ciclo de vida viral, incluyen:

- a) Protección del ARNv de la degradación por efecto de enzimas celulares, esto lo logra separando de forma física en ARN y enmascarandolo para evitar reconocimiento inmune.
- b) Ajustando la estructura helicoidal del complejo ribonucleoprotéico.
- c) Modulando la transcripción y la replicación del molde de ARNv en una forma de tipo histona.
- d) Inducen inmunosupresión (como la inhibición de síntesis de citocinas efectoras y las señales mediada por FcR) en el momento de la infección (25).

La NP como antígeno en general induce principalmente respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, ya que los péptidos derivados de NP pueden ser sintetizados por la célula infectada o producidos como resultado de la fagocitosis exógena de RNP, que pueden presentarse después en complejo con el MHC de clase I o II (26). La NP es capaz de activar a las células NK e inducir la respuesta típica anteriormente descrita de dichas células (27).

1.2 Células NK

Las células NK son linfocitos innatos que pertenecen a la familia de las células linfoides innatas de tipo 1 las cuáles responden rápidamente a las células infectadas por virus y a células tumorales. Comprenden entre el 5-20% de los linfocitos de sangre periférica en individuos normales. Morfológicamente, las células NK humanas en reposo se han identificado como linfocitos granulares grandes. A diferencia de los linfocitos T y B, las células NK carecen de receptores específicos de antígeno distribuidos clonalmente, por lo tanto, el reconocimiento de células diana y las actividades funcionales de las células NK dependen de los receptores activadores y receptores inhibidores codificados por línea germinal (28,29). Dichos receptores tipo NKp, tipo NKG2, tipo KIR, de interleucinas o CD16 por mencionar algunos, figura 2. El equilibrio entre las señales activadoras e inhibitoras transmitidas por estos receptores regulan finamente la función de las células NK (30). Cuando son activadas por el balance de señales de los receptores anteriormente mencionados, las células NK son capaces de secretar citocinas como el IFN- γ (31), exhibir actividad citotóxica de manera directa mediante perforinas y granzimas, o de manera indirecta, a través del ligando Fas (32) y del receptor de membrana Fc γ RIII (CD16) (33). Las células pueden ser identificadas principalmente de acuerdo a la expresión del marcador de superficie CD56 (34,35).

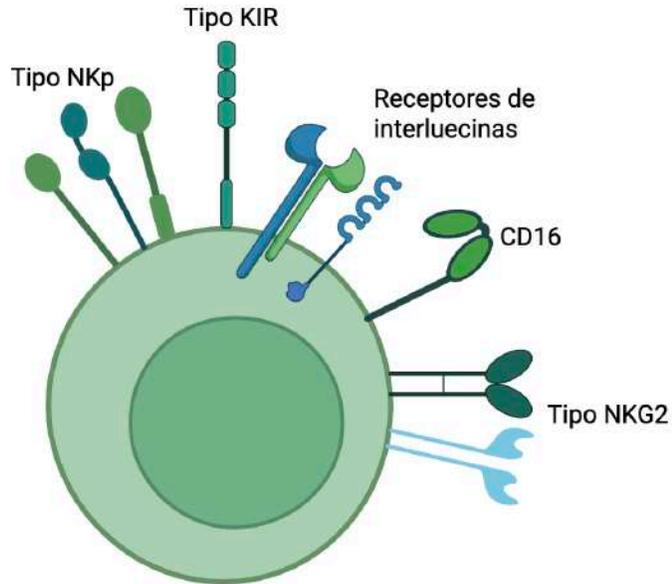


Figura 2. Tipos de receptores de células NK. (Imagen creada en BioRender.com) (30).

1.2.1 Subpoblaciones de células NK

Como otras células inmunes, las células NK se pueden clasificar en una gran variedad de subpoblaciones de acuerdo a los marcadores de superficie que presentan, dichas subpoblaciones se asocian a diversos fenotipos y funciones, probablemente representando diferentes etapas de maduración o activación de las células NK (36). La clasificación más ampliamente conocida de células NK humanas es la basada en la densidad de expresión del marcador de superficie CD56 (37). Según la expresión de CD56, las células NK humanas se dividen en subpoblaciones CD56^{BRIGHT} y CD56^{DIM} (38). Las células NK CD56^{BRIGHT} son los precursores inmaduros de la subpoblación CD56^{DIM}. El desarrollo de dichas células CD56^{BRIGHT} en células CD56^{DIM} está mediado por señales

inmunoestimuladoras, que también regulan la actividad de las células NK y la citotoxicidad (39). Las células NK CD56^{BRIGHT} representan aproximadamente el 10% de las células NK de sangre venosa periférica en el ser humano cuyas funciones principales son la producción de diversas citocinas y quimiocinas. Por otro lado, las células NK CD56^{DIM} representan aproximadamente el 90% de las células NK de sangre venosa periférica con funciones enfocadas mayormente a la citotoxicidad, figura 3 (39–41).

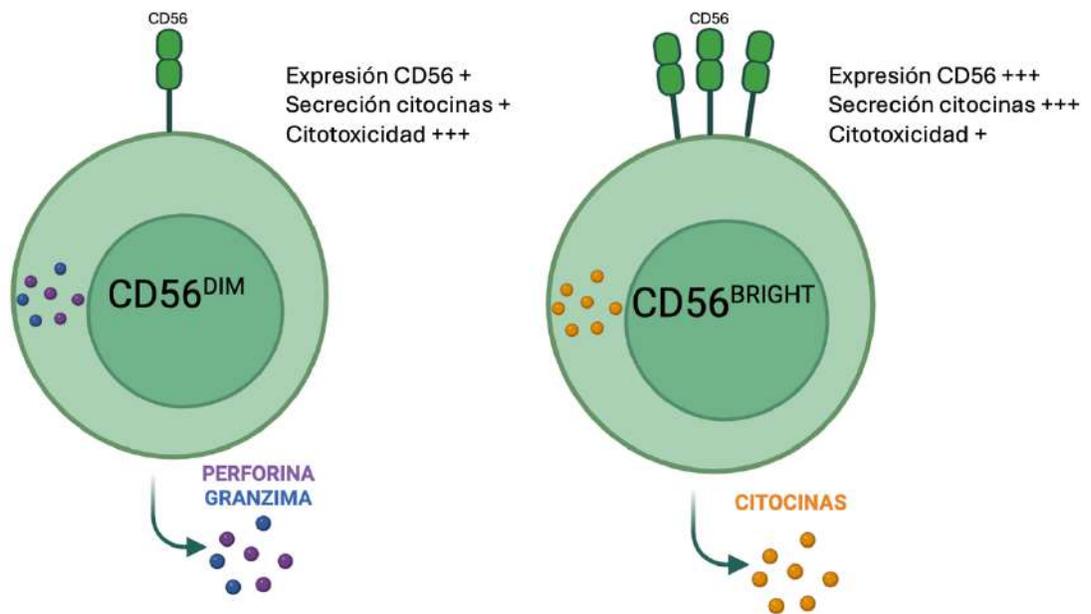


Figura 3. Subpoblaciones de células NK. Clasificación de acuerdo a la expresión del marcador de superficie CD56 y sus principales funciones (Imagen creada en BioRender.com) (39–41).

1.2.2 Células NK y citocinas

La interleucina 2 (IL-2) y la interleucina 15 (IL-15) son citocinas estructuralmente relacionadas que presentan actividad de factor de crecimiento para diversos tipos celulares tales como las células T, las células B, las células NK y las células NKT, figura 4. Estas citocinas pertenecen a la familia de proteínas de haz de cuatro hélices y se unen a receptores con componentes de señalización compartidos. Sin embargo difieren en sus sitios celulares de síntesis y en su regulación de la expresión (42–44).

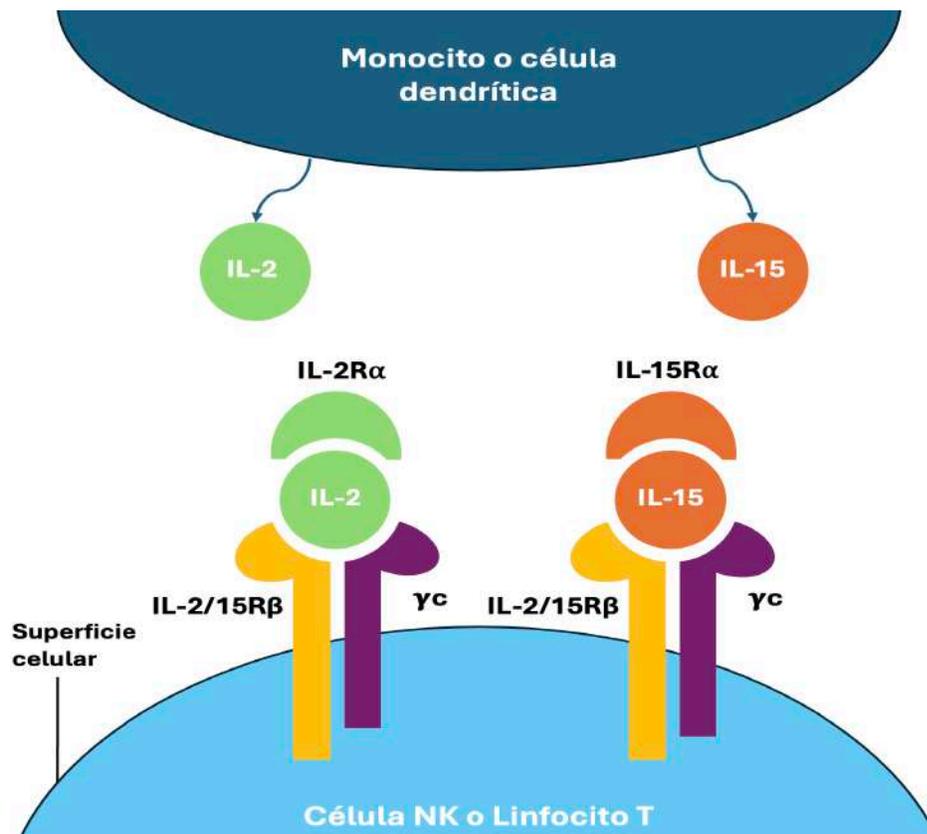


Figura 4. Receptores de citocinas IL-2 e IL-15. Receptores compartidos en gran parte por la célula NK y linfocitos T. Nota: imagen adaptada de Lee S. *et al* Cytokines in Cancer Immunotherapy, *Cancers* publicado online en 2011 (45).

La IL-2 es producida principalmente por las células T activadas y se une a un receptor heterotrimérico (IL-2R) que consta de las cadenas α , β y γ . Por el contrario, la IL-15 es producida por diversos tipos de células en la mayoría de los tejidos y se une a dos complejos de receptores diferentes: en los linfocitos, un receptor trimérico (IL-15R) que consiste en la cadena α de IL-15R y las cadenas β y γ compartidas por IL-2R (42,44,46), y en los mastocitos un receptor distinto, el IL-15RX (47).

La IL-2 tiene la capacidad de influenciar la diferenciación y función de dichas células NK (48). Esta citocina puede unirse a un receptor dimérico compuesto por IL-2R β (CD122) y el receptor de citocinas de cadena gamma común (γ c; CD132), expresado en células NK, con afinidad intermedia o, unirse a un receptor trimérico que incluye IL-2R α (CD25) con alta afinidad (49). El receptor dimérico CD122-CD132 se encuentra principalmente en las células T CD8⁺ de memoria y las células NK, mientras que el receptor trimérico CD122-CD132-CD25 se encuentra predominantemente en las Tregs en estado de reposo y se regula transitoriamente al alza en las células T y NK que han sido activadas recientemente. La IL-2 desencadena la vía de señalización JAK/STAT e induce la activación y proliferación de las células NK (50,51).

La IL-15 actúa a través del receptor heterotrimérico IL-15R, compuesto por: CD122 (IL-2/IL-15R β) y CD132 (γ c, cadena común) que son esenciales para la señalización intracelular. Además el receptor IL-15R α permite la presentación de

la IL-15 a células NK a través de células dendríticas u otras células hematopoyéticas (52). La participación de IL-15R en las células NK provoca la autofosforilación y la activación de las quinasas JAK1 y JAK3, induciendo al menos tres cascadas de señalización paralelas Ras-Raf-MEK, PI3K-Akt-mTOR, y las vías de transducción de señales y activación de la transcripción STAT-5 (53–55). La primera involucrada en varios procesos celulares cruciales como el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la muerte (56). La segunda asociada a supervivencia celular, crecimiento celular y progresión del ciclo celular (57). Finalmente, la tercera se encuentra asociada a desarrollo, proliferación, función y supervivencia de las células NK (58).

Por lo anteriormente mencionado, estudios recientes han desarrollado estrategias para la expansión células NK utilizando citocinas como IL-2, IL-12 e IL-18, principalmente con fines de uso en inmunoterapia anti-tumoral. El descubrimiento de nuevos factores estimuladores y tecnologías de expansión celular como la suplementación con IL-15, además de las citocinas anteriormente mencionadas están facilitando el diseño de nuevos estudios clínicos con células NK para una gran variedad de aplicaciones (59).

1.2.3 Células NK de tipo memoria

En un principio las células NK fueron clasificadas como células de vida corta, inespecíficas e incapaces de presentar memoria al ser expuestas a un antígeno o citocina (60). Esta clasificación ha ido cambiando en los últimos años y se ha

dejado de percibir a las células NK desde su funcionalidad inmunitaria innata clásica de célula citotóxica.

El primer hallazgo de una célula NK tipo memoria fue descrito en una subpoblación longeva de células NK capaz de mediar respuestas específicas de haptenos posterior a una reexposición a dicho hapteno (61). Todo esto ha marcado un cambio en el paradigma de la memoria inmunológica.

A pesar de la designación tradicional de las células NK como células inmunitarias innatas, los estudios de la última década proporcionan evidencias convincentes de respuestas que las células NK exhiben con características atribuidas a la inmunidad adaptativa, incluida la expansión clonal de las células efectoras específicas de ciertos antígenos y la generación de poblaciones de memoria de larga vida capaces de mejorar las respuestas en una segunda exposición (62).

La memoria inmunológica en las células NK puede conferir la capacidad de reconocer y reaccionar más rápidamente contra el estímulo en el encuentro secundario. La aparición de la memoria de células NK puede tener lugar en dos escenarios: dependiente del antígeno (exposición al hapteno e infección por virus) o independiente del antígeno (inducción de citocinas). A fin de diferenciar el concepto de memoria clásica, el fenómeno que engloba la respuesta mejorada ante una reexposición a un antígeno en las células NK se conoce con el término de “tipo memoria” (62–64).

De acuerdo a diversos investigadores existen tres categorías de células NK de tipo memoria: 1) Células NK tipo memoria antígeno-específicas, fueron descritas inicialmente en modelos murinos carentes de linocitos T y B las cuáles respondían de manera específica a haptenos o partículas virales tras una re-exposición a estos antígenos, estas células podrían localizarse de manera preferencial en el hígado(61,65–67). Estas células también se han encontrado en primates no humanos y humanos en respuesta a infecciones virales como virus de inmunodeficiencia simica (VIS), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de hepatitis B (VHB); mostrando una actividad citotóxica prolongada dependiente de receptores como el NKG2C⁺ (68–73). 2) Células NK tipo memoria adaptativas, asociadas principalmente a infecciones por CMV, observándose poblaciones de células NK NKG2C⁺ o Ly46H⁺ en humanos y ratones respectivamente. Cabe destacar que estas células expanden clonalmente cuando reconocen péptidos del virus y persisten con un fenotipo maduro caracterizado por la expresión de CD57 y regulación epigenética de IFNG (74–85). 3) Células NK de tipo memoria inducida por citocinas, generadas tras estimulación con citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18, que presentan una respuesta aumentada en producción de IFN- γ ante ciertos estímulos inespecíficos, detonando cambios epigenéticos, aumento de CD25 y reprogramación metabólica (86–95).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

Como se mencionó previamente, en un principio las células NK fueron consideradas como células innatas citotóxicas con vida corta e incapaces de presentar una respuesta mejorada ante una re-exposición (60), esto cambio desde la década pasada donde nuevos hallazgos han cambiado la idea de cómo se concebía a las células NK. Este trabajo estuvo enfocado al análisis de células NK tipo memoria en respuesta a antígenos virales, por lo que se describen los antecedentes reportados a la fecha.

2.1 Primeras evidencias de células NK de tipo memoria frente a virus

Uno de los primeros reportes de células NK de tipo memoria se reportó en un modelo murino de infección frente a CMV, demostrando que las células NK portadoras del receptor Ly49H específico del virus proliferaban 100 veces en el bazo y 1000 veces en el hígado después de la infección. Después de una fase de reposo las células NK positivas para Ly49H se encontraron residiendo en órganos linfoides y no linfoides durante varios meses. Estas células NK de "memoria" que se renuevan a sí mismas se desgranulan rápidamente y producen citocinas al reactivarse. La transferencia adoptiva de estas células NK a ratones no sensibilizados seguida de un desafío viral daba como resultado una expansión de dichas células e inmunidad protectora. Estos hallazgos revelaron propiedades

de las células NK que anteriormente se atribuían solo a las células del sistema inmune adaptativo (74).

Esta investigación en modelos murinos continuó presentando hallazgos donde células NK hepáticas mediaban la respuesta específica del antígeno en ratones deficientes en células T y células B. Dichas células NK hepáticas, pero no las células NK esplénicas, también desarrollaban memoria específica en vacunas, por ejemplo, vacunas contra el virus de la estomatitis vesicular (VSV) o el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). La transferencia adoptiva de células NK sensibilizadas por ambos virus a ratones receptores no sensibilizados mejoró la supervivencia de los ratones después del desafío con estos virus sensibilizantes, pero no después del desafío con un virus diferente (96). La memoria de las células NK para haptenos y virus depende del receptor CXCR6, un receptor de quimiocinas en las células NK hepáticas, necesario para la persistencia de las células NK de memoria, pero no para el reconocimiento de antígenos. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que las células NK hepáticas desarrollan inmunidad de tipo adaptativa a antígenos estructuralmente diversos, una actividad dependiente de CXCR6 expresada por células NK (96).

Este tipo de estudios comenzaron a detonar nuevas investigaciones sobre dicho fenómeno que acuñó el término de “tipo memoria” a fin de diferenciarlo de la memoria que presentaban las células T y B. Por lo que, el siguiente paso se enfocó en analizar dicho fenómeno en células NK humanas y bajo el contexto de infección viral.

2.2 Células NK de tipo memoria frente a virus en humanos

Uno de los primeros estudios de células NK tipo memoria frente a virus realizados en seres humanos, encontró que las células NK NKG2C⁺ estaban asociadas con memoria inmunológica inducida por citomegalovirus (CMV), cuando dichas células fueron transferidas mediante trasplante hematopoyético, estas se expandieron funcionalmente en dicho receptor tras la reactivación clínica de CMV. Además, se reportó también su expansión en ausencia de viremia detectable, siempre y cuando el donador como el receptor hubieran sido seropositivos para el CMV. Las células NK NKG2C⁺ transferidas de donadores seropositivos exhibieron una funcionalidad aumentada ante una re-exposición al CMV, en comparación con aquellas derivadas de donadores seronegativos. Estos hallazgos demostraron que las células NK con características de memoria pueden ser trasplantadas y requieren de la presencia activa o latente del antígeno viral en el receptor para promover su expansión clonal (97).

Las células NK NKG2C⁺ pueden reconocer diferencialmente diversas cepas de CMV que codifican péptidos variables de la proteína UL40, estos péptidos, en conjunto con señales proinflamatorias, regularon la expansión poblacional y la diferenciación de las células NK NKG2C⁺ de tipo memoria. Por tanto, la variabilidad en los péptidos UL40 del CMV contribuye a la heterogeneidad observada en las poblaciones de células NK NKG2C⁺ de tipo memoria entre individuos seropositivos para CMV (98). Además, la respuesta de las células

NKG2C⁺ NK en individuos infectados por CMV es específica del patógeno ya que no se expanden durante otras infecciones por virus del herpes, por ejemplo, virus de Epstein Barr (VEB) ni por el virus del herpes simple (VHS)-2 (99,100), resaltando la especificidad de esta subpoblación frente a CMV.

En el caso del VEB se ha demostrado la presencia de células NK en amígdalas con un fenotipo NKG2A⁺CD94⁺CD56^{BRIGHT} con la capacidad de restringir la transformación de las células B autólogas expuestas al VEB *in vitro*, una actividad dependiente tanto del IFN- γ como del receptor activador de la familia NCR, NKp44 (101–103). El virus de la varicela zóster (VVZ) promueve respuestas NK similares a la memoria, donde personas con antecedentes de varicela durante la infancia presentaban reacciones sólidas de hipersensibilidad de tipo tardío a los antígenos del VVZ administrados por vía intradérmica. Dicha respuesta implicó el reclutamiento selectivo de células NK activas en el sitio de administración del antígeno, pero no en los sitios de control donde solo se administró solución salina, aunque el diseño del estudio no pudo excluir la contribución de las células T y B a estas respuestas. La mayoría de las células NK reclutadas por el VVZ eran CD56^{BRIGHT} y expresaron con mayor frecuencia marcadores asociados con la residencia tisular y activación, incluidos CXCR6, NKG2D, CD69 y CD62L (104). Por último, en el contexto de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), péptidos de este virus son reconocidos por KIR2DL1 de las células NK de una manera dependiente del HLA (105). Además, células NK KIR3DS1⁺ y KIR3DL1⁺ se expanden selectivamente durante la infección aguda por VIH en individuos que expresan HLA-B Bw4801 (106).

En el caso de infecciones virales agudas, la investigación se ha centrado en el contexto de infección por VIA, los primeros reportes en este contexto se basan en las vacunas contra influenza. Individuos vacunados mostraron un incremento de células NK de tipo memoria NKp46⁺ CD56^{DIM} con un aumento en la producción de IFN- γ durante los primeros 6 meses. El aumento dinámico de células NK NKp46⁺ CD56^{DIM} se correlacionó positivamente con una mayor producción de IFN- γ específica a la re-estimulación *in vitro* con el virus de la influenza después de la vacunación. Además, cuando se utilizaron anticuerpos anti-NKp46 resultó en el bloqueo de la respuesta al IFN- γ resaltando la relación de la expresión de dicho marcador con la producción del IFN- γ (107). En otro estudio realizado con 52 individuos no vacunados, se observó que la vacunación estacional con virus de influenza A/California/7/2009 (H1N1) induce una respuesta funcional potenciada en células NK con un aumento en la producción de IFN- γ dependiente de IL-2 hasta cuatro semanas post-vacunación. Además, se observó que anticuerpos preexistentes promueven la desgranulación de las células NK e incrementan la respuesta frente a citocinas inflamatorias. Estos efectos también pudieron replicarse *in vitro* mediante la exposición directa de células NK al virus A/California/7/2009, demostrando que la exposición a cepas virales específicas de influenza induce un fenotipo funcional de tipo memoria en las células NK caracterizado por la expresión de CD57⁺NKG2C⁺ (108). En otro estudio se evaluó el papel de las células NK en la respuesta a una vacuna VIA pandémico, identificando que las personas con mejor respuesta inmunológica frente a la vacuna presentaron una mayor proporción de células NK con expresión de

NKG2C. Estas células mostraron mayor capacidad citotóxica, sin embargo, la expresión de CD57 no mostró relación con la respuesta a dicha vacuna, resaltando la importancia de NKG2C como posible marcador predictivo de una respuesta eficaz a la vacunación contra influenza, así como también de su capacidad para ser un marcador de células NK de tipo memoria frente al VIA (109). Por último, células NK humanas pueden adquirir especificidad antigénica duradera tras la exposición a VIA, la cual es mediada por la interacción del receptor activador CD94/NKG2C con el ligando HLA-E. Este eje permite el reconocimiento de péptidos virales presentados por HLA-E, entre ellos fragmentos derivados de proteínas internas altamente conservadas como la NP del VIA (110). Por lo anterior, la NP podría constituir una fuente importante de epítomos capaces de inducir células NK de tipo memoria, posicionándola como un blanco potencial en el diseño de nuevas vacunas o inmunoterapias.

Es por todo lo anterior que este estudio se centró en desarrollar células NK tipo memoria específicas para la NP del VIA y evaluar su fenotipo y funcionalidad citotóxica.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Las células NK son importantes mediadores de la respuesta inmune innata contra infecciones virales como la influenza. A la fecha no se ha explorado el fenotipo de células NK de tipo memoria contra la nucleoproteína del virus de influenza A. Por lo tanto, en este trabajo se plantea desarrollar células NK de tipo memoria específicas para la nucleoproteína del virus de la influenza y determinar su papel en la eliminación de células infectadas.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

Las células NK de tipo memoria específicas de la nucleoproteína del virus de influenza A H1N1 incrementan la eliminación de células infectadas con virus de influenza AH1N1pdm09.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar células NK de tipo memoria específicas de la nucleoproteína del virus de influenza A H1N1pdm09 para la eliminación de células infectadas.

5.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar células NK de tipo memoria para la nucleoproteína de influenza A H1N1pdm09.
2. Evaluar el fenotipo de células NK de tipo memoria para la nucleoproteína de influenza A H1N1pdm09.
3. Determinar la función citotóxica de células NK de tipo memoria para la nucleoproteína en co-cultivo con células A549 infectadas con influenza A H1N1pdm09.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Población de estudio

Se incluyeron 10 donantes aparentemente sanos, una vez cumplidos los criterios de inclusión y exclusión, se obtuvo su consentimiento informado por escrito figura 5. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con número de registro IN24-00001.

Criterios de inclusión

- Voluntarios de 18-35 años de edad sin importar sexo.
- Sin ninguna enfermedad aparente.
- Biometría hemática normal

Criterios de exclusión

- Presencia de cualquier padecimiento crónico (DM, Hipertensión, VIH, Enf autoinmunes, etc)
- Síntomas gripales en las últimas 4 semanas
- Internamiento tres meses previos por más de 48 h.
- Estar recibiendo quimioterapias
- Mujeres embarazadas
- Valores anormales de leucocitos

Criterios de eliminación

- Baja cantidad de células NK.
- Mala calidad de células NK.

Figura 5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para el reclutamiento de sujetos aparentemente sanos.

6.2 Aislamiento de células NK

Se recolectó sangre total en 6 tubos con EDTA por punción venosa y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante gradiente de centrifugación trabajando en campana de flujo laminar. El aislamiento se realizó colocando sangre venosa periférica con PBS estéril relación 1:1. Posteriormente, la sangre diluída en PBS se colocó en tubos cónicos de 50mL que contenía Ficoll-Paque PLUS (cytiva) en relación 2:1 teniendo cuidado de no mezclar ambas soluciones. Se centrifugó a 1800 rpm por 30 minutos a 4°C. Se obtuvo la fase de mononucleares colocándose en tubos cónicos de 15mL y se realizaron lavados de las células con 10mL de PBS estéril tres veces siendo centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos decantando el sobrenadante en cada lavado, se resuspendió el botón celular en 1mL de PBS estéril. Se lisaron las células agregando 3mL de agua estéril a 4°C incubando por 30 segundos para inmediatamente después agregar 3mL de PBS 2X a 4°C y llevando a centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos obteniendo el botón celular, dicho proceso se repitió tres veces para al final resuspender el botón celular en 1mL de medio RPMI incompleto y realizar la cuenta celular con azul de tripano dilución 1:10 en cámara de Neubauer. Posteriormente las células NK fueron aisladas de las células mononucleares mediante selección negativa utilizando el kit de aislamiento de células NK humanas (Milteny Biotec). Se adicionaron 1×10^6 células en 40ul de buffer NK y se adicionó tanto los anticuerpos así como las perlas magnéticas de aislamiento para aforar a un volumen de total 500ul con tampón de aislamiento de NK y pasar las células por la columna a fin de obtener a las células NK purificadas. Una vez

purificadas el total de células fue contabilizado en cámara de Neubauer utilizando azul de tripando en una dilución de 1:10.

6.3 Prueba de viabilidad y pureza

La pureza y viabilidad de las células NK aisladas se analizaron por citometría de flujo utilizando Simultest CD3 FITC/CD16+CD56 PE (BD) y 7-AAD (BD), respectivamente. Se adquirieron al menos 10,000 eventos en un citómetro BD LSR Fortessa y fueron analizados empleando el software FACSDiva versión 9.0.1.

6.4 Expansión de células NK y estimulación con NP de VIA

Las células NK se contaron con una cámara de Neubauer y cultivadas a una densidad de 1.25×10^5 células/ml en medio CTS NK Xpander (gibco), suplementado con 5% de suero humano autólogo e IL-2 a una concentración de 500UI/ml (gibco), o con IL-2 a una concentración de 500UI/ml en combinación con IL-15 40ng/ml (PeproTech) en placas de 96 pozos estériles no pirogénicas (Corning incorporated) y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂. Se ajustó la densidad celular a 2.3×10^5 células por cada 200 ul y se realizaron cambios de medio cada 2-3 días hasta el día 14, donde se realizó el conteo total de células obtenidas en cada tiempo. En el día 14, se evaluó la pureza y viabilidad de las células NK como previamente se mencionó en el punto 6.3. Por otro lado, las células NK fueron cultivadas a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI completo, suplementado con 10% de FBS y 1% de solución con antibióticos-antimicótico (10,000 U Penicilina, 10 mg Estreptomicina y 25 µg/ml

Anfotericina B) (Sigma-Aldrich) en placas de 6 pozos estériles no pirogénicas (Corning incorporated) . Se realizaron dos grupos para cada condición: 1) células NK con solo medio de cultivo sin péptidos de la nucleoproteína del VIA H1N1 y 2) células NK con medio y con péptidos de nucleoproteína de VIA H1N1 (Milteny Biotec) a una concentración de 0.6 nM por cada 10^7 células. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, se lavaron y cultivaron por 6 días en RMPI completo para el desarrollo de células NK de tipo memoria.

6.5 Fenotipificación

A los 6 días post-estimulación con los péptidos de la nucleoproteína del VIA H1N1 se determinó el inmunofenotipo de las células NK. Para determinar el fenotipo de las células NK, estas fueron tratadas con brefeldina (BD GolgiPlug) una hora previo a la recolección del cultivo celular. Posteriormente, las células se lavaron y resuspendieron en una solución de tinción conteniendo: buffer de tinción con los siguientes marcadores de superficie: CD56 (AF488 BD Biosciences), NKp46 (APC BioLegend), NKG2C (PE BioLegend) y LAMP-1 (Pacific Blue BioLegend). Posteriormente, las células NK fueron tratadas de acuerdo con el protocolo del kit BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization y teñidas para los marcadores intracelulares IFN- γ (BV605 BD Horizon) y Granzima B (PE-Cy7 BioLegend). La información de las clonas y otra información de dichos anticuerpos se pueden apreciar en la tabla 1. Se adquirieron al menos 10,000 eventos en un citómetro BD LSR Fortessa y fueron analizados empleando el software FACSDiva versión 9.0.1.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Anticuerpo	Clona	Fluorocromo	Isotipo	Catálogo	Compañía
Anti-CD56 humano hecho en ratón	NCAM16.2	AF488	Ratón IgG1	567478	BD Biosciences
Anti-NKp46 humano hecho en ratón	9E2	APC	Ratón IgG1	331918	BioLegend
Anti-NKG2C humano hecho en ratón	S19005E	PE	Ratón IgG1	375004	BioLegend
Anti-LAMP-1 humano hecho en ratón	H4A3	Pacific Blue	Ratón IgG1	328624	BioLegend
Anti-Granzima B humano hecho en ratón	QA18A28	PE-Cy7	Ratón IgG1	396410	BioLegend
Anti-IFN- γ humano hecho en ratón	B27	BV605	Ratón IgG1	562974	BD horizon

6.6 Ensayos de citotoxicidad celular

Las células A549 se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 0.5×10^6 células/ml y se incubaron a 37°C y 5% CO_2 hasta alcanzar más del 90% de confluencia. Posteriormente, se infectaron con el VIA a una multiplicidad de infección (MOI) de 1, a partir de un stock VIA H1N1 pdm09 (ATCC VR-1894) obtenido mediante el ensayo TCID50 en células MDCK o se mantuvieron como

control (MOCK). Tras 2 horas de adsorción, el inóculo fue eliminado y tras un lavado, se resuspendieron en medio fresco para los ensayos de citotoxicidad. Posterior a las 24 horas, las células infectadas y el control fueron co-cultivadas durante 6 horas con 0.5×10^6 células NK. Posteriormente, las células NK fueron retiradas y se añadió medio fresco a la placa. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada individuo y cada condición, realizándose los siguientes grupos de infección: 1) células NK expandidas con IL-2 + NP vs A549 infectadas, 2) células NK expandidas con IL-2/IL-15 + NP vs A549 infectadas, 3) células NK expandidas con IL-2 sin NP vs A549 infectadas, 4) células NK expandidas con IL-2/IL-15 sin NP vs A549 infectadas, y los siguientes grupos control: 1) células NK expandidas con IL-2 + NP vs A549 sin infectar, 2) células NK expandidas con IL-2/IL-15 + NP vs A549 sin infectar, 3) células NK expandidas con IL-2 sin NP vs A549 sin infectar, 4) células NK expandidas con IL-2/IL-15 sin NP vs A549 sin infectar 5) A549 sin infectar solas. Se agregó el reactivo del Kit de Proliferación Celular I (MTT) (Sigma Aldrich) y se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂, seguido de la adición de la solución de solubilización a cada pozo y una incubación nocturna. La absorbancia se determinó a 590 nm utilizando un lector de placas GloMax® (Mod. E9032 Promega, Madison, WI). El porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con las células A549 no infectadas sin co-cultivo con células NK. La potencia se calculó en forma de potencia total y relativa. Se anexan las fórmulas a continuación:

$$\text{Citotoxicidad} = \frac{(\text{viabilidad A549 solas} - \text{Viabilidad del grupo evaluado})}{(\text{control de muerte} - \text{viabilidad del grupo evaluado})} \times 100$$

$$\text{Potencia total} = \frac{\text{Citotoxicidad control}}{\text{Citotoxicidad con estímulo}} \times 100$$

6.7 Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos mediante una prueba de Shapiro-Wilk. Según la normalidad se realizaron análisis de ANOVA con prueba post hoc de Tukey cuando los datos fueron paramétricos, o una prueba de Kurskal Wallis para los datos no paramétricos, además se hicieron análisis de correlación de Spearman, todas las pruebas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 10.3.1. para MacOS (San Diego, California, EE. UU.). Los valores de $P < 0.05$ o $r < 0.6$ fueron considerados como significativos.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Características de los sujetos de estudio

Tabla 2. Características de los sujetos de estudio.

Suj.	Edad	Sexo	Estatus vacuna	Leucocitos	Linfocitos	Monocitos
1	23	M	Sin vacuna	4.63 x10 ³ /ul	1.53 x10 ³ /ul	0.40 x10 ³ /ul
2	26	M	Con vacuna	4.58 x10 ³ /ul	1.58 x10 ³ /ul	0.53 x10 ³ /ul
3	27	F	Sin vacuna	4.71 x10 ³ /ul	2.71 x10 ³ /ul	0.72 x10 ³ /ul
4	27	M	Con vacuna	5.33 x10 ³ /ul	4.33 x10 ³ /ul	0.21 x10 ³ /ul
5	26	F	Con vacuna	6.16 x10 ³ /ul	1.76 x10 ³ /ul	0.62 x10 ³ /ul
6	34	F	Con vacuna	5.81 x10 ³ /ul	1.81 x10 ³ /ul	0.76 x10 ³ /ul
7	23	M	Sin vacuna	4.74 x10 ³ /ul	2.74 x10 ³ /ul	0.90 x10 ³ /ul
8	27	M	Con vacuna	4.96 x10 ³ /ul	2.96 x10 ³ /ul	1.24 x10 ³ /ul
9	25	F	Con vacuna	5.94 x10 ³ /ul	3.94 x10 ³ /ul	1.15 x10 ³ /ul
10	32	M	Sin vacuna	4.78 x10 ³ /ul	3.78 x10 ³ /ul	0.39 x10 ³ /ul

7.2 IL-2 en combinación con IL-15 logró una mayor expansión y pureza de las células NK

Se analizaron dos variables para la expansión de células NK y la morfología de las células se evaluó por microscopía a los días 5, 7, y 14 observando en ambas variables de expansión células refringentes que aumentaron de cantidad al paso de los días, figura 6.

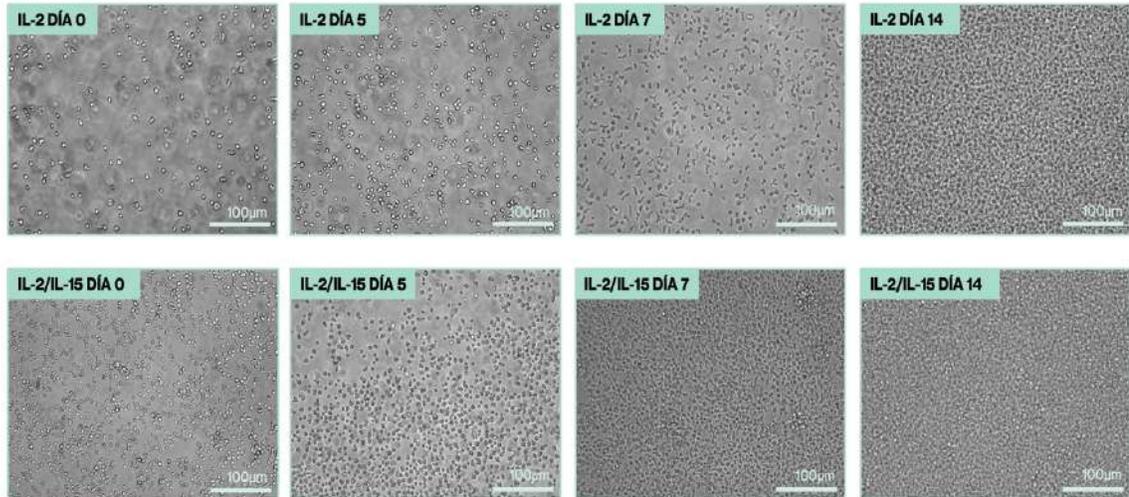


Figura 6. Imágenes representativas de las células NK en expansión en las dos condiciones empleadas y a diversos días de expansión. Tomadas con el microscopio de contraste de fases Fluid Cell Imaging Station.

Se realizó una estrategia específica para el análisis a través de citometría de flujo de la pureza así como las subpoblaciones de células NK obtenidas al día 14 de expansión, figura 7.

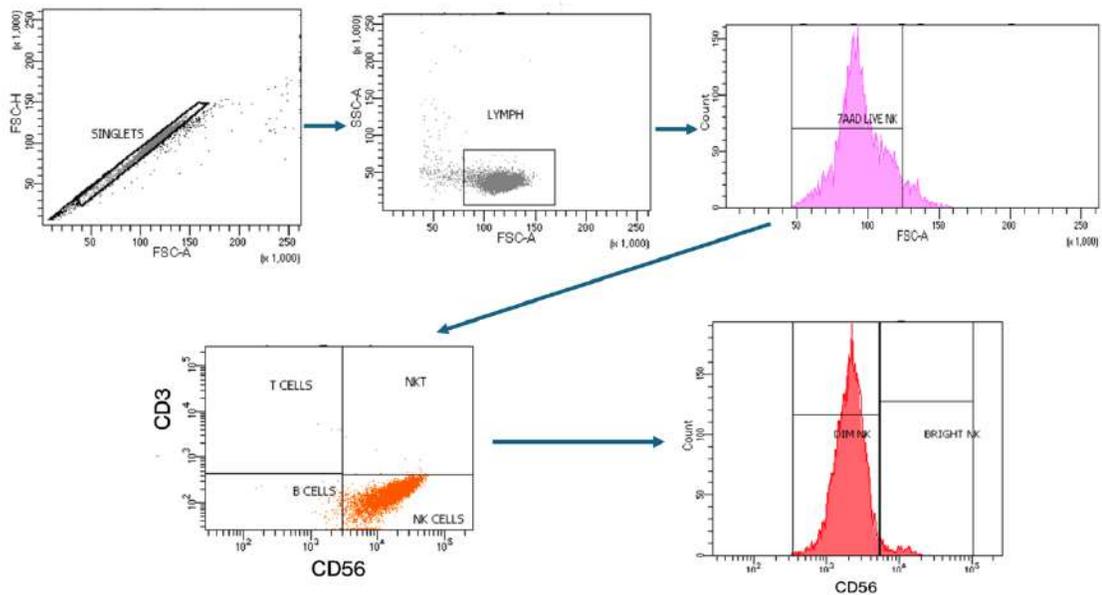


Figura 7. Estrategia de análisis empleada para determinar pureza y viabilidad de células NK previo y después de la expansión. Se utilizó el software FACSDiva versión 9.0.1.

Se obtuvo un mayor número de células NK ($P=0.0035$) así como una mayor viabilidad de dichas células ($P=0.0197$) al realizar la expansión con el medio CTS NK Xpander suplementado con IL-2 en combinación con IL-15 comparado con el uso de solamente IL-2, figura 8A-B. La pureza del aislado fue mayor cuando se utilizó el medio CTS NK Xpander suplementado con IL-2 e IL-15 ($P<0.0001$), esta combinación logró disminuir además el porcentaje de linfocitos T que proliferaron en el medio comparado con la condición donde se empleó la suplementación únicamente con IL-2 ($P<0.0001$), figura 8C. Las células NK expandidas con IL-2 e IL-15 presentaron un mayor porcentaje de células NK CD56^{BRIGHT} ($P=0.0392$), figura 8D.

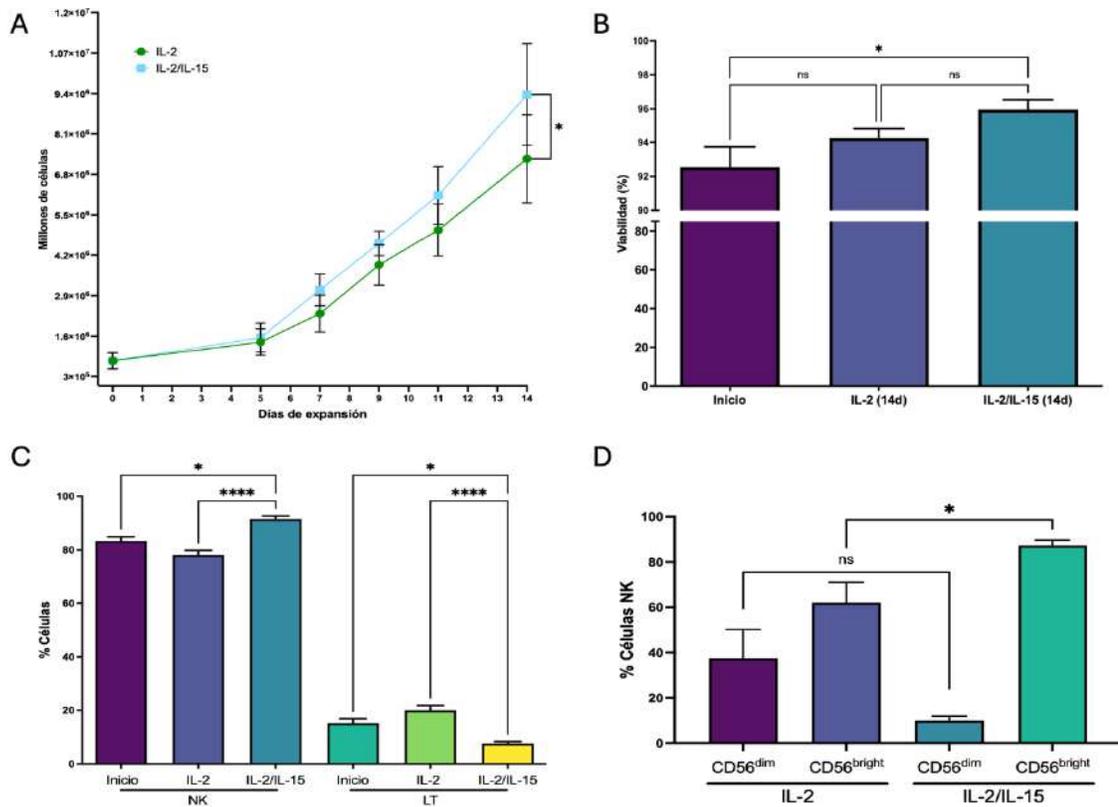


Figura 8. Análisis de la cantidad, viabilidad, pureza y subpoblaciones de NK previo y posterior a la expansión de células NK. A) Curva de crecimiento de células NK suplementadas con IL-2 o IL2/IL-15. B) Viabilidad de las células NK suplementadas con IL-2 o IL2/IL-15 previo y a los 14 días de expansión. C) Porcentaje de células NK y linfocitos T al inicio y al día 14 de la expansión en medio suplementado con IL-2 o IL2/IL-15. D) Subpoblaciones de células NK CD56^{dim} y CD56^{bright} posterior a la expansión en medios suplementados con IL-2 o IL2/IL-15. Análisis de ANOVA con comparación múltiple de Tukey (n=10), mediciones por duplicado (A,B) mediciones por triplicado (C y D) ns= no significativo, * $P < 0.05$, **** $P < 0.001$.

7.3 Las células NK estimuladas con nucleoproteína presentan un fenotipo de tipo memoria y un perfil de activación

Para el inmunofenotipo se realizó una estrategia de análisis de los marcadores de células NK a evaluar siguiendo los puntos de corte de acuerdo a las lecturas de los FMOs y las células sin tinción, figura 9.

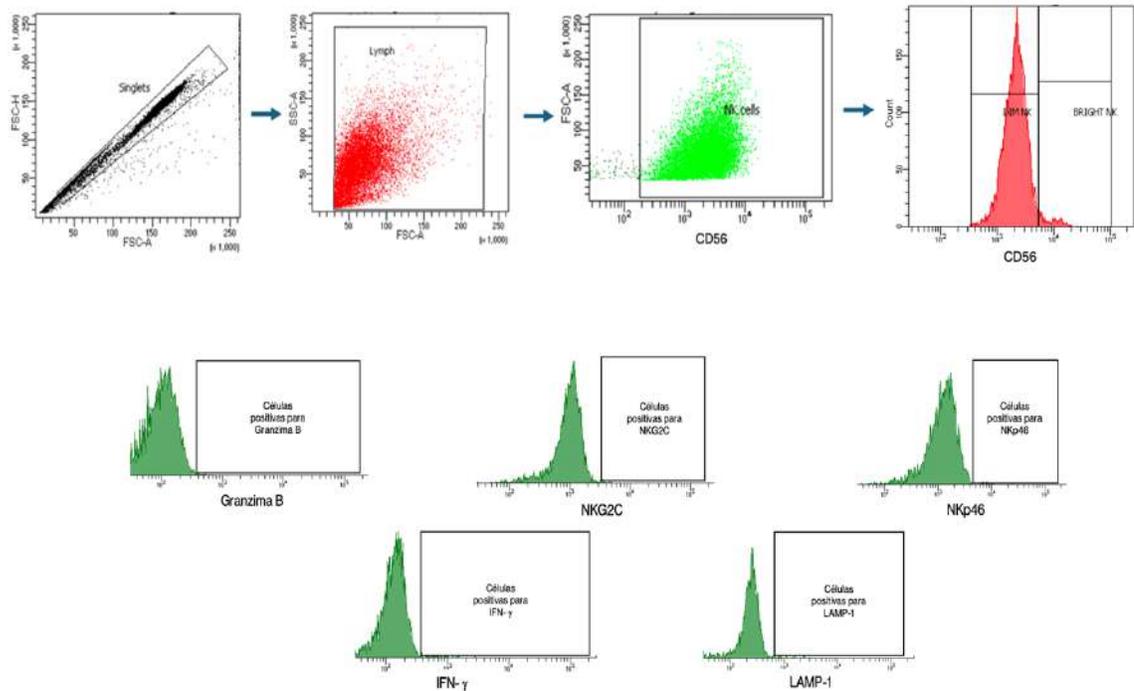


Figura 9. Estrategia de análisis de fenotipo de células NK de tipo memoria. Se utilizó el software FACSDiva versión 9.0.1.

En las células NK CD56^{DIM}, no se observaron cambios en el fenotipo tras la estimulación con nucleoproteína en ninguna de las condiciones de expansión, en comparación con los controles sin nucleoproteína, figura 10.

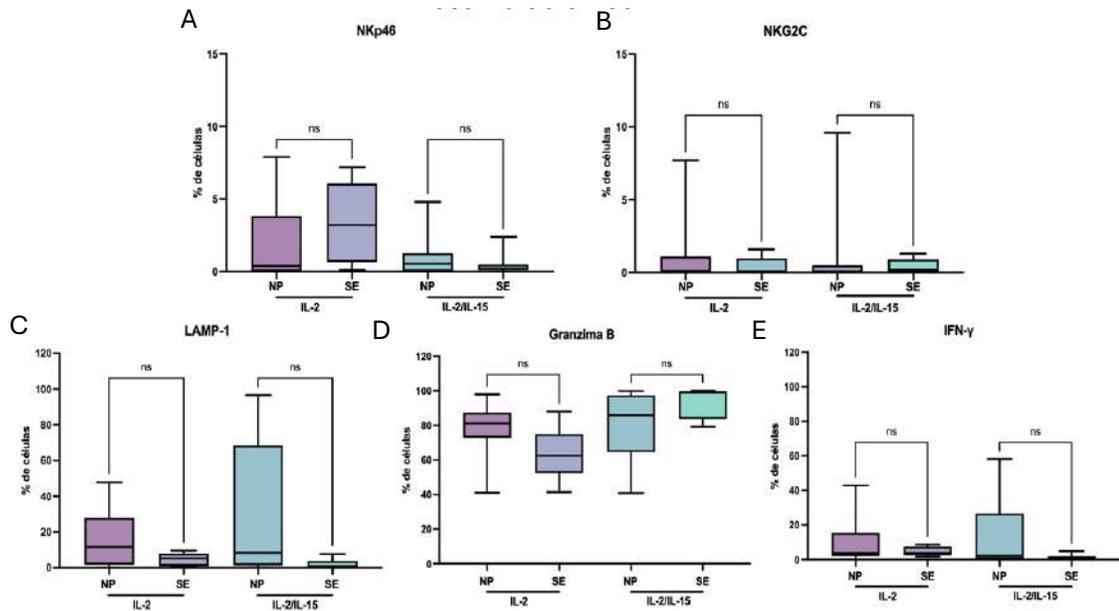


Figura 10. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56^{DIM} estimuladas con nucleoproteína (NK NP) y sin estimular (NK SE). A) Porcentaje de células positivas para NKp46 B) Porcentaje de células positivas para NKG2C C) Porcentaje de células positivas para LAMP-1 (CD107a) D) Porcentaje de células positivas para Granzima B intracelular E) Porcentaje de células positivas para IFN- γ intracelular. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn (n=10), mediciones por duplicado para NK SE y triplicado para NK NP. ns= no significativo.

En las células NK CD56^{BRIGHT}, se detectaron diferencias en la expresión de los marcadores de tipo memoria NKp46 y NKG2C cuando fueron estimuladas con la nucleoproteína del VIA H1N1, figura 11A-B. La expresión de NKp46 fue significativamente mayor en los cultivos expuestos a la nucleoproteína y expandidos con IL-2 ($P=0.0128$) o IL-2/IL-15 ($P=0.0078$). Asimismo, se observó un incremento en la expresión de NKG2C en las células estimuladas bajo

condiciones de expansión con IL-2 ($P < 0.0001$) e IL-2/IL-15 ($P = 0.0239$). El marcador de degranulación LAMP-1 (CD107a) presentó una mayor expresión en las células NK estimuladas con nucleoproteína y expandidas con IL-2/IL-15 ($P = 0.0158$), figura 11C. No se encontraron diferencias en la expresión de las moléculas intracelulares (IFN- γ y Granzima B) entre los grupos estimulados con nucleoproteína y los grupos control, $P > 0.05$, figura 11D-E).

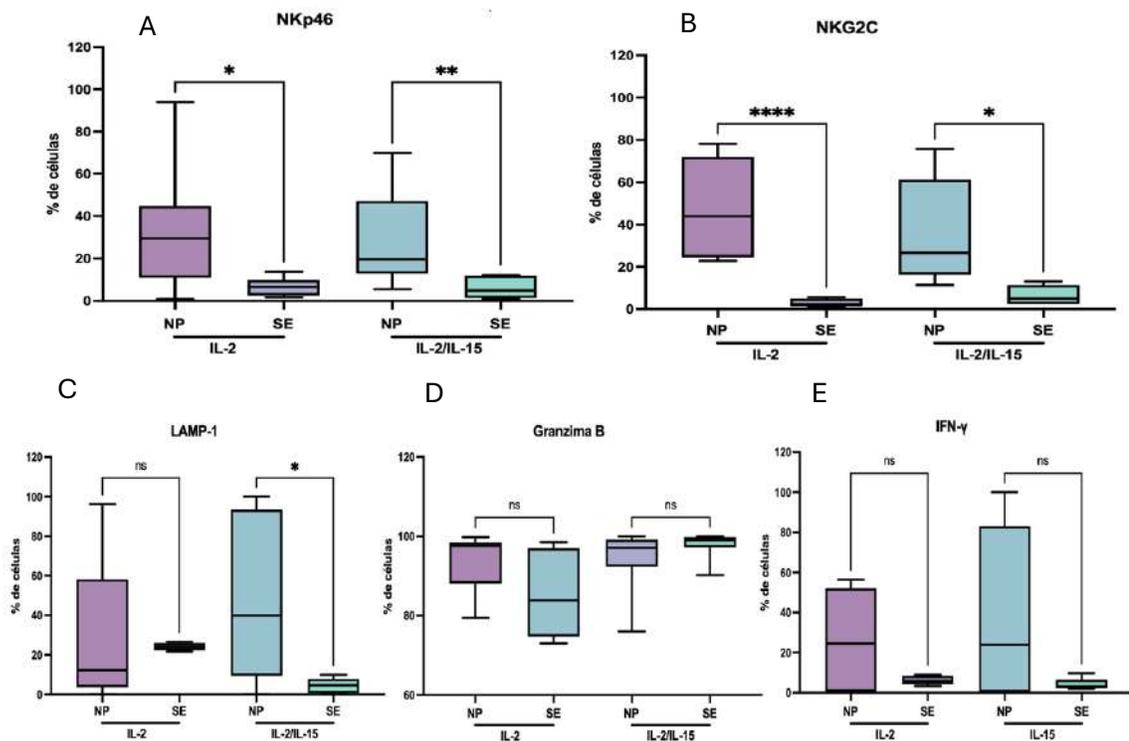


Figura 11. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56^{BRIGHT} esrimuladas con nucleoproteína (NK NP) sin estimular (NK SE). A) Porcentaje de células con expresión positiva para NKp46 B) Porcentaje de células con expresión positiva para NKG2C C) Porcentaje de células con expresión positiva para LAMP-1 (CD107a) D) Porcentaje de células con expresión positiva para Granzima B intracelular E) Porcentaje de células con

expresión positiva para IFN- γ intracelular. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn (n=10), mediciones por duplicado para NK SE y triplicado para NK NP. ns= no significativo, *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ****= $P < 0.001$.

7.4 El fenotipo de las células NK estimuladas con nucleoproteína es similar entre sujetos vacunados y no vacunados

Se realizaron comparaciones para todos los marcadores de fenotipo analizados entre los sujetos vacunados y sujetos no vacunados, sin embargo no se observaron diferencias significativas en las comparaciones realizadas en la subpoblación CD56^{DIM} figura 12A para ninguno de los marcadores analizados, tampoco se observaron diferencias significativas para ninguno de los marcadores en la subpoblación CD56^{BRIGHT} figura 12B.

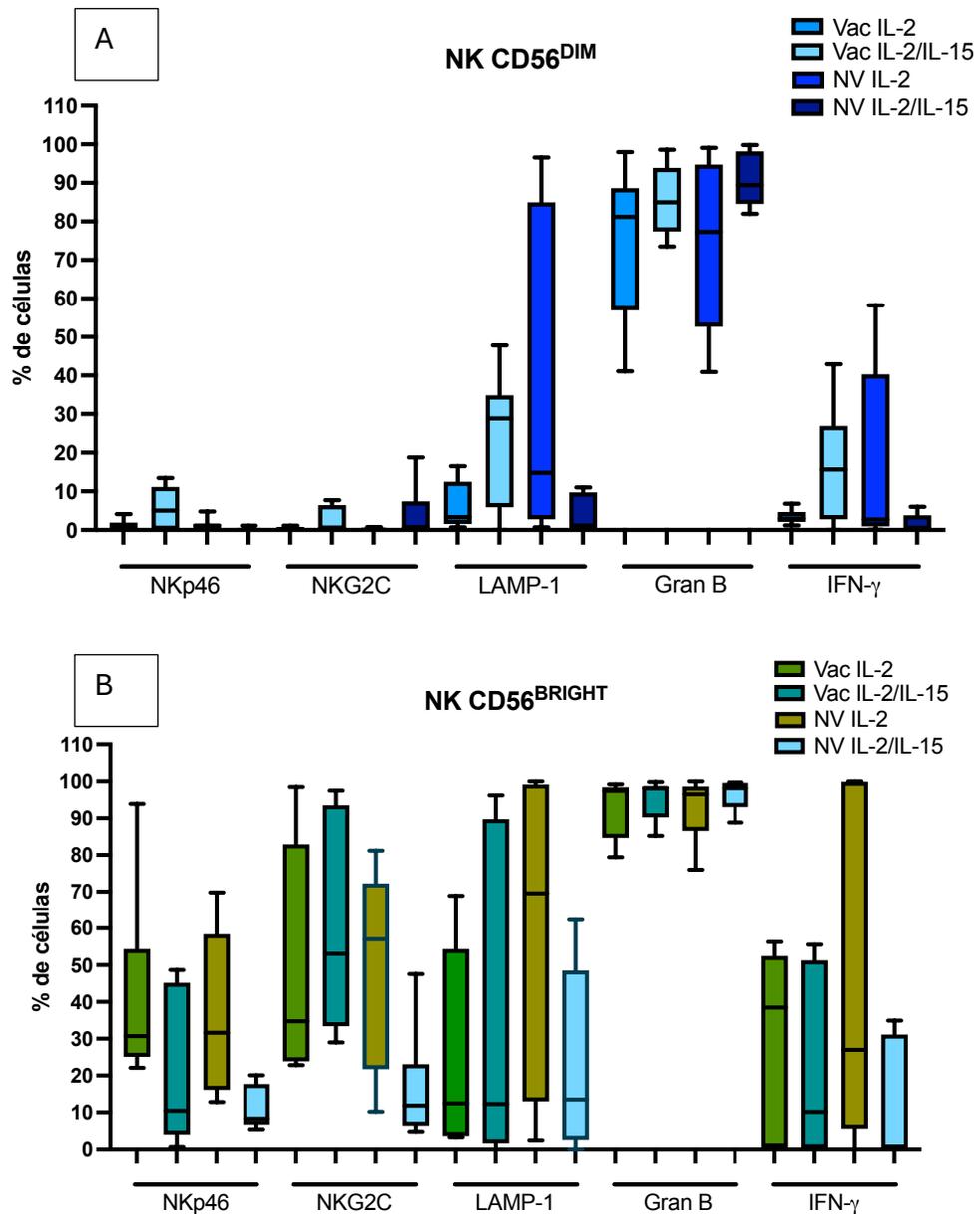


Figura 12. Expresión de marcadores de fenotipo de células NK CD56^{DIM} y NK CD56^{BRIGHT} de sujetos vacunados y no vacunados A) Porcentaje de células NK CD56^{DIM} positivas para los marcadores NKp46, NKG2C, LAMP-1, Granzima B e IFN- γ B) Porcentaje de células NK CD56^{BRIGHT} positivas para los marcadores NKp46, NKG2C, LAMP-1, Granzima B e IFN- γ . Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn (n=10), mediciones por triplicado.

7.5 La evaluación mediante t-SNE revela subpoblaciones de células NK de tipo memoria específicas de la NP de VIA

Posteriormente al análisis individual de cada marcador por citometría de flujo, se realizó una visualización integrada mediante la técnica de reducción de dimensionalidad t-SNE para poder explorar la distribución fenotípica y funcional de las células NK estimuladas con NP del VIA H1N1pdm09.

En la Figura 13 se presenta la proyección bidimensional t-SNE de las células NK, coloreada según la intensidad de fluorescencia de seis marcadores relevantes: CD56, NKG2C, NKp46, LAMP-1, Granzima B e IFN- γ . Esta representación permite identificar agrupamientos celulares según patrones de expresión comunes. En ella, se observó que la expresión de CD56 se concentró en una región amplia del mapa t-SNE, indicando una población mayoritaria de células NK CD56^{BRIGHT}. El marcador NKG2C, asociado a células NK de tipo memoria, mostró una expresión elevada en una subpoblación localizada principalmente en el cuadrante medio izquierdo, sugiriendo una expansión específica inducida por el estímulo de NP. La expresión de NKp46, se distribuyó de forma más dispersa, pero con zonas de intensidad media a alta donde se superponen parcialmente con NKG2C. Por otro lado, los marcadores de funcionalidad LAMP-1 y Granzima B, presentaron expresión elevada en regiones que coinciden con la población NKG2C⁺ y NKp46⁺, indicando un fenotipo funcionalmente activo de tipo memoria. Finalmente, se identificaron zonas con expresión elevada de IFN- γ , las cuáles corresponden a células NK de tipo memoria tras la estimulación con NP.

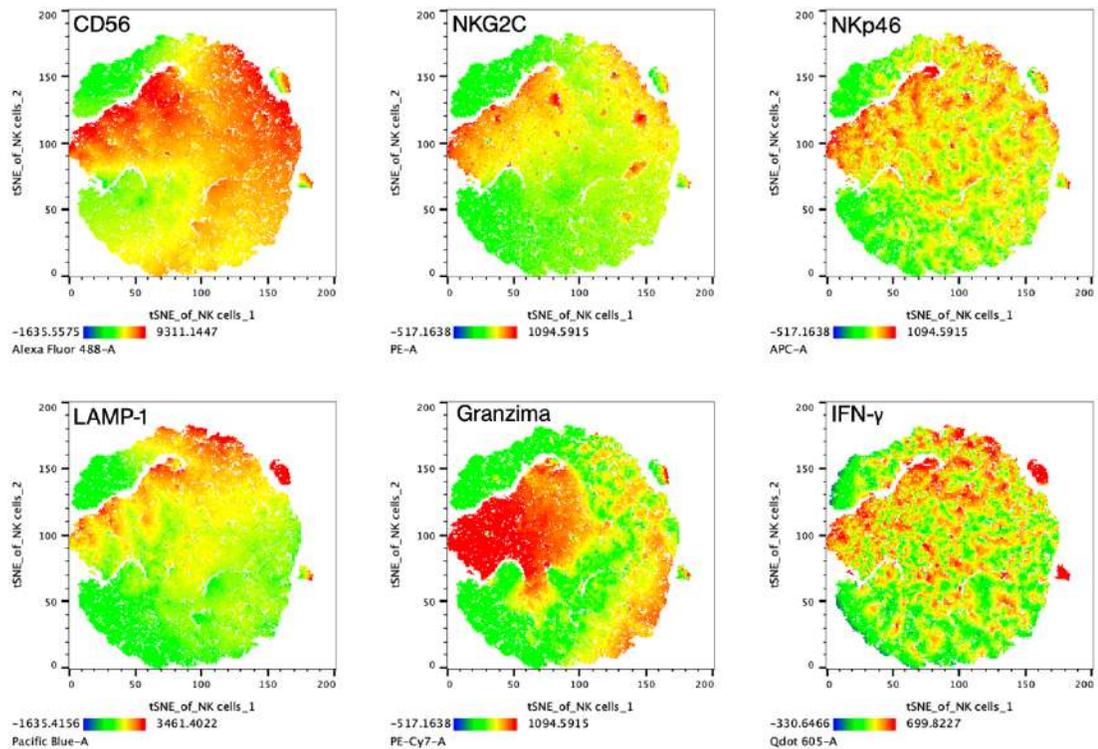


Figura 13. Proyección bidimensional de tSNE de células NK. Células estimuladas con nucleoproteína que fueron expandidas con IL-2 en combinación con IL-15 construida a través del software FlowJo.

7.6 Existe correlación entre los marcadores de tipo memoria y la expresión de marcadores de activación LAMP-1 e IFN- γ

En las células NK CD56^{DIM} expandidas con IL-2, figura 14A, se observó correlación positiva para NKp46 y LAMP-1 ($r=0.70$), LAMP-1 e IFN- γ ($r=0.80$) y correlación negativa para IFN- γ y NKG2C ($r=-0.63$). En las células NK CD56^{BRIGHT} expandidas con IL-2 figura 14B se observó correlación positiva para LAMP-1 e IFN- γ ($r=0.92$). En las células NK CD56^{DIM} expandidas con IL-2 en combinación con IL-15 figura 14C se observó correlación positiva para LAMP-1 e IFN- γ

($r=0.80$) y correlación negativa para IFN- γ y Granzima B ($r=-0.71$). En las células NK CD56^{BRIGHT} expandidas con IL-2 en combinación con IL-15 figura 14D se observó correlación positiva para NKG2C y NKp46 ($r=0.67$), NKp46 y LAMP-1 ($r=0.65$) y LAMP-1 e IFN- γ ($r=0.90$).

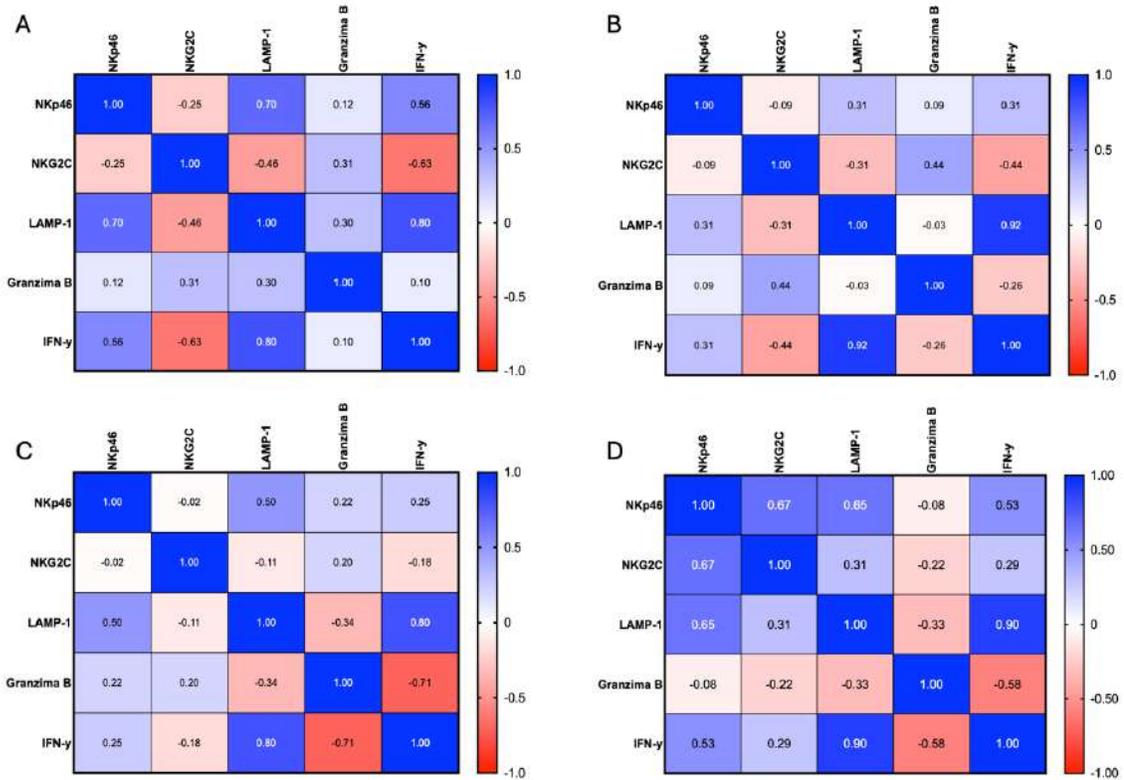


Figura 14. Correlacion de los marcadores de células NK. A) Correlaciones de marcadores de células NK CD56^{DIM} expandidas con IL-2 B) Correlaciones de marcadores de células NK CD56^{BRIGHT} expandidas con IL-2 C) Correlaciones de marcadores de células NK CD56^{DIM} expandidas con IL-2 en combinación con IL-15 D) Correlaciones de marcadores de células NK CD56^{BRIGHT} expandidas con IL-2 en combinación con IL-15. Análisis mediante prueba de correlación de Spearman valores significativos $r < 0.06$

7.7 Las células NK tipo memoria NKp46⁺ NKG2C⁺ expresan marcadores de activación

Se realizó un análisis de las células NK doble positivas para los marcadores NKG2C y NKp46, figura 15A. Se observó un mayor porcentaje de células NK doble positivas cuando fueron estimuladas con NP comparadas con las células no estimuladas, en ambas condiciones de expansión con IL-2 ($P=0.0097$) e IL-2/IL-15 ($P=0.0001$), figura 15B. Además, se observó un mayor número de células NK doble negativas NKG2C⁻ NKp46⁻ en las células NK no estimuladas comparadas con las células doble negativas totales que fueron estimuladas con NP que fueron expandidas con IL-2 ($P=0.0001$) así como con IL-2/IL-15 ($P=0.0003$), figura 15C.

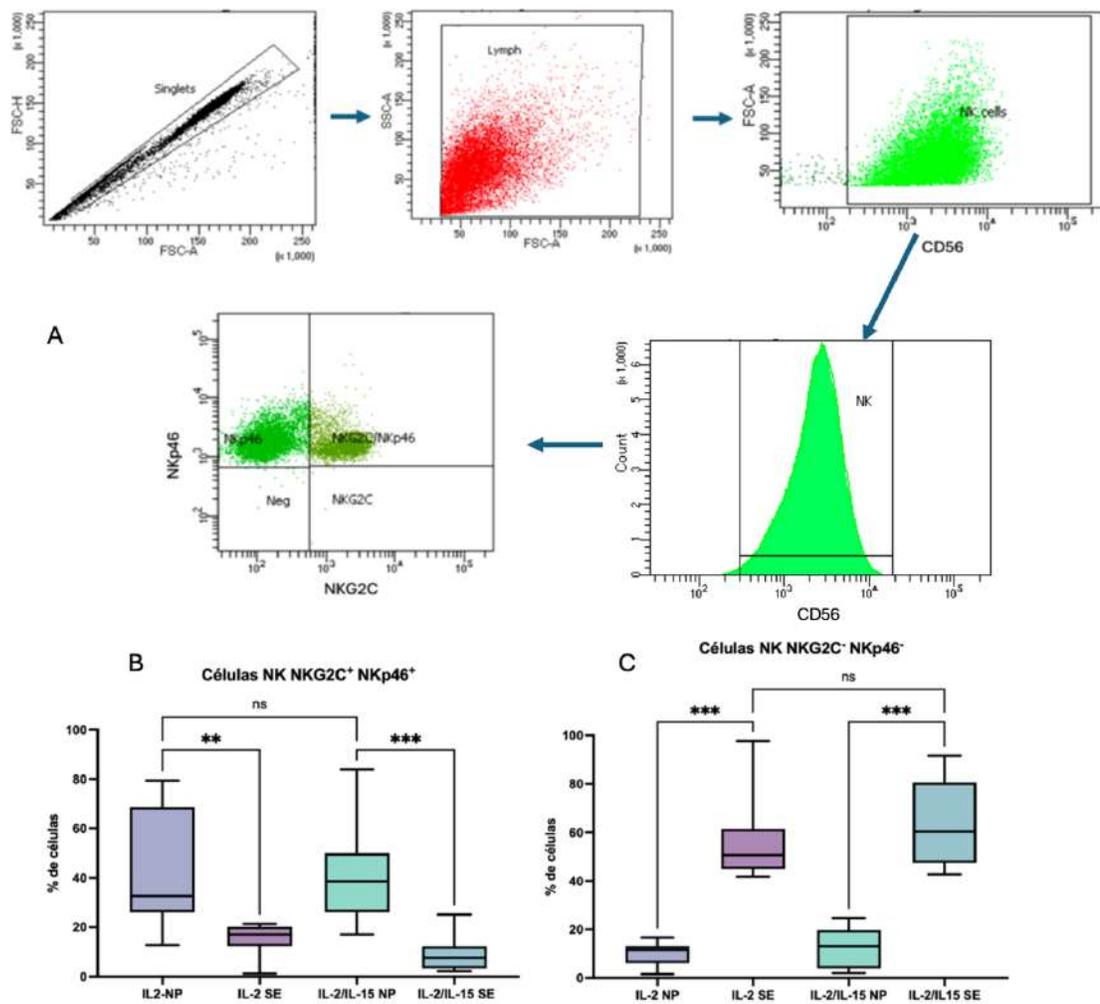


Figura 15. Porcentaje de células NK doble positivas y doble negativas. A) Estrategia de análisis células doble positivo B) Porcentaje de células con expresión positiva para NKp46 y NKG2C C) Porcentaje de células con expresión negativa para NKp46 y NKG2C. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn (n=10), mediciones por duplicado para NK SE (sin estímulo) y triplicado para NK NP (con nucleoproteína). ns= no significativo, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.005$, ****= $P < 0.001$.

La evaluación de los marcadores de activación de las células NK doble positivas para los marcadores de memoria se llevo a cabo empleando la estrategia mostrada en la figura 17A. Dichas células presentan una mayor expresión del marcador de activación LAMP-1 en las condiciones de expansión de IL-2/IL-15 y que fueron estimulados con NP ($P=0.0069$), figura 17B. Esas células doble positivas también mostraron una mayor expresión de IFN- γ cuando fueron estimuladas con NP y expandidas con IL-2 ($P=0.0005$) e IL-2/IL-15 ($P<0.0001$), figura 17C. Finalmente, las células doble positivas también presentaron una mayor expresión de Granzima B cuando se estimularon con NP y se cultivaron con IL-2/IL-15 para su expansión ($P=0.0012$), figura 14D.

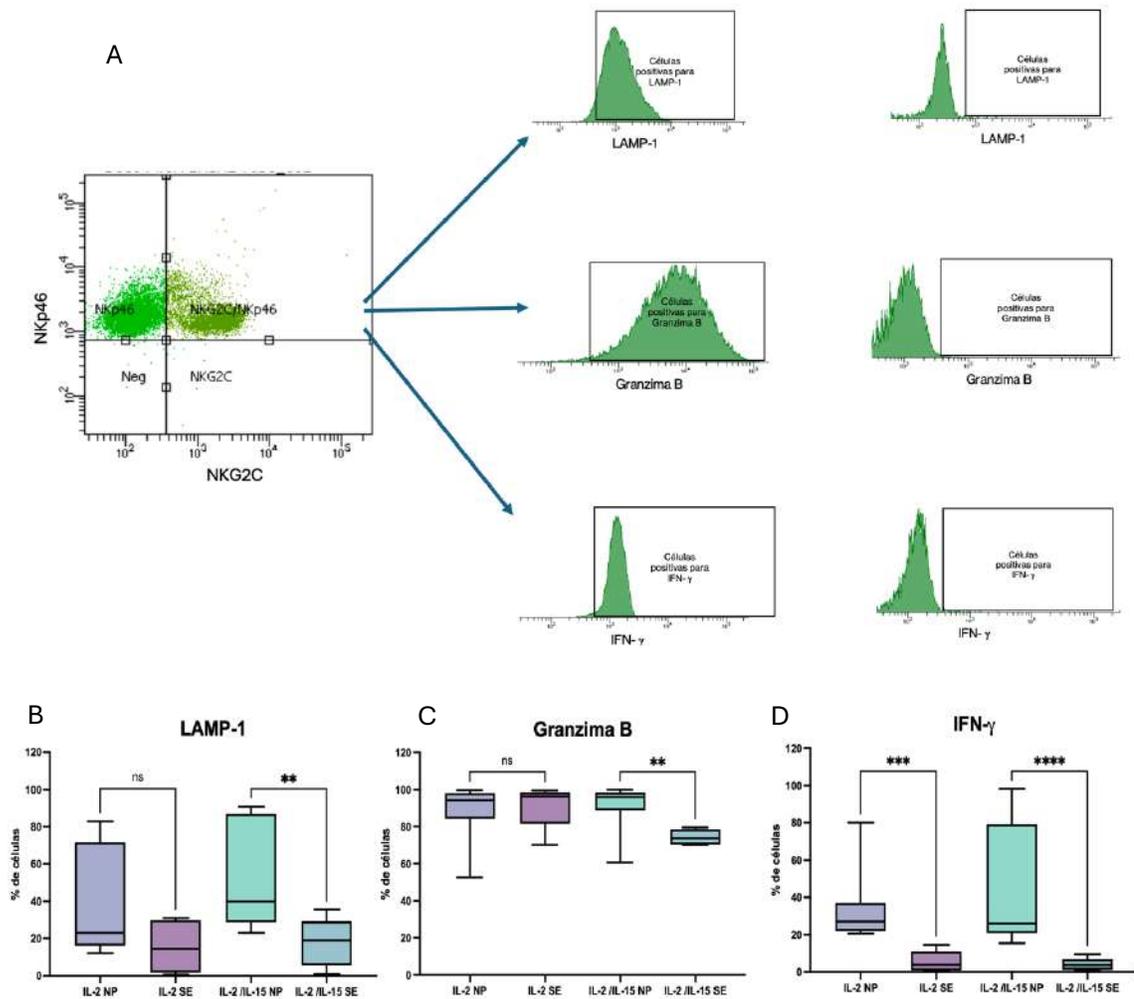


Figura 16. Expresión de marcadores de activación de células NK doble positivas.

A) Estrategia de análisis para evaluar marcadores de activación en células NK doble positivo B) Porcentaje de células con expresión de LAMP-1 C) Porcentaje de células con expresión de Granzima B D) Porcentaje de células con expresión de IFN- γ . Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn (n=10), mediciones por duplicado para NK SE (sin estímulo) y triplicado para NK NP (con nucleoproteína). ns= no significativo, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.005$, ****= $P < 0.001$.

7.8 Las células NK tipo memoria específicas de la NP del VIA muestran una mayor citotoxicidad contra células A549 infectadas con VIA

Las células NK estimuladas con la NP del VIA presentaron una mayor citotoxicidad en los co-cultivos con las células A549 infectadas con el VIA H1N1 en ambas condiciones de expansión comparadas con la citotoxicidad observada frente a las células A549 no infectadas ($P < 0.0001$). También se observó mayor citotoxicidad en los co-cultivos de células NK estimuladas con la NP del VIA con las células A549 infectadas con el VIA H1N1 en ambas condiciones de expansión comparada con los co-cultivos con células NK no estimuladas con la NP del VIA ($P < 0.0001$), figura 17.

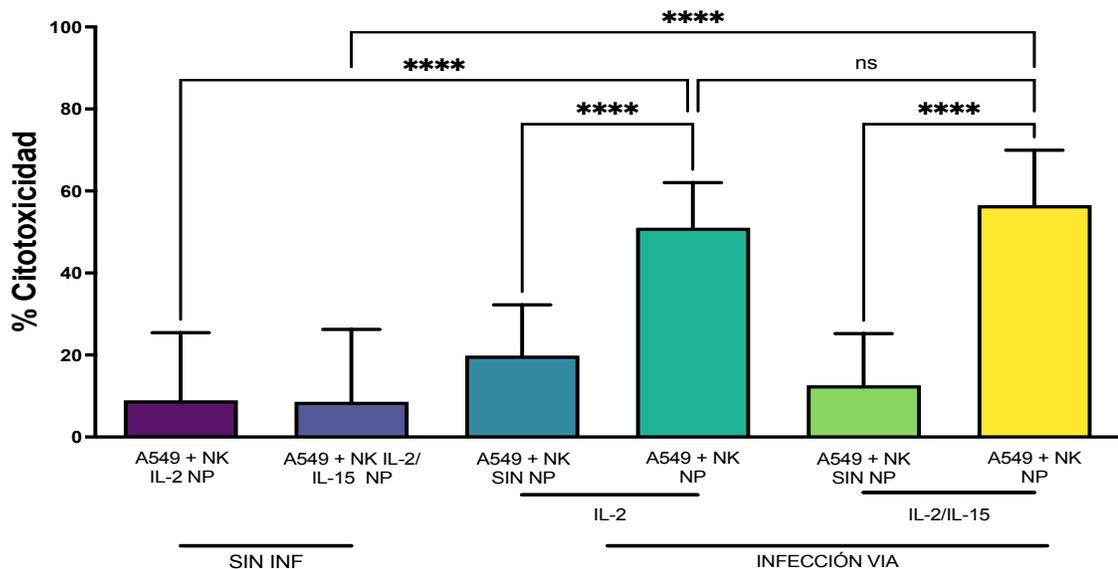


Figura 17. Porcentaje de citotoxicidad de células NK frente a células A549 infectadas con VIA. Análisis de ANOVA con comparación múltiple de Tukey ($n=10$), mediciones por triplicado o quintuplicado. ns= no significativo, ****= $P < 0.0001$.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de la potencia citotóxica total de las células NK tipo memoria específica para la NP del VIA en ambas condiciones de expansión donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la potencia citotóxica entre ambas condiciones.

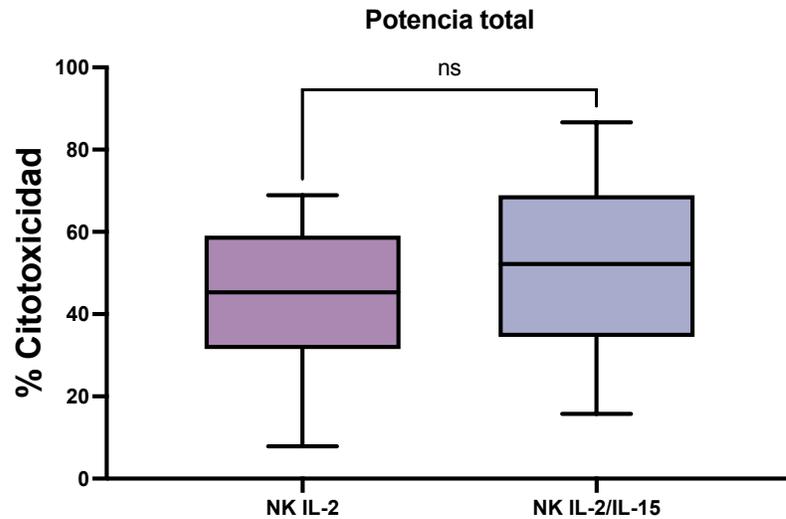


Figura 18. Potencia citotóxica total de células NK. Porcentaje de citotoxicidad expresado como potencia total a partir de la normalización de las variables con el estímulo con la NP del VIA con las variables sin estímulo. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn (n=10), ns= no significativo.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

Dadas las limitantes de obtención de células NK humanas para ensayos o modelos experimentales, primero se optimizó la expansión de las mismas *in vitro*. Para ello, se emplearon dos condiciones diferentes de expansión en medio CTS NK Xpander, donde se demostró que la suplementación con IL-2 e IL-15 fue la más eficiente. En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, estudios previos han reportado una mayor viabilidad y número de células NK cultivadas *in vitro* estimuladas con IL-15 comparadas con células NK estimuladas *in vitro* con IL-2 (111,112).

En la pureza, de las células NK en los cultivos expandidos con la condición suplementados con IL-2 e IL-15 mostraron una disminución en el porcentaje de proliferación de linfocitos T comparado con la suplementación con la IL-2. Una explicación es por las funciones biológicas de la IL-15, la cual facilita una óptima expansión *in vitro* y aumenta la proporción de células NK obtenidas de células mononucleares de sangre venosa periférica (112). Además, se ha observado una fuerte inducción de factores como Creb, mTOR y Hsp60 en células NK estimuladas con IL-15 en cultivos *in vitro* y no por la IL-2, lo cual resulta en un efecto directo en la proliferación y supervivencia de las células NK en cultivo (113). La IL-15 a través de la señalización por los receptores IL-15R en células NK induce la autofosforilación y la activación de las quinasas JAK1 y JAK3, a su vez

estás inducen las vías de señalización Ras-Raf-MEK, PI3K-Akt-mTOR, así como también, las vías de transducción de señales y activación de la transcripción STAT-5, lo que significa una mayor supervivencia, proliferación y viabilidad de las células NK en cultivo (53–55). Por todo lo anterior, la combinación con esas citocinas generó una mayor pureza de los cultivos de NK.

En este estudio la proporción de subpoblaciones de células NK CD56^{DIM}/CD56^{BRIGHT} se ven afectadas en la expansión *in vitro* de las células NK. En la condición de expansión donde se suplementó con IL-2 e IL-15 mostró un porcentaje mayor de células CD56^{BRIGHT}, en concordancia con lo reportado en otros trabajos, donde se ha observado que la IL-15 confiere una ventaja de supervivencia selectiva a las células NK CD56^{BRIGHT}, favoreciendo su sobrevivencia sobre las células NK CD56^{DIM} (112,114).

En la generación de células NK tipo memorias específicas para la NP del VIA, (112)(113)(53–55) las células NK CD56^{DIM} no se mostraron cambios en el fenotipo tras la estimulación con nucleoproteína en ninguna de las condiciones de expansión. Estos resultados son similares con otros estudios donde se ha reportado que células NK pulmonares con fenotipo CD56^{DIM}CD16⁻CD49a⁺ no presentaron una respuesta significativa frente a la infección del VIA *in vitro* (115). En estudios previos se ha observado la presencia de una mayor proporción de células NK CD56^{BRIGHT} en respuesta a células dendríticas infectadas con el VIA en co-cultivos con células NK (116). El mismo fenómeno se ha observado en individuos vacunados contra el VIA, donde se incrementaron los niveles de

células NK CD56^{BRIGHT}CD25⁺ comparado con el poco incremento de las células CD56^{DIM}CD25⁺ este efecto se observó predominantemente en sujetos del estudio infectados con el VIA H1N1pdm2009 (117). Lo anterior sugiere que las células NK CD56^{BRIGHT} pueden responder a la infección del VIA de manera selectiva explicando en parte el hecho de no observar cambios fenotípicos en las células NK CD56^{DIM} frente a la estimulación con la NP del VIA.

El aumento de los marcadores NKp46 y NKG2C posterior a la estimulación con la NP del VIA H1N1 en la subpoblación de célula NK CD56^{BRIGHT} podría indicar la presencia de una respuesta de tipo memoria específica a dicha proteína del VIA. La afirmación de que la expresión de dichos marcadores está asociada a tipo memoria se refuerza al observar la baja expresión de estos marcadores en los grupos de células NK no estimuladas con NP pero que fueron expandidas con las citocinas. El aumento en la expresión de NKp46 en células NK ya se ha reportado cuando se encuentran frente a células dendríticas infectadas con el VIA. El reconocimiento de células infectadas es altamente específico para el NKp46 y detona una respuesta de Interferón tipo I, la respuesta disminuye con el bloqueo con anticuerpos anti-NKp46 (116). La expresión de NKp46 no se limita a condiciones *in vitro*, en modelos murinos se ha identificado una población de células NK de tipo memoria con un fenotipo NKp46+NKG2A⁺ que reconoce de manera específica sitios de glicosilación de la hemaglutinina del VIA , lo que resalta la alta especificidad de NKp46 tiene frente al reconocimiento de células infectadas por el VIA y al virus mismo (118). Por otro lado, existe evidencia sobre el aumento en la expresión NKG2C tras la vacunación contra el VIA (109,119).

Este aumento de NKG2C ha sido también observado en cultivos *in vitro* de células NK frente a la cepa del VIA California/7/2009, demostrando que la exposición a cepas virales específicas induce la expresión NKG2C (108) por lo que, similar a NKp46, el aumento de la expresión de NKG2C observado en este estudio podría asociarse a un fenotipo de células NK de tipo memoria específico para la NP del VIA H1N1 el cuál se observa de manera predominante en células NK CD56^{BRIGHT}.

En el análisis de la marcadas de activación en las células NK estimuladas con la NP del VIA pdm09 se encontró aumentado el marcador de degranulación LAMP-1 (CD107a). Células NK con una expresión mayor de LAMP-1 se han reportado previamente en cultivos *in vitro* de PBMC expuestos al VIA (120), lo cual concuerda con nuestros resultados. Además el aumento de la expresión se ha observado también posterior a la vacuna de la influenza, confiriendo de protección frente a la infección y promoviendo un fenotipo CD57+ LAMP-1+(121), indicando la importancia de LAMP-1 en la respuesta antiviral de células NK en contra de infecciones por VIA. La producción de IFN- γ no se observó en las células NK estimuladas con la NP del VIA, sin embargo, existen diversos estudios muestran un aumento en la expresión de IFN- γ de células NK frente al VIA (107,110,121). Estos estudios se han centrado en validar dicha expresión a través de factores de transcripción o cuantificación directa del IFN- γ extracelular lo que podría explicar las diferencias en nuestro estudio. Finalmente, se ha reportado un aumento de granzima B en condiciones *in vivo* e *in vitro* en células NK tratadas con diversas citocinas como IL-2, IL-15, IL-18 e IL-21 independientemente del

contexto de infección viral (122–124), lo cuál refleja que el aumento en la expresión de Granzima B está principalmente ligado a las citocinas, lo que explica que no se hayan encontrado diferencias en nuestros grupos. Respecto a la comparación frente a sujetos vacunados y no vacunados no se encontraron diferencias significativas se atribuyen en parte al tiempo de reclutamiento de los sujetos vacunados que abarca desde los 5 a los 9 meses posvacunación, esto se puede explicar debido a que las células de tipo memoria se alojan en órganos linfoides secundarios e hígado por lo tanto estas células no fueron obtenidas a través del aislamiento de sangre venosa periférica (64,65,125,126). Debido a los resultados observados, en este proyecto se realizaron análisis más detallados mediante la técnica de reducción de dimensionalidad t-SNE, a fin de complementar el análisis de los marcadores individuales a través de citometría de flujo. Este análisis revela una subpoblación bien definida de células NK con expresión conjunta de NKG2C y NKp46 la cual concuerda también con la expresión de Granzima B, LAMP-1 e IFN- γ , así como la correlación positiva observada entre marcadores de tipo memoria NKG2C y NKp46 principalmente en las células NK CD56^{BRIGHT} y su asociación directa con marcadores de funcionalidad como LAMP-1 e IFN- γ que al igual que los marcadores de tipo memoria correlacionaron de manera positiva en las células NK CD56^{BRIGHT}. Estos análisis presentan evidencia de que dicha correlación y grupos analizados son compatibles con un fenotipo de tipo memoria inducido por la NP del VIA. La visualización t-SNE resaltó la heterogeneidad funcional y fenotípica dentro de la población total de células NK, y respalda la idea de que la NP del VIA es capaz de inducir una respuesta de tipo memoria por células NK. Las correlaciones

encontradas además apoyan estos hallazgos denotando la importancia de dichos marcadores de tipo memoria en la respuesta frente al estímulo. Lo anterior, también es reforzado por los hallazgos en el reconocimiento de la NP por la interacción del receptor activador CD94/NKG2C con el ligando HLA-E (110) así como evidencia que remarca el aumento positivo que existe entre la producción de IFN- γ y el aumento de LAMP-1 al estimular *in vitro* células NK con células mononucleares infectadas con VIA (127). Además, nuestros hallazgos en el análisis de células doble positivas para NKG2C⁺NKp46⁺ las cuáles presentan un aumento en el porcentaje de estas células y un patron de activación dependiente de la NP que no se observa en las células NK no estimuladas con la NP, lo que también descarta el efecto de las citocinas empleadas en la expansión. Este es el primer reporte de un fenotipo de células NK de tipo memoria específicas de la NP del VIA H1N1 pdm09 pero la evidencia obtenida nos hace inferir que dichas células NKG2C⁺NKp46⁺ son un fenotipo de células NK de tipo memoria centrado en el reconocimiento de péptidos de dicha proteína, como lo han reportado otros grupos de trabajo donde han logrado caracterizar fenotipos doble positivo para células NK de tipo memoria específicas para ciertos virus y ciertas proteínas virales diferentes al VIA (79,99,116,118).

Referente a la citotoxicidad observada por las células NK frente a células A549 infectadas con VIA H1N1 no existen reportes directos acerca de la actividad citotóxica de las células NK de tipo memoria específicas para la nucleoproteína del VIA, la única evidencia de citotoxicidad de células NK contra células infectadas por VIA fue en un modelo murino donde las células fueron estimuladas

con hemaglutinina y se observó una actividad citotóxica disminuida (118). Este es el primer reporte sobre ensayos de citotoxicidad de células NK específicas para la NP. Sin embargo frente a otros virus existen evidencias de como cierta estimulación de las células NK puede aumentar su citotoxicidad, en un estudio reciente, se demostró que la potenciación de la señalización mediada por IL-15 mediante la molécula HODHBt incrementa significativamente la citotoxicidad de las células NK frente a células infectadas por VIH(128). En el contexto de CMV se ha observado a través de la expresión dirigida del ligando ULBP2, un activador del receptor NKG2D se genera una mayor activación de dicho NKG2D y, en consecuencia, una mayor citotoxicidad de las células NK frente a la infección por CMV (129). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis del direccionamiento respuesta específica mediada por receptores activadores del eje NKG2, expresado en subpoblaciones de células NK de tipo memoria como las NKG2C⁺ observadas en este trabajo, puede ser una vía eficaz para potenciar la citotoxicidad frente a virus, incluyendo influenza A.

Dentro de las limitaciones del presente trabajo se encuentran: 1) la falta de cuantificación del IFN- γ y la Granzima B en el medio de los co-cultivos de células NK y células A549; 2) experimentos donde la estimulación se realice con NP de otras cepas tanto de VIA u otros virus respiratorios; y 3) realizar una evaluación de cambios epigenéticos de las células NK a través de detección de metilaciones o acetilaciones de histonas que nos ayuden a confirmar que las células NK son de tipo memoria.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIÓN

Las células NK de tipo memoria específicas de la nucleoproteína del virus de influenza A H1N1 incrementan la eliminación de células infectadas con el virus.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

- Evaluar la citotoxicidad de las células NK de tipo memoria frente a la NP de otras cepas de virus de influenza.
- Evaluar la citotoxicidad de las células NK de tipo memoria frente a la NP de cepas de virus respiratorios distintos a los virus de influenza.
- Cuantificar la secreción de IFN- γ y Granzima B en el medio de los cocultivos con células A549 infectadas.
- Evaluar cambios epigenéticos de las células NK a través de detección de metilaciones o acetilaciones de histonas.
- Evaluar el efecto de la criopreservación sobre el fenotipo y la actividad citotóxica de las células NK de tipo memoria.
- Análisis preclínicos en modelos murinos u organoides de epitelio pulmonar.

REFERENCIAS

1. Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M, et al. Influenza Virus. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(1):42–9.
2. Lyytikäinen O, Hoffmann E, Timm H, Schweiger B, Witte W, Vieth U, et al. Influenza a outbreak among adolescents in a ski hostel. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1998 Feb;17(2):128–30.
3. Thomas P, Riffelmann M, Schweiger B, Dominik S, von König CHW. Fatal influenza A virus infection in a child vaccinated against influenza. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Feb;22(2):201–2.
4. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003657.
5. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 1992 May 1;69(3):517–28.
6. Wang C, Lamb RA, Pinto LH. Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel activity in mammalian cells. *Virology*. 1994 Nov 15;205(1):133–40.
7. Ruigrok RW, Calder LJ, Wharton SA. Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure. *Virology*. 1989 Nov;173(1):311–6.
8. Lamb RA, Choppin PW. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:467–506.
9. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J*. 1994 Jul;13(13):3158–65.
10. Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(22):8140–4.
11. Jennings PA, Finch JT, Winter G, Robertson JS. Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA? *Cell*. 1983 Sep;34(2):619–27.
12. Murti KG, Webster RG, Jones IM. Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology*. 1988 Jun;164(2):562–6.
13. Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J*. 1997 Mar 17;16(6):1248–57.
14. Sha TW, Weber M, Kasumba DM, Noda T, Nakano M, Kato H, et al. Influenza A virus NS1 optimises virus infectivity by enhancing genome packaging in a dsRNA-binding dependent manner. *Virol J*. 2020 Dec 16;17(1):107.
15. Richardson JC, Akkina RK. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol*. 1991;116(1–4):69–80.

16. Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*. 1993 Sep;196(1):249–55.
17. O'Neill RE, Talon J, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*. 1998 Jan 2;17(1):288–96.
18. Jung HE, Lee HK. Host Protective Immune Responses against Influenza A Virus Infection. *Viruses*. 2020 May 3;12(5):504.
19. Scholtissek C, Bürger H, Kistner O, Shortridge KF. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*. 1985 Dec;147(2):287–94.
20. Wei Y, Zeng Y, Zhang X, Xu S, Wang Z, Du Y, et al. The Nucleoprotein of H7N9 Influenza Virus Positively Regulates TRAF3-Mediated Innate Signaling and Attenuates Viral Virulence in Mice. *J Virol*. 2020 Nov 23;94(24).
21. Reguera J, Cusack S, Kolakofsky D. Segmented negative strand RNA virus nucleoprotein structure. *Curr Opin Virol*. 2014 Apr;5:7–15.
22. Tang YS, Xu S, Chen YW, Wang JH, Shaw PC. Crystal structures of influenza nucleoprotein complexed with nucleic acid provide insights into the mechanism of RNA interaction. *Nucleic Acids Res*. 2021 Apr 19;49(7):4144–54.
23. Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J. Ultrastructural and Functional Analyses of Recombinant Influenza Virus Ribonucleoproteins Suggest Dimerization of Nucleoprotein during Virus Amplification. *J Virol*. 2000 Jan;74(1):156–63.
24. Turrell L, Lyall JW, Tiley LS, Fodor E, Vreede FT. The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*. 2013 Mar 12;4(1):1591.
25. Šantak M, Matic Z. The Role of Nucleoprotein in Immunity to Human Negative-Stranded RNA Viruses-Not Just Another Brick in the Viral Nucleocapsid. *Viruses*. 2022 Mar 3;14(3).
26. Juno JA, van Bockel D, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders JJ, Munier CML. Cytotoxic CD4 T Cells-Friend or Foe during Viral Infection? *Front Immunol*. 2017;8:19.
27. Vandervan HA, Ana-Sosa-Batiz F, Jegaskanda S, Rockman S, Laurie K, Barr I, et al. What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins. *EBioMedicine*. 2016 Jun;8:277–90.
28. Quatrini L, Della Chiesa M, Sivori S, Mingari MC, Pende D, Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur J Immunol* [Internet]. 2021 Jul 1;51(7):1566–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33899224>
29. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:405–29.
30. Rumpert M, Drylewicz J, Ackermans LJE, Borghans JAM, Medzhitov R, Meyaard L. Functional categories of immune inhibitory receptors. *Nat Rev Immunol*. 2020 Dec 1;20(12):771–80.

31. Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol*. 2006 Dec 22;7(12):1334–42.
32. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* [Internet]. 2017 Nov 21;47(5):820–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29166586>
33. Daher M, Rezvani K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2018 Apr;51:146–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29605760>
34. LANIER LL, PHILLIPS JH. Ontogeny of natural killer cells. *Nature*. 1986 Jan;319(6051):269–70.
35. Pesce S, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor. *Front Immunol*. 2016 Oct 7;7.
36. Hayhoe RPG, Henson SM, Akbar AN, Palmer DB. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset. *Hum Immunol*. 2010 Jul;71(7):676–81.
37. Ming B, Wu T, Cai S, Hu P, Tang J, Zheng F, et al. The Increased Ratio of Blood CD56bright NK to CD56dim NK Is a Distinguishing Feature of Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol Res*. 2020;2020:7523914.
38. Gao M, Yang Y, Li D, Ming B, Chen H, Sun Y, et al. CD27 natural killer cell subsets play different roles during the pre-onset stage of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Innate Immun*. 2016 Aug 9;22(6):395–404.
39. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* [Internet]. 2009 Apr 2;126(4):458–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19278419>
40. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001 Nov;22(11):633–40.
41. Hasan MS, Ryan PL, Bergmeier LA, Fortune F. Circulating NK cells and their subsets in Behçet's disease. *Clin Exp Immunol*. 2017 May;188(2):311–22.
42. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. 1994 May 13;264(5161):965–8.
43. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:19–49.
44. Waldmann T, Tagaya Y, Bamford R. Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors. *Int Rev Immunol*. 1998;16(3–4):205–26.
45. Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2011 Oct 13;3(4):3856–93.
46. Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med*. 2000 Mar 6;191(5):753–6.

47. Tagaya Y, Burton JD, Miyamoto Y, Waldmann TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO J*. 1996 Sep 16;15(18):4928–39.
48. Schimpl A, Hünig T, Elbe A, Berberich I, Krämer S, Merz H, et al. Development and Function of the Immune System in Mice with Targeted Disruption of the Interleukin 2 Gene. In: *Transgenesis and Targeted Mutagenesis in Immunology*. Elsevier; 1994. p. 191–201.
49. Wang X, Rickert M, Garcia KC. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science*. 2005 Nov 18;310(5751):1159–63.
50. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*. 1981 May 28;291(5813):335–8.
51. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 1990 May 1;171(5):1509–26.
52. Wang X, Zhao XY. Transcription Factors Associated With IL-15 Cytokine Signaling During NK Cell Development. *Front Immunol*. 2021 Mar 18;12.
53. Ma A, Koka R, Burkett P. DIVERSE FUNCTIONS OF IL-2, IL-15, AND IL-7 IN LYMPHOID HOMEOSTASIS. *Annu Rev Immunol*. 2006 Apr 1;24(1):657–79.
54. Koka R, Burkett P, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Cutting Edge: Murine Dendritic Cells Require IL-15R α to Prime NK Cells. *The Journal of Immunology*. 2004 Sep 15;173(6):3594–8.
55. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R α Recycles and Presents IL-15 In trans to Neighboring Cells. *Immunity*. 2002 Nov;17(5):537–47.
56. Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*. 2006 Jan;1(1):7–9.
57. Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol Cancer*. 2023 Aug 18;22(1):138.
58. Smith MR, Satter LRF, Vargas-Hernández A. STAT5b: A master regulator of key biological pathways. *Front Immunol*. 2023 Jan 23;13.
59. Lamers-Kok N, Panella D, Georgoudaki AM, Liu H, Özkazanc D, Kučerová L, et al. Natural killer cells in clinical development as non-engineered, engineered, and combination therapies. *J Hematol Oncol*. 2022 Nov 8;15(1):164.
60. Mujal AM, Delconte RB, Sun JC. Natural Killer Cells: From Innate to Adaptive Features. *Annu Rev Immunol*. 2021 Apr 26;39(1):417–47.
61. O’Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006 May;7(5):507–16.
62. Brillantes M, Beaulieu AM. Memory and Memory-Like NK Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Mar 25;10.
63. Gang M, Wong P, Berrien-Elliott MM, Fehniger TA. Memory-like natural killer cells for cancer immunotherapy. *Semin Hematol*. 2020 Oct;57(4):185–93.

64. Wang X, Peng H, Cong J, Wang X, Lian Z, Wei H, et al. Memory formation and long-term maintenance of IL-7R α + ILC1s via a lymph node-liver axis. *Nat Commun*. 2018 Nov 19;9(1):4854.
65. Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X, et al. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2013 Apr 1;123(4):1444–56.
66. Paust S, Senman B, Von Andrian UH. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev*. 2010 May 28;235(1):286–96.
67. Gillard GO, Bivas-Benita M, Hovav AH, Grandpre LE, Panas MW, Seaman MS, et al. Thy1+ NK [corrected] cells from vaccinia virus-primed mice confer protection against vaccinia virus challenge in the absence of adaptive lymphocytes. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Aug 18;7(8):e1002141. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829360>
68. Reeves RK, Li H, Jost S, Blass E, Li H, Schafer JL, et al. Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat Immunol* [Internet]. 2015 Sep 20;16(9):927–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.3227>
69. Scott-Algara D, Truong LX, Versmisse P, David A, Luong TT, Nguyen N V., et al. Cutting Edge: Increased NK Cell Activity in HIV-1-Exposed but Uninfected Vietnamese Intravascular Drug Users. *The Journal of Immunology*. 2003 Dec 1;171(11):5663–7.
70. Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, Tran HK, Tran T, Nguyen N, et al. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4296–305.
71. Tiemessen CT, Shalekoff S, Meddows-Taylor S, Schramm DB, Papathanasopoulos MA, Gray GE, et al. Cutting Edge: Unusual NK Cell Responses to HIV-1 Peptides Are Associated with Protection against Maternal-Infant Transmission of HIV-1. *The Journal of Immunology*. 2009 May 15;182(10):5914–8.
72. O’Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell– and B cell–independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006 May 16;7(5):507–16.
73. Wijaya RS, Read SA, Truong NR, Han S, Chen D, Shahidipour H, et al. HBV vaccination and HBV infection induces HBV-specific natural killer cell memory. *Gut*. 2020 Mar 30;gutjnl-2019-319252.
74. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):557–61.
75. Beaulieu AM, Zawislak CL, Nakayama T, Sun JC. The transcription factor Zbtb32 controls the proliferative burst of virus-specific natural killer cells responding to infection. *Nat Immunol*. 2014 Jun 20;15(6):546–53.
76. Sun JC, Madera S, Bezman NA, Beilke JN, Kaplan MH, Lanier LL. Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *Journal of Experimental Medicine*. 2012 May 7;209(5):947–54.
77. Adams NM, Lau CM, Fan X, Rapp M, Geary CD, Weizman OE, et al. Transcription Factor IRF8 Orchestrates the Adaptive Natural Killer Cell Response. *Immunity*. 2018 Jun;48(6):1172–1182.e6.

78. Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RAW, Roosnek E. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):914–5.
79. Béziat V, Dalgard O, Asselah T, Halfon P, Bedossa P, Boudifa A, et al. CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol [Internet]*. 2012 Feb 16;42(2):447–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105371>
80. Schlums H, Cichocki F, Tesi B, Theorell J, Beziat V, Holmes TD, et al. Cytomegalovirus Infection Drives Adaptive Epigenetic Diversification of NK Cells with Altered Signaling and Effector Function. *Immunity*. 2015 Mar;42(3):443–56.
81. Lee J, Zhang T, Hwang I, Kim A, Nitschke L, Kim M, et al. Epigenetic Modification and Antibody-Dependent Expansion of Memory-like NK Cells in Human Cytomegalovirus-Infected Individuals. *Immunity*. 2015 Mar;42(3):431–42.
82. Hammer Q, Rückert T, Borst EM, Dunst J, Haubner A, Durek P, et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat Immunol*. 2018 May 9;19(5):453–63.
83. Cichocki F, Wu CY, Zhang B, Felices M, Tesi B, Tuininga K, et al. ARID5B regulates metabolic programming in human adaptive NK cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2018 Sep 3;215(9):2379–95.
84. Muntasell A, Pupuleku A, Cisneros E, Vera A, Moraru M, Vilches C, et al. Relationship of NKG2C Copy Number with the Distribution of Distinct Cytomegalovirus-Induced Adaptive NK Cell Subsets. *J Immunol [Internet]*. 2016 May 1;196(9):3818–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26994220>
85. Della Chiesa M, Falco M, Bertaina A, Muccio L, Alicata C, Frassoni F, et al. Human Cytomegalovirus Infection Promotes Rapid Maturation of NK Cells Expressing Activating Killer Ig-like Receptor in Patients Transplanted with NKG2C-/- Umbilical Cord Blood. *The Journal of Immunology*. 2014 Feb 15;192(4):1471–9.
86. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Feb 10;106(6):1915–9.
87. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med*. 2016 Sep 21;8(357).
88. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4751–60.
89. Leong JW, Chase JM, Romee R, Schneider SE, Sullivan RP, Cooper MA, et al. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 Induces CD25 and a Functional High-Affinity IL-2 Receptor on Human Cytokine-Induced Memory-like Natural Killer Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014 Apr;20(4):463–73.

90. Lee SH, Fragoso MF, Biron CA. Cutting Edge: A Novel Mechanism Bridging Innate and Adaptive Immunity: IL-12 Induction of CD25 To Form High-Affinity IL-2 Receptors on NK Cells. *The Journal of Immunology*. 2012 Sep 15;189(6):2712–6.
91. Ni J, Hölsken O, Miller M, Hammer Q, Luetke-Eversloh M, Romagnani C, et al. Adoptively transferred natural killer cells maintain long-term antitumor activity by epigenetic imprinting and CD4⁺ T cell help. *Oncoimmunology*. 2016 Sep 5;5(9):e1219009.
92. Donnelly RP, Loftus RM, Keating SE, Liou KT, Biron CA, Gardiner CM, et al. mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Is a Prerequisite for NK Cell Effector Function. *The Journal of Immunology*. 2014 Nov 1;193(9):4477–84.
93. Marçais A, Cherfils-Vicini J, Viant C, Degouve S, Viel S, Fenis A, et al. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat Immunol*. 2014 Aug 29;15(8):749–57.
94. Almutairi SM, Ali AK, He W, Yang DS, Ghorbani P, Wang L, et al. Interleukin-18 up-regulates amino acid transporters and facilitates amino acid-induced mTORC1 activation in natural killer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 Mar;294(12):4644–55.
95. Terrén I, Mikelez I, Odriozola I, Gredilla A, González J, Orrantia A, et al. Implication of Interleukin-12/15/18 and Ruxolitinib in the Phenotype, Proliferation, and Polyfunctionality of Human Cytokine-Preactivated Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 2018 Apr 16;9.
96. Paust S, Gill HS, Wang BZ, Flynn MP, Moseman EA, Senman B, et al. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol*. 2010 Dec 24;11(12):1127–35.
97. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. Human Cytomegalovirus (CMV)-Induced Memory-like NKG2C⁺ NK Cells Are Transplantable and Expand In Vivo in Response to Recipient CMV Antigen. *The Journal of Immunology*. 2012 Nov 15;189(10):5082–8.
98. Hammer Q, Rückert T, Borst EM, Dunst J, Haubner A, Durek P, et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat Immunol*. 2018 May 9;19(5):453–63.
99. Hendricks DW, Balfour HH, Dunmire SK, Schmeling DO, Hogquist KA, Lanier LL. Cutting Edge: NKG2ChiCD57⁺ NK Cells Respond Specifically to Acute Infection with Cytomegalovirus and Not Epstein–Barr Virus. *The Journal of Immunology*. 2014 May 15;192(10):4492–6.
100. Björkström NK, Svensson A, Malmberg KJ, Eriksson K, Ljunggren HG. Characterization of Natural Killer Cell Phenotype and Function during Recurrent Human HSV-2 Infection. *PLoS One*. 2011 Nov 15;6(11):e27664.
101. Strowig T, Brilot F, Arrey F, Bougras G, Thomas D, Muller WA, et al. Tonsillar NK Cells Restrict B Cell Transformation by the Epstein-Barr Virus via IFN- γ . *PLoS Pathog*. 2008 Feb 8;4(2):e27.

102. Lünemann A, Vanoaica LD, Azzi T, Nadal D, Münz C. A Distinct Subpopulation of Human NK Cells Restricts B Cell Transformation by EBV. *The Journal of Immunology*. 2013 Nov 15;191(10):4989–95.
103. Jud A, Kotur M, Berger C, Gysin C, Nadal D, Lünemann A. Tonsillar CD56brightNKG2A+ NK cells restrict primary Epstein-Barr virus infection in B cells via IFN- γ . *Oncotarget*. 2017 Jan 24;8(4):6130–41.
104. Nikzad R, Angelo LS, Aviles-Padilla K, Le DT, Singh VK, Bimler L, et al. Human natural killer cells mediate adaptive immunity to viral antigens. *Sci Immunol*. 2019 May 24;4(35).
105. Alter G, Heckerman D, Schneidewind A, Fadda L, Kadie CM, Carlson JM, et al. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature*. 2011 Aug 3;476(7358):96–100.
106. Alter G, Rihn S, Walter K, Nolting A, Martin M, Rosenberg ES, et al. HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* [Internet]. 2009 Jul;83(13):6798–805. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19386717>
107. Dou Y, Fu B, Sun R, Li W, Hu W, Tian Z, et al. Influenza Vaccine Induces Intracellular Immune Memory of Human NK Cells. *PLoS One*. 2015 Mar 17;10(3):e0121258.
108. Goodier MR, Rodriguez-Galan A, Lusa C, Nielsen CM, Darboe A, Moldoveanu AL, et al. Influenza Vaccination Generates Cytokine-Induced Memory-like NK Cells: Impact of Human Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Immunology*. 2016 Jul 1;197(1):313–25.
109. Riese P, Trittel S, Pathirana RD, Klawonn F, Cox RJ, Guzmán CA. Responsiveness to Influenza Vaccination Correlates with NKG2C-Expression on NK Cells. *Vaccines (Basel)*. 2020 Jun 5;8(2):281.
110. Jost S, Lucar O, Lee E, Yoder T, Kroll K, Sugawara S, et al. Antigen-specific memory NK cell responses against HIV and influenza use the NKG2/HLA-E axis. *Sci Immunol*. 2023 Dec 22;8(90).
111. Choi YH, Lim EJ, Kim SW, Moon YW, Park KS, An HJ. IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells. *J Immunother Cancer*. 2019 Dec 5;7(1):168.
112. Liu M, Meng Y, Zhang L, Han Z, Feng X. High-efficient generation of natural killer cells from peripheral blood with preferable cell vitality and enhanced cytotoxicity by combination of IL-2, IL-15 and IL-18. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jan;534:149–56.
113. Watkinson F, Nayar SK, Rani A, Sakellariou CA, Elhage O, Papaevangelou E, et al. IL-15 Upregulates Telomerase Expression and Potently Increases Proliferative Capacity of NK, NKT-Like, and CD8 T Cells. *Front Immunol*. 2021 Jan 18;11.
114. Wagner JA, Rosario M, Romee R, Berrien-Elliott MM, Schneider SE, Leong JW, et al. CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *Journal of Clinical Investigation*. 2017 Oct 3;127(11):4042–58.

115. Cooper GE, Ostridge K, Khakoo SI, Wilkinson TMA, Staples KJ. Human CD49a+ Lung Natural Killer Cell Cytotoxicity in Response to Influenza A Virus. *Front Immunol.* 2018 Jul 20;9.
116. Draghi M, Pashine A, Sanjanwala B, Gendzekhadze K, Cantoni C, Cosman D, et al. NKp46 and NKG2D Recognition of Infected Dendritic Cells Is Necessary for NK Cell Activation in the Human Response to Influenza Infection. *The Journal of Immunology.* 2007 Mar 1;178(5):2688–98.
117. Jost S, Quillay H, Reardon J, Peterson E, Simmons RP, Parry BA, et al. Changes in Cytokine Levels and NK Cell Activation Associated with Influenza. *PLoS One.* 2011 Sep 23;6(9):e25060.
118. Zheng J, Wen L, Yen HL, Liu M, Liu Y, Teng O, et al. Phenotypic and Functional Characteristics of a Novel Influenza Virus Hemagglutinin-Specific Memory NK Cell. *J Virol.* 2021 May 24;95(12).
119. Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Fehniger TA. Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *J Innate Immun.* 2015;7(6):563–71.
120. Jegaskanda S, Vandervan HA, Tan HX, Alcantara S, Wragg KM, Parsons MS, et al. Influenza Virus Infection Enhances Antibody-Mediated NK Cell Functions via Type I Interferon-Dependent Pathways. *J Virol.* 2019 Mar;93(5).
121. Boudreau CM, Burke JS, Yousif AS, Sangesland M, Jastrzebski S, Verschoor C, et al. Antibody-mediated NK cell activation as a correlate of immunity against influenza infection. *Nat Commun.* 2023 Aug 24;14(1):5170.
122. Enomoto Y, Li P, Jenkins LM, Anastasakis D, Lyons GC, Hafner M, et al. Cytokine-enhanced cytolytic activity of exosomes from NK Cells. *Cancer Gene Ther.* 2022 Jun 27;29(6):734–49.
123. Berjis A, Muthumani D, Aguilar OA, Pomp O, Johnson O, Finck A V., et al. Pretreatment with IL-15 and IL-18 rescues natural killer cells from granzyme B-mediated apoptosis after cryopreservation. *Nat Commun.* 2024 May 10;15(1):3937.
124. Lim YS, Lee AG, Jiang X, Scott JM, Cofie A, Kumar S, et al. NK cell-derived extracellular granzyme B drives epithelial ulceration during HSV-2 genital infection. *Cell Rep.* 2023 Apr;42(4):112410.
125. Paust S, von Andrian UH. Natural killer cell memory. *Nat Immunol.* 2011 Jun 18;12(6):500–8.
126. Jiang X, Chen Y, Peng H, Tian Z. Single line or parallel lines: NK cell differentiation driven by T-bet and Eomes. *Cell Mol Immunol.* 2012 May 16;9(3):193–4.
127. Jost S, Reardon J, Peterson E, Poole D, Bosch R, Alter G, et al. Expansion of 2B4+ natural killer (NK) cells and decrease in NKp46+ NK cells in response to influenza. *Immunology.* 2011 Apr;132(4):516–26.
128. Macedo AB, Lvinger C, Nguyen BN, Richard J, Gupta M, Cruz CRY, et al. The HIV Latency Reversal Agent HODHBt Enhances NK Cell Effector and Memory-Like Functions by Increasing Interleukin-15-Mediated STAT Activation. *J Virol.* 2022 Aug 10;96(15):e0037222.

129. Meyer G, Siemes AR, Kühne JF, Bevzenko I, Baszczok V, Keil J, et al. HCMV Variants Expressing ULBP2 Enhance the Function of Human NK Cells via its Receptor NKG2D. *Eur J Immunol.* 2025 Feb 11;55(2).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Edgar Iván Montes Zapata

**Candidato para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con Orientación
en Inmunología Médica**

Título de tesis: Desarrollo de células NK de tipo memoria específicas de la nucleoproteína para el control de la infección por el virus de influenza A H1N1pdm09

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Ciudad Victoria, Tamaulipas, México el 04 de junio de 1990, hijo de Jesús Ignacio Montes Quezada y María Luisa Zapata Álvarez.

Educación:

Químico Clínico Biólogo, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. 2013.

Maestría en Educación, Universidad Tecmilenio campus Las Torres. 2021.