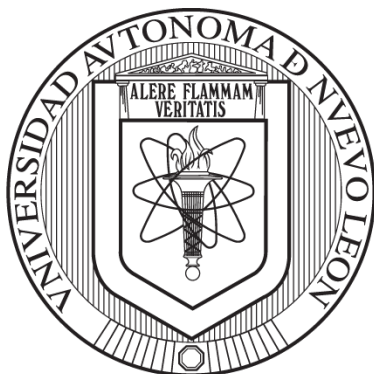


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN EL
INMUNOFENOTIPO Y LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK DE TIPO
MEMORIA ESPECÍFICAS PARA LA NUCLEOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA
INFLUENZA A H1N1 pdm09.**

Por:

Q.C.B. FERNANDA MICHELLE VELARDE ROCHA

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

Junio, 2026

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN EL
INMUNOFENOTIPO Y LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK DE TIPO
MEMORIA ESPECÍFICAS PARA LA NUCLEOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA
INFLUENZA A H1N1 pdm09.**

Aprobación de la Tesis



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Director



Dr. Mario César Salinas Carmona

Co-director



Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona

Comisión de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN EL
INMUNOFENOTIPO Y LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK DE TIPO
MEMORIA ESPECÍFICAS PARA LA NUCLEOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA
INFLUENZA A H1N1 pdm09.**

Presentado por:

Q.C.B. Fernanda Michelle Velarde Rocha

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: IN25-00003.



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Director



Dr. Mario César Salinas Carmona

Co-director



**Dra. C. María de los Ángeles
Castro Corona**

Comisión de Tesis

DEDICATORIA

A mi madre y colega, Dinorah

Por su apoyo incondicional en cada aspecto de mi vida y por impulsar constantemente mi desarrollo personal y profesional.

Por ser un gran ejemplo de disciplina, responsabilidad y honestidad, valores que han guiado mi camino y han sido fundamentales en la culminación de esta etapa.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Adrián Rosas por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, así como por su enseñanza, asesoría y guía a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Marlene Perales por su orientación durante mi formación académica, especialmente en la elección de la maestría.

Al Mario César Salinas y la Dra. María de los Ángeles Castro por sus valiosos consejos y retroalimentación durante el desarrollo de este proyecto.

A los profesores del Servicio de Inmunología por cada una de las clases impartidas, el conocimiento transmitido y los consejos que me ayudaron mi formación profesional.

A la Q.C.B. Azalia Martínez por su apoyo durante el proceso experimental y su ánimo ante cada dificultad.

Al M.C. Edgar Montes, M.C. Luis Carlos Ruelas, por su apoyo a lo largo de la maestría, especialmente por compartir sus conocimientos en técnicas de laboratorio y redacción científica.

A mis compañeros de posgrado, Emilio y Rolando, por su acompañamiento durante esta etapa, por su disposición para escucharme y por su ayuda en la resolución de los desafíos presentados.

A la convocatoria de PROACTI Fase I y Fase II por brindar el apoyo financiero que hizo posible la realización de este proyecto.

Por último, agradezco al Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada durante dos años de estudio en el programa de Maestría en Ciencias (CVU/Becario 1244401).

RESUMEN

Q.C.B. Fernanda Michelle Velarde Rocha Fecha de titulación:
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título de estudio: Análisis del efecto de la criopreservación en el inmunofenotipo y la funcionalidad de las células NK de tipo memoria específicas para la nucleoproteína del virus de la influenza A H1N1 pdm09.

Número de páginas: 94

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

Área de estudio: Inmunología

Propósito y diseño del estudio: La criopreservación es fundamental para la investigación biomédica y recientemente, ha impulsado el desarrollo de terapias celulares. El propósito de este estudio fue analizar el efecto de la criopreservación sobre el fenotipo y la funcionalidad de las células NK de tipo memoria específicas de la NP del VIA. Las células NK fueron estimuladas con péptidos de la NP, posteriormente criopreservadas, y se analizó su fenotipo mediante citometría de flujo, así como su actividad antiviral en cultivos de células A549 infectadas, se evaluó la liberación de proteínas, la citotoxicidad y el título viral.

Contribución y conclusión: La criopreservación no afectó la viabilidad celular ($p = 0.6868$), la proporción de las subpoblaciones de CD56^{bright/dim} ($p > 0.05$), la expresión de NKG2C ($p > 0.05$) y la producción IFN- γ ($p > 0.05$). Por otro lado, la criopreservación incremento la expresión de NKp46 ($p = 0.0026$) y LAMP-1 ($p = 0.0232$), acompañado de una disminución intracelular ($p = 0.0021$) y extracelular ($p < 0.05$) de granzima B. La actividad citotóxica se redujo en un 39.87 % ($p < 0.0393$) sin cambios significativos en el título viral ($p < 0.05$). En conclusión, la criopreservación afecta la activación y la citotoxicidad de las células NK de tipo memoria específicas de la NP de VIA.

FIRMA DIRECTOR TESIS



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
RESUMEN	VI
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Criopreservación	1
1.2 Células NK	8
CAPITULO 2	16
ANTECEDENTES	16
2.1 Criopreservación de células del sistema inmune	16
2.2 Células NK de tipo memoria.....	18
2.3 Estudios clínicos de terapia celular	20
CAPÍTULO 3	21
JUSTIFICACIÓN	21
CAPÍTULO 4	22
HIPÓTESIS	22
CAPITULO 5	23
OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos específicos	23
CAPITULO 6	24
METODOLOGÍA	24

6.1 Desarrollo de células NK de tipo memoria	24
6.2 Criopreservación	28
6.3 Fenotipificación	29
6.4 Ensayos de funcionalidad	30
6.5 Análisis estadístico	34
CAPITULO 7	35
RESULTADOS.....	35
7.1 Características de los sujetos de estudio.....	35
7.2 Viabilidad de las células posterior a la criopreservación.....	36
7.3 La criopreservación mantiene el fenotipo de tipo memoria inducido por la NP y activa las células NK.....	38
7.4 La criopreservación disminuye la concentración de Granzima B en los sobrenadantes de los co-cultivos.	44
7.5 La expresión de LAMP-1 esta correlacionado con los niveles de Granzima B	46
7.7 La criopreservación disminuye la citotoxicidad celular	48
7.8 La criopreservación aumenta el titulo viral	49
CAPITULO 8	53
DISCUSIÓN.....	53
CAPITULO 9	61
CONCLUSIÓN.....	61
CAPÍTULO 10	62
PERPECTIVAS.....	62
REFERENCIAS.....	63
PRODUCCIÓN ACADÉMICA	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Agentes crioprotectores usados para la criopreservación.....	28
Tabla 2. Medios crioprotectores probados para la criopreservación.....	28
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.	30
Tabla 4. Grupos de estudio para ensayo de citotoxicidad (NA: No Aplica).....	32
Tabla 5. Grupos de estudio para ensayos de funcionalidad (NA: No Aplica).....	33
Tabla 6. Estrategia de pruebas estadísticas.	34
Tabla 7. Características de los sujetos (F: Femenino, M: Masculino).....	35
Tabla 8. Características y resultados de los ensayos preliminares.	36
Tabla 9. Límites de cuantificación de las proteínas.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posibles mecanismos de daño celular durante la criopreservación.....	2
Figura 2. Mecanismos de los CPA penetrantes y no penetrantes	4
Figura 3. Representación de los subconjuntos de células NK y de los mecanismos de inmunomodulación y citotoxicidad mediados por células NK	8
Figura 4. Terapia antitumoral con células NK.....	12
Figura 5. Cámara de Neubauer	26
Figura 6. Viabilidad de células NK previo y posterior a su criopreservación.	37
Figura 7. Estrategia de análisis de fenotipo de células NK.	38
Figura 8. Subpoblaciones de las células NK previo y posterior a su criopreservación.	39
Figura 9. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56 ^{dim} estimuladas con nucleoproteína y sin estimular, previo y posterior a su criopreservación	42
Figura 10. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56 ^{bright} estimuladas con nucleoproteína y sin estimular, previo y posterior a su criopreservación	43
Figura 11. Curvas de calibración estándar y ecuaciones de la recta	44
Figura 12. Secreción de granzima B de células NK en los sobrenadantes de los co-cultivos contra células infectadas con VIA A549, previo y posterior a su criopreservación..	46
Figura 13. Correlación de la expresión de LAMP-1 con la expresión de granzima B intracelular y secreción de granzima B (extracelular) en las células NK criopreservadas.....	47
Figura 14. Imágenes representativas del ensayo de citotoxicidad.....	48
Figura 15. Porcentaje de citotoxicidad de células NK frente a células A549 infectadas con VIA previo y posterior a su criopreservación.....	49
Figura 16. Imágenes representativas de la monocapa celular infectada con stock viral y el control.....	50

Figura 17. Imágenes representativas de la monocapa celular a las 72 horas posterior a la infección con los sobrenadantes de los co-cultivos de las células NK criopreservadas.....51

Figura 18. Título viral de sobrenadantes de los co-cultivos de las células NK, previo y posterior a su criopreservación, contra células infectadas con VIA A54952

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADCC:** Del inglés “Antibody-dependent cell cytotoxicity”
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ATCC:** Del inglés “American Type Culture Collection”
- BSA:** Del inglés “Bovine Serum Albumin”
- CAR-NK:** Del inglés “Chimeric Antigen Receptor-Natural Killer cell”
- CAR-T:** Del inglés “Chimeric Antigen Receptor-T cell”
- CIML:** Del inglés “Cytokine-Induced Memory-Like”
- CMV:** Citomegalovirus
- CPA:** Agentes crioprotectores
- CO₂:** Dióxido de carbono
- DC:** Del inglés “Dendritic cells”
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EICH:** Enfermedad injerto contra hospedero
- ELISA:** Del inglés “Enzyme-linked immunosorbent assay”
- EMEM:** Del inglés “Eagle’s minimum essential medium”
- F12K:** Del inglés “Kaighn’s modification of Ham’s F-12 Medium”
- FDA:** Del inglés “Food and Drug Administration”
- HA:** Hemaglutinina
- HCMV:** Citomegalovirus humano
- HES:** Hidroxietilalmidón
- HLA:** Antígeno leucocitario humano
- IFN- γ :** Del inglés “Interferon- gamma”
- IL:** Interleucina
- IVGM:** Del inglés “Influenza Virus Growth Medium”
- KIR:** Del inglés “Killer Immunoglobulin-like Receptors”
- LAMP-1:** Del inglés “Lysosome Associated Membrane Protein-1”
- LMA:** Leucemia mieloide aguda

MCP: Medio crioprotector

MDCK: Del inglés “Madin-Darby Canine Kidney”

MHC: Del inglés “Major Histocompatibility Complex”

MOI: Del inglés “Multiplicity Of Infection”

MTT: Del inglés “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”

NA: Neuraminidasa

NCR: Receptores naturales de citotoxicidad

NK: Del inglés “Natural Killer”

NP: Nucleoproteína

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Del inglés “Phosphate-Buffered Saline”

Pdm09: Del inglés “Pandemic Disease Mexico 2009”

RPMI: Del inglés “Roswell Park Memorial Institute”

SARS-CoV-2: Del inglés “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2”

SCU: Sangre de cordón umbilical

SFB: Suero fetal bovino

SLC: Síndrome de liberación de citocinas

SP: Sangre periférica

TCID50: Del inglés “Fifty-percent Tissue Culture Infectious Dose”

TNF- α : Del inglés “Tumor Necrosis Factor Alpha”

TRAIL: Del inglés “Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand”

VIA: Virus de la influenza A

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Criopreservación

La criopreservación es un proceso que permite almacenar células, tejidos y órganos vivos a temperaturas extremadamente bajas, con el fin de preservar su funcionalidad durante largos periodos de tiempo (1). Este proceso es fundamental para la investigación, así como para las ciencias biomédicas y alimentarias (2). Como es la conservación de semillas (Bóveda Svalbard) (3), el almacenamiento rutinario de líneas celulares (4), almacenamiento de ovocitos, espermatozoides, cigotos en clínicas de fertilidad (5), así como la conservación de productos para terapias celulares, trasplantes (2) y mantenimiento de cadenas de frío para vacunas de ARN mensajero (6).

Los sistemas de almacenamiento se clasifican de acuerdo con el rango de temperatura: congeladores convencionales (-20°C a -50°C) ultracongeladores (-50°C a -86°C) y congeladores criogénicos (por debajo de -100°C) (7). En este último grupo, el más utilizado es el tanque de nitrógeno líquido, el cual tiene dos fases, la de vapor (-150°C) y la líquida (-196°C) (8).

A temperaturas criogénicas (inferiores a -130°C), la energía cinética de las reacciones químicas, biológicas y moleculares se reduce drásticamente, deteniendo por completo la actividad metabólica (9). En estas condiciones, el material biológico entra y permanece en un estado de suspensión metabólica. Los efectos adversos originados durante los procesos de congelación y descongelación pueden también ser los responsables del daño inducido por la criopreservación (8,10).

1.1.1 Mecanismos de daño

Los mecanismos de daño asociados a la criopreservación, pueden clasificarse en tres categorías: físicos, derivados de la formación de hielo; químicos, relacionados con la toxicidad de compuestos crioprotectores y bioquímicos inducidos por la exposición a bajas temperaturas (11). En la figura 1, se esquematizan los posibles mecanismos de daño celular durante la criopreservación.

Debido al elevado contenido de agua de las células, se forman cristales de hielo tanto en espacios intracelulares como extracelulares, generando múltiples alteraciones interconectadas durante el proceso de congelamiento, como en el descongelamiento (8).

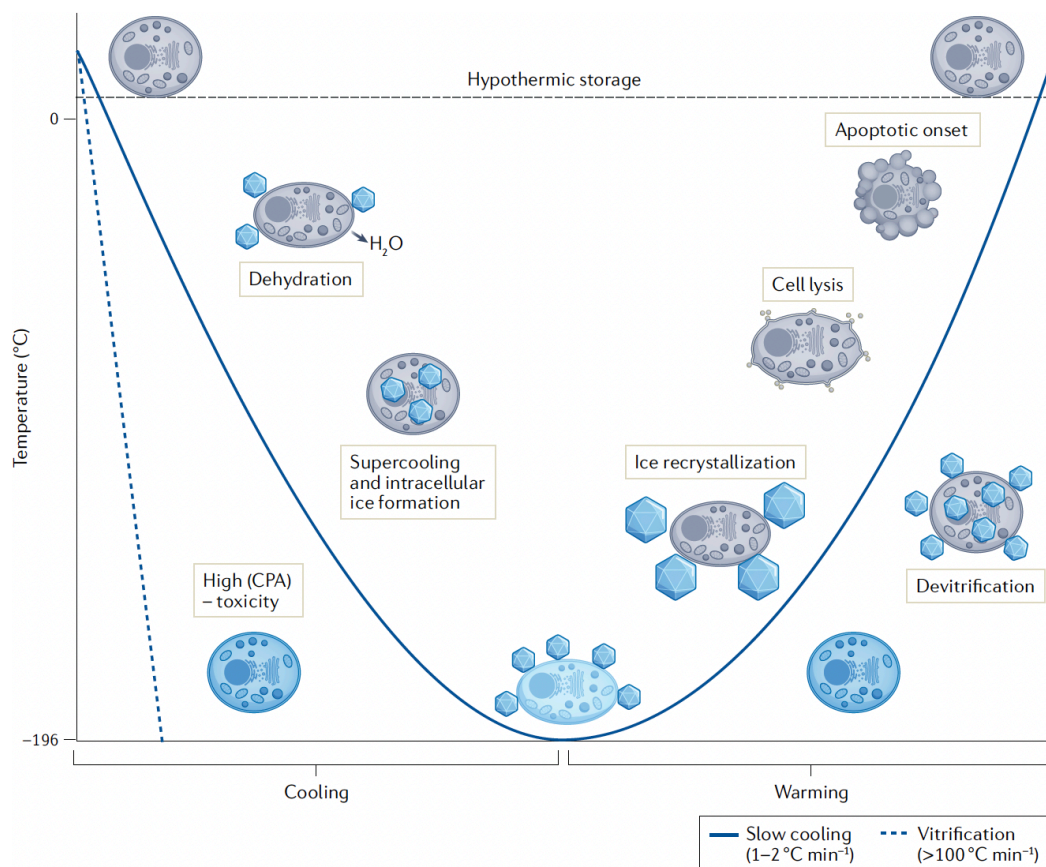


Figura 1. Posibles mecanismos de daño celular durante la criopreservación
Nota: Imagen adaptada de Murray, K. & Gibson, M. Chemical approaches to cryopreservation, Nature Reviews Chemistry, publicado en 2022 (10).

Durante la congelación, la velocidad de enfriamiento es una variable crítica con efectos opuestos, explicados por la hipótesis de dos factores de Mazur (12).

Un enfriamiento lento ($<1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) permite la deshidratación celular que evita la formación de cristales de hielo intracelular. Sin embargo, el aumento de la concentración de solutos genera un ambiente hipertónico que podría conducir a una deshidratación grave e irreversible, acompañada de estrés osmótico. Estos cambios afectan la integridad de la membrana plasmática, el citoesqueleto y en consecuencia la funcionalidad celular (8,10).

Por el contrario, un enfriamiento rápido ($>100^{\circ}\text{C}/\text{min}$) impide una deshidratación adecuada y retrasa la nucleación de hielo extracelular. Cuando finalmente ocurre la nucleación, se libera calor, elevando transitoriamente la temperatura de la solución hasta el punto de fusión, favoreciendo la formación de cristales de hielo intracelulares (8,10,13,14). Para minimizar estos riesgos, se requiere un equilibrio entre estos dos extremos y una velocidad de enfriamiento óptima, la cual difiere entre los tipos de células (12). En el caso de las células del sistema inmune, la determinación exacta ha sido complicada, no obstante la tasa de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ es la más utilizada (8).

Durante el calentamiento el hielo intracelular y extracelular formado puede recrystalizarse (maduración de Ostwald), generando daño mecánico y estrés osmótico. Además, la rápida entrada de agua a células previamente deshidratadas puede provocar edema excesivo y lisis celular (10). Si el calentamiento es muy rápido, el hielo extracelular se derrite antes de inducir la entrada controlada de agua, lo que también genera desequilibrio osmótico (12).

Para mitigar estos mecanismos de daño, se emplean sustancias químicas especiales para reducir la formación de hielo y estabilizar estructuras celulares. No obstante, estos compuestos a pesar de ser beneficiosos también son tóxicos, especialmente en protocolos de enfriamiento lento donde se prolonga el tiempo de exposición (11).

1.1.2 Agentes crioprotectores

Los agentes crioprotectores (CPA) son sustancias empleadas para reducir el daño causado por el proceso de criopreservación. Se han descrito al menos 56 compuestos con actividad crioprotectora en diversos sistemas celulares. Para facilitar su comprensión y aplicación, los CPA se clasifican en penetrantes y no penetrantes, según su capacidad de ingresar a la célula o permanecer en el espacio extracelular y cada grupo se subdivide a su vez según su estructura química (5), figura 2.

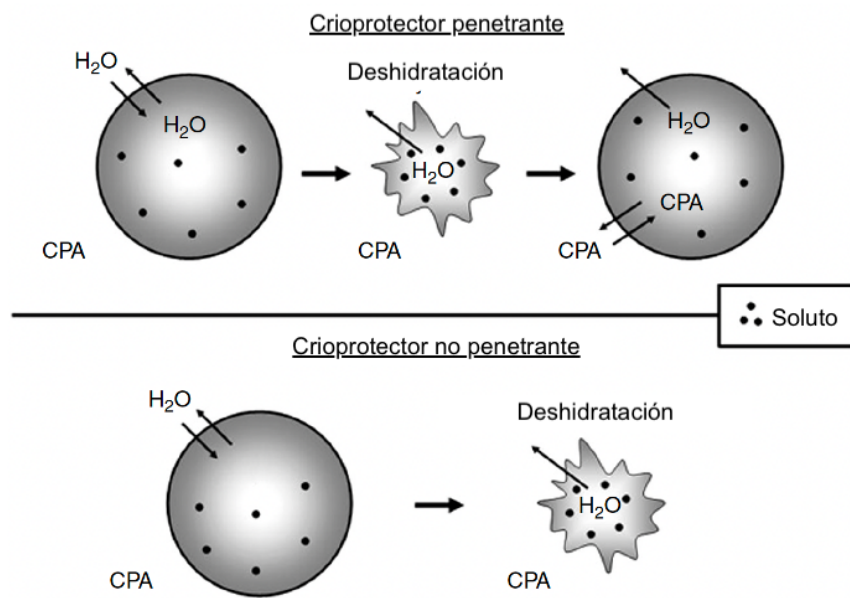


Figura 2. Mecanismos de los CPA penetrantes y no penetrantes. Nota: imagen adaptada de Swain & Smith, *Fertility Cryopreservation* (pp. 24–38). Capítulo 4, publicado en 2010 (5).

Los CPA penetrantes (permeables) son moléculas pequeñas, no iónicas e hidrosolubles que pueden difundirse a través de las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, reemplazan el agua intracelular, disminuyen la formación de cristales de hielo y mitigan el estrés osmótico asociado a la concentración de solutos (5). Ejemplos de ellos son los sulfóxidos, amidas, alcoholes y glicoles, el más utilizado es el dimetilsulfóxido (DMSO), seguido del propilenglicol y etilenglicol (1).

Los CPA no penetrantes son moléculas de mayor tamaño que permanecen en el espacio extracelular. Su función principal es aumentar la osmolaridad del medio, promueven la salida de agua de la célula y reducen la probabilidad de formación de hielo intracelular. Algunos también pueden adsorberse en las superficies de la membrana e inhiben la formación de hielo en áreas cercanas a la célula. También se emplean durante la descongelación para amortiguar el choque osmótico asociado a la rehidratación celular (5). Este grupo incluye azúcares, macromoléculas y polímeros, donde hidroxietilalmidón (HES), el dextrano, suero, proteínas y el polietilenglicol son los más utilizados (10).

A pesar de sus beneficios, los CPA pueden causar problemas de toxicidad, especialmente los penetrantes como el DMSO (9,10). Los efectos tóxicos pueden incluir la disrupción del huso meiótico, la desestabilización del citoesqueleto, la expresión alterada de proteínas, cambios epigenéticos, algunos de ellos irreversibles (15). La magnitud del daño depende de varios factores como son la concentración, el tiempo de exposición y la temperatura: valores elevados de estas variables generalmente incrementan el riesgo de daño, aunque la relación no siempre es lineal. Es importante distinguir cuidadosamente si las alteraciones celulares provienen del proceso de congelación-descongelación o por el CPA (5).

Las estrategias más eficaces recomiendan combinar múltiples CPA, tanto penetrantes como no penetrantes, en concentraciones menores a las usadas de forma individual, lo cual permite mantener la eficacia global y reducir el efecto tóxico. Asimismo, la adición y eliminación gradual de CPA durante la carga y la descongelación ayuda a minimizar el choque osmótico (5). El éxito en la criopreservación depende de la selección específica de los CPA para cada tipo celular y de un control de las condiciones durante todo el proceso (1,10).

1.1.3. Protocolo estándar para criopreservación de productos para terapia celular.

En el caso de inmunoterapias basadas en células, el proceso de fabricación comprende varias etapas: aislamiento celular, expansión y/o modificación, criopreservación y transporte del producto final. El éxito de la criopreservación depende de 5 factores: (i) formulación del medio criopreservante, (ii) velocidad de enfriamiento, (iii) condiciones de almacenamiento, (iv) condiciones de descongelación y (v) procesamiento posterior a la descongelación (16).

La formulación del medio criopreservante incluye una mezcla de CPA tanto penetrantes como no penetrantes (5). El DMSO continúa siendo el más utilizado a pesar de los riesgos asociados tanto para las células como para el paciente. En las células, puede inducir estrés osmótico y toxicidad directa, dichos efectos aumentan con la concentración y la duración de la exposición (17), por eso es el último en adicionarse antes de proceder al congelamiento. Para contrarrestar los efectos adversos, se incorporan CPA de tipo no penetrantes. El plasma humano y el suero fetal bovino (SFB), se utilizan en la criopreservación de células inmunitarias, debido a su posible acción antioxidante, atribuida a la presencia de transferrina, la cual secuestra hierro e inhibe la formación de radicales de oxígeno (18). Asimismo, pueden añadirse soluciones con múltiples osmolitos, estabilizadores de membrana y/o proteínas, e inhibidores de apoptosis (8).

La velocidad de enfriamiento debe adaptarse a cada tipo de producto biológico. Para ello, se pueden usar congeladores de velocidad controlada o dispositivos como el Mr. Frosty (19), el cual permite una tasa de enfriamiento ideal para las células del sistema inmune de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (8). Es fundamental mantener el enfriamiento controlado cercana a -50°C durante máximo 24 horas antes del almacenamiento definitivo a -150°C . La omisión de este paso intermedio se ha asociado con una pérdida significativa de viabilidad celular (20). Una vez congelados, los productos pueden almacenarse durante periodos que van desde días hasta décadas a temperaturas inferiores a -150°C , con la fase de vapor del nitrógeno líquido.

Para la descongelación, la práctica clínica habitual consiste en sumergir los productos congelados en un baño de agua a 37°C (16). Sin embargo, se han desarrollado dispositivos de descongelación controlada como alternativa. La velocidad óptima de descongelación depende de la velocidad de enfriamiento utilizada; no obstante evidencia reciente sugiere que la velocidad de calentamiento es menos crítica a las expuestas a enfriamiento lento, como es habitual para células inmunes (19).

Posterior a la descongelación, las células pueden someterse a diversas manipulaciones antes de su administración, estas variaciones influyen directamente en lo que finalmente recibe el paciente (8,20). Una práctica frecuente es la infusión inmediata sin manipulación adicional, lo que expone al paciente a los CPA utilizados, especialmente el DMSO, capaz de causar efectos adversos gastrointestinales, neurológicos, alérgicos e incluso convulsiones (17). Las directrices de la Agencia Europea de Medicamentos, recomiendan garantizar que la concentración final de DMSO administrada sea menos del 1 % del volumen plasmático humano (21), por tal motivo los medios criopreservantes suelen contener un máximo de 10% de DMSO.

Otra estrategia consiste en el lavado posterior a la descongelación para eliminar de manera activa los CPA. Los medios de criopreservación son hipertónicos, es por ello la importancia de las soluciones de lavado, las cuales deben formularse cuidadosamente para controlar el estrés osmótico, ya que en esta etapa las células son más vulnerables a la expansión de la membrana celular. En algunos protocolos se opta volver a cultivar células para permitir la recuperación de la viabilidad o funcionalidad antes de la infusión (19). La elección del método de procesamiento posterior a la descongelación depende de la naturaleza del producto final infundido al paciente.

1.2 Células NK

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos granulares del sistema inmune innato, representan entre el 5-10% de los linfocitos circulantes (22) y una vida media de 15 días (23). Su función principal es la defensa del hospedero frente a células tumorales y patógenos virales mediante su actividad citotóxica (24). Fenotípicamente, se caracterizan por la expresión del marcador CD56 y la ausencia de CD3, lo que permite distinguir las de los linfocitos (25).

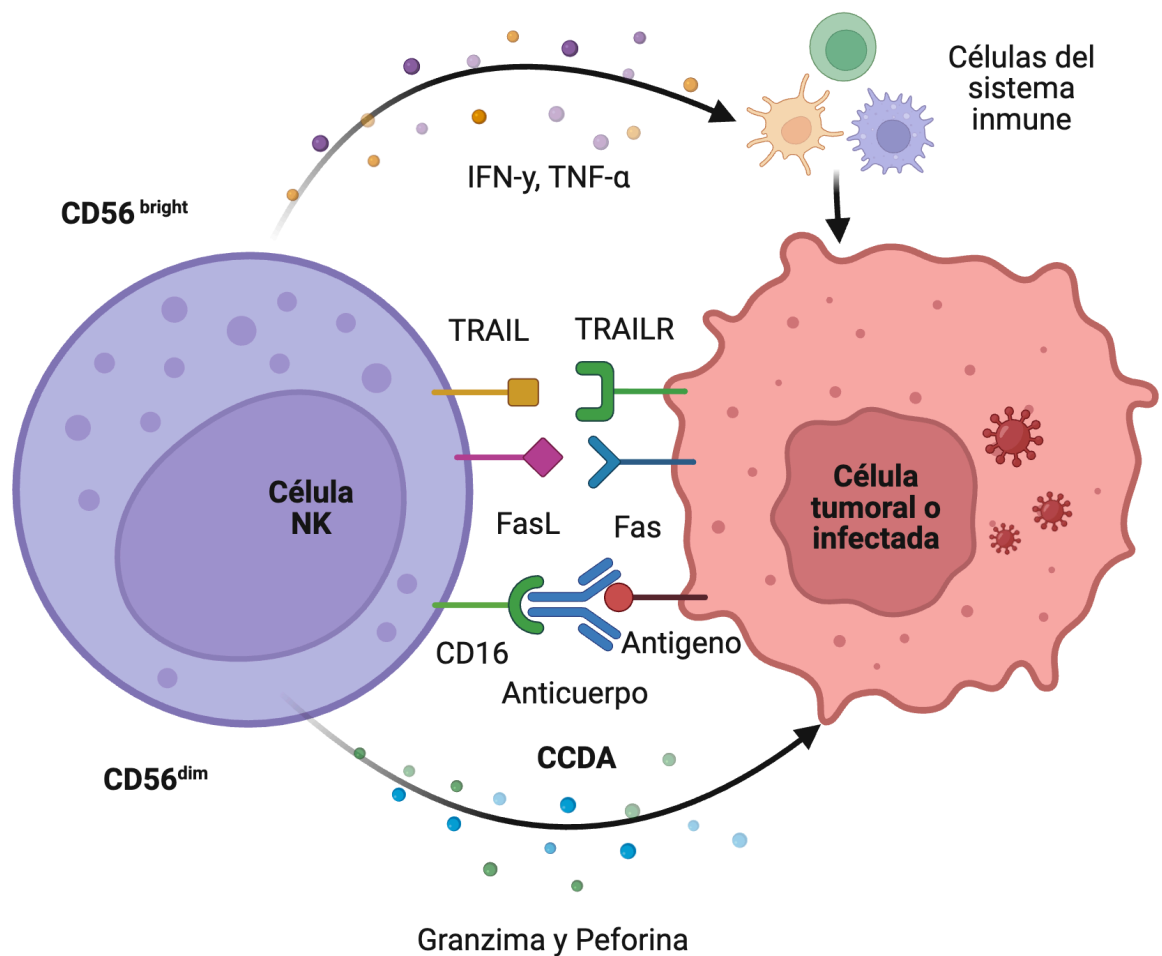


Figura 3. Representación de los subconjuntos de células NK y sus mecanismos de inmunomodulación y citotoxicidad (Imagen creada en BioRender.com) (25).

En función a su nivel de expresión de CD56, se distinguen dos subpoblaciones (células CD56^{bright} y células CD56^{dim}), figura 3. Las células CD56^{bright} presentan una alta expresión de CD56 y se localizan predominantemente en ganglios linfáticos, donde desempeñan un papel inmunomodulador, produciendo grandes cantidades de citocinas (IFN- γ , TNF- α), así como quimiocinas para el reclutamiento y modulación de otras células del sistema inmune (24,25). Estas células expresan receptores de alta afinidad para la IL-2 y el receptor c-kit, lo que les permite proliferar de manera robusta en respuesta a concentraciones bajas de IL-2 (26).

Por otro lado, las células CD56^{dim} constituyen la subpoblación predominante en sangre periférica (SP), muestran baja expresión de CD56 y alta expresión de CD16 (Fc γ RIII), lo que les confiere una marcada capacidad citotóxica, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la liberación de gránulos citotóxicos (25,27). Estas células representan un estado de mayor madurez y expresan niveles superiores de receptores inhibidores (26).

La activación de las células NK está regulada por un equilibrio entre receptores activadores e inhibidores (25). Entre los receptores activadores se encuentran NKG2D y los receptores naturales de citotoxicidad (NCR), que comprenden NKp46, NKp44 y NKp30. Por otro lado, los receptores inhibidores incluyen a los receptores tipo inmunoglobulina (KIR) y el heterodímero CD94/NKG2A. Ambos tipos de receptores reconocen ligandos del MHC-I en células diana (24,28).

En la homeóstasis, los receptores inhibidores reconocen moléculas propias del MHC-I y previenen la activación de las células NK. Las células infectadas o transformadas regulan negativamente la expresión del MHC-I (24), una estrategia empleada para evadir a los linfocitos T citotóxicos (29). La pérdida de esta señal inhibitoria en dichas células conduce a susceptibilidad a la eliminación mediada por células NK, fenómeno conocido como “missing-self” (30).

Una vez activadas, las células NK pueden eliminar células diana mediante distintos mecanismos (24), como se resume en la figura 3. Particularmente la subpoblación CD56^{dim} ejerce citotoxicidad directa a través de la exocitosis de

gránulos citotóxicos que contienen perforina, esta forma poros en la membrana de la célula diana, mientras las granzimas ingresan a través de dichos poros e inducen la apoptosis dependiente de caspasas (31). Asimismo, estas células median la ADCC a través de la expresión de CD16, que se une a la región Fc de los anticuerpos IgG, promoviendo la eliminación de la célula diana (25). Por su parte, la subpoblación CD56^{bright} ejerce una citotoxicidad predominantemente indirecta liberando un amplio repertorio de citocinas con propiedades antivirales (IFN- γ), proinflamatorias (TNF- α) e inmunorreguladoras, las cuales modulan tanto la respuestas innata como la adaptativa (28). Finalmente, ambas subpoblaciones pueden inducir la apoptosis por medio de receptores de muerte celular como FasL y TRAIL(32).

1.2.1 Respuesta Inmune de células NK contra el virus de la influenza

El virus de la influenza A (VIA) es un virus envuelto de ARN monocatenario de polaridad negativa perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. En su superficie presenta dos glucoproteínas esenciales para el ciclo replicativo (33). La hemaglutinina (HA) media la entrada viral al unirse al ácido siálico (α -2,3 y/o α -2,6), presentes en las células epiteliales del tracto respiratorio (27,34). Mientras la neuraminidasa (NA), escinde el ácido siálico tras la replicación, facilitando la liberación de nuevos viriones (27,33).

Durante la infección por el VIA, las células NK son reclutadas mediante quimiocinas secretadas por las células infectadas (34). El reconocimiento de células infectadas por VIA depende de la interacción del receptor activador NKp46 con la HA (22,27), la cual esta mediada por residuos de ácido siálico presentes en NKp46. En el caso de cepas H1 las secuencias de O-glicano tri-ramificados en el sitio de glicosilación del receptor son indispensables para el reconocimiento (35).

A pesar de la función antiviral de las células NK, el VIA emplea múltiples estrategias de evasión, entre ellas, la rápida mutación de HA, con la adquisición de nuevos sitios de glicosilación lo que reduce la afinidad por la NKp46 dificultando su reconocimiento (34). Adicionalmente, como NKp46 y NKp44

contienen residuos de ácido siálico (27), la NA puede escindir estos residuos y disminuir directamente la unión de las células NK a la HA (22). Incluso, el virus puede ingresar a las células NK mediante endocitosis dependiente de clatrina y caveolina, que utilizan los mismos receptores de ácido siálico. Aunque la replicación viral en las células NK es abortiva, la infección induce apoptosis y reduce su capacidad citotóxica (24,27).

La alta tasa de mutación HA y NA ha contribuido a la aparición de epidemias y pandemias de influenza (22,36). En contraste, la nucleoproteína (NP) del VIA esta altamente conservada entre subtipos y cepas (37), además que durante la infección, la NP se expresa en la superficie celular (38), convirtiéndola en un blanco potencial para el desarrollo de inmunoterapias.

1.2.2 Terapia con células NK

Las células NK representan una plataforma terapéutica con ventajas frente a otras terapias celulares ya que sus mecanismos efectores no dependen del MHC (39), lo que permite utilizar productos alogénicos sin compatibilidad HLA y sin riesgo de inducir la enfermedad de injerto contra hospedero (EICH) (40). También, muestran un perfil de seguridad superior a las terapias CAR-T (41), con menos eventos adversos, sin toxicidades limitantes de dosis y un perfil de citocinas menos proinflamatorio (42) reduciendo el riesgo de síndrome de liberación de citocinas (SLC) (39). Además, por su capacidad de mediar ADCC vía CD16, se potencia su actividad efectora cuando se combinan con anticuerpos monoclonales antitumorales (39,43). El proceso para desarrollar células NK para terapia comprende de tres etapas (Figura 4): 1) fuente celular, 2) expansión y producción, que incluye la criopreservación y 3) aplicación clínica (44).

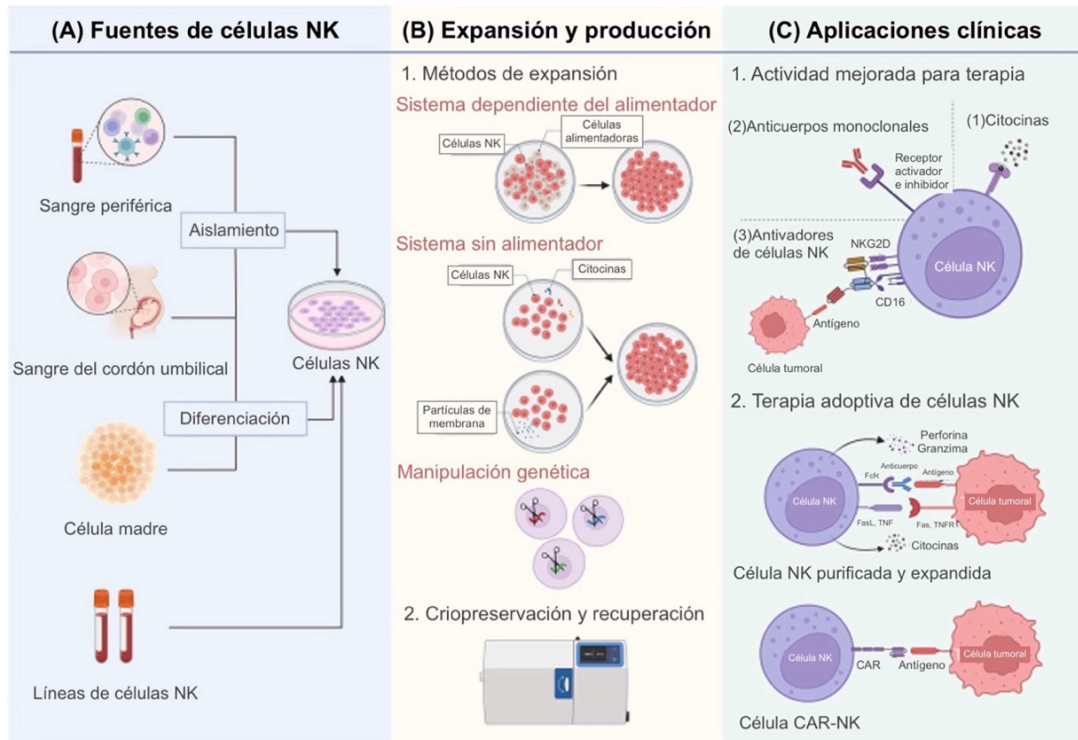


Figura 4. Terapia antitumoral con células NK: (A) fuentes de células NK, (B) Expansión y producción. (C) Aplicaciones clínicas. Nota: imagen adaptada de Zhao, X. et al. Current status and future perspective of natural killer cell therapy for cancer. Medical Review publicado en 2023 (44).

1.2.2.1 Fuentes de células NK

La eficacia clínica de las terapias con células NK depende de la fuente celular utilizada, ya que cada origen presenta un fenotipo, potencial de expansión y procesos de fabricación particulares. Actualmente, las principales fuentes con uso clínico son: sangre periférica (SP), sangre de cordón umbilical (SCU), líneas celulares de NK y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (39,40,43).

Las células NK de SP se componen principalmente del subgrupo $CD56^{dim} CD16^{+}$, con capacidad de llevar a cabo la ADCC, por lo tanto un fenotipo altamente citotóxico (40,42). Su aislamiento es relativamente sencillo y existe amplia experiencia clínica con productos derivados de SP. No obstante, presentan variabilidad entre donantes y menor una capacidad de expansión *ex vivo*

comparadas con otras fuentes (39,43). Las células NK de SCU, son una fuente alogénica alternativa con un fenotipo de células NK más inmaduro (CD56^{bright}). Aunque su citotoxicidad basal es menor, exhiben excelentes niveles de expansión *ex vivo* y alta susceptibilidad a la ingeniería genética (40,43).

Las líneas celulares de NK, especialmente NK-92 proporcionan expansión ilimitada y citotoxicidad intensa con un fenotipo homogéneo, facilitando así la estandarización de los lotes y la manufactura (43). Sin embargo, al derivar de un linfoma no Hodgkin, su uso clínico exige irradiación gamma previo a la infusión, limita su proliferación y persistencia *in vivo*, requiriendo dosis repetidas (34).

Las células NK derivadas de iPSC se obtienen mediante protocolos de diferenciación con células alimentadoras o citocinas, direccionando inicialmente a progenitores hematopoyéticos CD34⁺ y posteriormente a células NK funcionales (43). Su naturaleza monoclonal garantiza la consistencia entre lotes y proporciona una fuente ilimitada, genéticamente definida y con capacidad de modificación por ingeniería basada en CRISPR (40,41).

1.2.2.1 Expansión y producción

Para alcanzar dosis terapéuticas es necesario expandir las células NK *ex vivo*. Se han desarrollado dos métodos: dependiente e independiente de células alimentadoras (42,43).

Las estrategias con células alimentadoras emplean células K562 modificadas para expresar IL-21 unida a la membrana (mbIL-21) (42,45). Por cuestiones de seguridad se han impulsado alternativas libres de células, como las partículas de membrana PM21 derivadas de K562-mbIL-21, que mantienen una expansión eficiente sin el riesgo de contaminación celular (46,47).

Los sistemas sin células alimentadoras utilizan combinaciones de citocinas recombinantes (IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21) para impulsar la proliferación y activación de las células NK (43). Aunque la magnitud de expansión suele ser menor al de sistemas con células alimentadoras, este enfoque reduce la complejidad de manufactura y la carga regulatoria (39).

1.2.2.3 Estrategias para mejorar la inmunogenicidad

Las células NK enfrentan desafíos que limitan su aplicación terapéutica, como es la baja permanencia *in vivo*, la supresión por el microambiente tumoral o infeccioso y su actividad citotóxica insuficiente frente a determinadas dianas (40). Esto ha impulsado múltiples estrategias de optimización, entre ellas (39):

1. *Activación con citocinas*: la estimulación con citocinas se aplica *ex vivo* antes de la infusión como *in vivo*. Las citocinas de cadena γ y común (IL-2, IL-15, IL-7, IL-21), junto con la IL-12 e IL-18 se emplean para potenciar la expansión y funcionalidad (48), la IL-15 es la más relevante por su especificidad hacia las células NK (49).
2. *Bloqueo o eliminación de puntos de control inmunitarios*: los anticuerpos monoclonales y la modificación genética por CRISPR/Cas9 bloquean y eliminan receptores inhibidores de puntos de control (TIGIT, NKG2A, TIM-3, LAG-3, PD-1), inducidos por tumores o virus (39,44).
3. *Potenciación de ADCC y moléculas activadoras*: los anticuerpos monoclonales dirigidos a tumores reclutan células NK CD16⁺ para mediar ADCC (39). Por su parte, las moléculas activadoras de células NK vinculan simultáneamente sus receptores activadores y antígenos de las células diana, integrando señales tipo IL-15 para favorecer la proliferación de las células NK (40).
4. *Ingeniería genética*: La generación de células NK con receptores de antígeno quimérico (CAR-NK), ha permitido combinar la especificidad antigénica de un anticuerpo con la maquinaria citotóxica innata de la célula NK (39,44). Se han evaluado células CAR-NK dirigidas a neoplasias hematológicas (44) y epítomos virales conservados como la proteína Spike del SARS-CoV-2 y la envoltura del VIH (34).
5. *Inducción de respuestas tipo memoria en células NK*: Aunque la memoria inmunológica se consideraba exclusiva del sistema inmune adaptativo, se ha demostrado que las células NK pueden desarrollar una respuesta característica de memoria, denominada tipo memoria o memory-like (50). A

diferencia de la inmunidad entrenada, que implica una reprogramación epigenética inespecífica de células mieloide, las células NK de tipo memoria muestran una respuesta funcional mejorada antígeno-específica (51), con mayor desgranulación y producción de IFN- γ (52). La exposición de las células NK a un antígeno específico (citocinas, haptenos químicos o péptidos virales) induce una reprogramación epigenética y metabólica que les confiere una capacidad de respuesta aumentada ante el mismo estímulo. En infecciones virales, el eje NKG2C/NKG2A–HLA-E es clave para el establecimiento de esta memoria (34).

Dado que la manufactura de estos productos suele estar centralizada, la criopreservación es un paso necesario para su distribución. Sin embargo, los efectos de este proceso sobre distintos tipos celulares, incluyendo las células NK tipo memoria, siguen sin comprenderse completamente (40).

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Criopreservación de células del sistema inmune

En terapia celular los productos suelen obtenerse a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) criopreservadas, se ha evaluado el impacto de este proceso sobre el fenotipo y la funcionalidad de células del sistema inmune. Aunque la criopreservación reduce la viabilidad celular, se ha reportado que los linfocitos T son los más susceptibles al daño, por otro lado, los linfocitos B, las células NK y los monocitos muestran mayor estabilidad (23). Las tres principales poblaciones más utilizadas en terapias celulares son los linfocitos T, las células NK y las células dendríticas, y se ha descrito el efecto de la criopreservación en cada una de ellas (19).

Las células dendríticas (DC) constituyen las células presentadoras de antígenos más potentes del sistema inmunitario y se emplean en vacunas terapéuticas contra cáncer (53). Pueden obtenerse a partir de sangre de cordón umbilical, médula ósea o PBMC. El protocolo estándar de criopreservación utiliza DMSO entre 5–10% y congelación lenta a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La congelación de monocitos antes de su diferenciación a DC permite obtener una mayor viabilidad y mejor capacidad inmunoestimulante comparada con la congelación directa de DC inmaduras o maduras (53). En general, las DC derivadas de PBMC criopreservadas mantienen un fenotipo estable, expresan marcadores de maduración adecuados y secretan citocinas en niveles comparables a las derivadas de PBMC frescas (54,55).

En el caso de los linfocitos T, las células T reguladoras (Tregs) se emplean clínicamente en el tratamiento de EICH y enfermedades autoinmunes (56). Existen dos enfoques de criopreservación, ambos con el mismo protocolo básico (DMSO al 10% y congelación lenta a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$): (1) criopreservar PBMC y aislar las Tregs después de la descongelación, lo cual compromete su viabilidad,

función y fenotipo, dificultando su purificación posterior (57,58), y (2) criopreservar directamente las Tregs aisladas o expandidas, lo que mejora la recuperación celular, aunque una proporción importante entra en apoptosis (59).

Las células CAR-T son la terapia celular inmunitaria más desarrollada comercialmente, con seis productos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), todos distribuidos en forma criopreservada (8). El medio criopreservante estándar consiste en DMSO al 5-10 % combinado con albúmina sérica humana (HSA), además de dextrano y dextrosa (60). La equivalencia funcional entre células CAR-T frescas y criopreservadas es motivo de debate. Algunos estudios reportan expansión, eficiencia de transducción, porcentaje de células CD3+ y proporción CD4:CD8 comparables, otros describen reducciones significativas en la liberación de citocinas como IL-2, IFN- γ y TNF- α (61).

En contraste, las células NK son más vulnerables al daño inducido por la criopreservación en comparación con las DC y los linfocitos T, lo cual se considera una de las principales razones del fracaso clínico en diversos estudios con terapias basadas con células NK (62). Ninguno de los 14 productos de terapia celular aprobados derivados del sistema inmunitario corresponde a células NK (8). Aun cuando la criopreservación con 5–20% de DMSO permite obtener una viabilidad elevada (~90%) posterior a la descongelación, los efectos sobre la funcionalidad son inconsistentes. Algunos estudios reportan disminución en la expresión de receptores activadores como TRAIL y NKG2D (63), menor secreción de citocinas (64), y alteraciones en la migración (65). Otros trabajos, en contraste, no encuentran cambios significativos en el fenotipo (64), la función inmunomoduladora (47) o la cinética *in vivo* (66). El hallazgo más consistente entre todos los estudios es la disminución de la actividad citotóxica posterior a la descongelación. Se han propuesto diversas estrategias para restaurarla, incluida la adición de citocinas antes (67) o después (68) de la criopreservación, intervenciones que con frecuencia inducen un fenotipo de tipo memoria en las células NK.

2.2 Células NK de tipo memoria

La primera evidencia de memoria en células NK surgieron en modelos murinos de hipersensibilidad de contacto inducida por haptenos, donde ratones carentes de células T y B generaban respuestas de memoria medibles y detectables tras la re-exposición al mismo hapteno, con capacidad de discriminar entre haptenos distintos y con persistencia durante al menos cuatro semanas (69). Experimentos de transferencia adoptiva permitieron localizar esta memoria en el hígado, dependiendo del receptor de quimiocinas CXCR6 (70).

Las células NK con memoria inducida por citocinas (CIML), son generadas mediante una breve estimulación con las citocinas IL-12, IL-15 e IL-18, fueron descritas por primera vez en ratones (71), y posteriormente confirmado en células NK humanas (72). Estas células están caracterizadas por una respuesta de memoria inespecífica contra tumores. Fenotípicamente, las células NK CIML regulan positivamente CD25 (IL-2R α) expresando receptores para IL-2 de alta afinidad, mejorando su supervivencia, proliferación y funciones efectoras *in vivo* (73). Otros cambios incluyen la regulación positiva de CD94, NKG2A, NKp46, NKp30, perforina y granzima B (74). A nivel molecular, experimentan una reprogramación metabólica hacia la glucólisis, la cual llega a persistir durante al menos siete días (75). Epigenéticamente, se ha detectado la desmetilación de la región CNS1 en el locus *Ifng* tanto en células NK CIML murinas (76) como humanas (77), consistente con una producción estable y aumentada de IFN- γ .

En el contexto viral, la memoria de las células NK inducida por citomegalovirus (CMV) es el modelo mejor caracterizado tanto en ratones como en humanos. En ratón, las células NK que poseen el receptor activador Ly49H, que reconoce directamente la glicoproteína m157 (similar a la MHC- I) codificada por el CMV y expresada en las células infectadas, experimentan una expansión clonal (78) y alcanzan su máxima expansión alrededor del día 7 (79), seguida de una fase de contracción, y la posterior generación de memoria, confiriéndole una protección superior ante un segundo desafío (52,78,80).

En humanos, la infección por HCMV induce una expansión selectiva de las células NK NKG2C+, la contraparte de las células NK Ly49H+ murinas (81). Estas células reconocen péptidos derivados de UL40 asociados a HLA-E a través del complejo receptor NKG2C/CD94 (82). Metabólicamente, muestran una glucólisis y fosforilación oxidativa incrementada con respecto a células NK de individuos seronegativos (83). Incluso, individuos genéticamente deficientes en NKG2C pueden generar células NK de tipo memoria con modificaciones epigenéticas conservadas, sugiriendo la participación de receptores alternativos (84).

En influenza, la vacunación contra el virus aumentó las células NK CD56^{dim} circulantes, observándose una menor expresión de NKp46 y una mayor producción de IFN- γ tras la re-estimulación con influenza inactivada *in vitro* (85), este efecto fue observado desde el mes hasta tres meses post-vacunación (86). En modelos murinos, la infección con dos cepas distintas generó células NK de tipo memoria específicas para hemaglutinina (HA), con una producción aumentada de IFN- γ ante el antígeno homólogo; sin embargo, se observó pérdida del efecto citotóxico específico frente a la cepa usada como estímulo (87). Un estudio reciente demostró la participación del eje NKG2C/HLA-E en el reconocimiento de péptidos de la nucleoproteína (NP) del VIA principalmente el péptido TMDSNTLEL (88).

Como antecedente directo del presente trabajo, nuestro grupo de investigación generó células NK de tipo memoria específicas contra péptidos de la NP del VIA. Estas células mostraron un aumento significativo en la actividad citotóxica cuando se co-cultivaron con células A549 infectadas con el VIA, demostrando su funcionalidad y especificidad antiviral (89).

2.3 Estudios clínicos de terapia celular

La Universidad de Washington realizó la primera aplicación clínica de células NK CIML, en un ensayo fase I (NCT01898793) con pacientes con LMA y demostraron que con una única infusión de células NK activadas con IL-12, IL-15 e IL-18, se lograba remisiones completas en el 47% de los casos, con un perfil de seguridad notablemente superior al de terapias CAR-T (40).

El éxito observado en LMA impulsó el desarrollo de productos comerciales como WU-NK-101 de Wugen Inc, un producto alogénico de células NK, reprogramado con citocinas (IL-12, IL-15 e IL-18), expandido *ex vivo*, criopreservado y libre de células de soporte, que conserva las propiedades biológicas asociadas al fenotipo de tipo memoria y permite una manufactura escalable (90). Los datos preliminares del ensayo clínico de fase I (NCT05470140), evaluó a WU-NK-101 en LMA, observando inmunomodulación significativa en el microambiente de médula ósea lo que correlacionaba con la respuesta clínica (91,92). Los resultados favorables en neoplasias hematológicas extendieron el uso de células NK CIML a tumores sólidos. El Instituto de Cáncer Dana-Farber inició un ensayo de fase I (NCT04290546) para estudiar células NK CIML en combinación con el super-agonista de IL-15 (N-803) y el inhibidor de puntos de control inmunitario ipilimumab en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello recurrente con lo que se estableció la viabilidad y seguridad (93).

En la terapia antiviral, se reportó el primer estudio clínico de fase I que evaluó la factibilidad y seguridad de células NK de tipo memoria (NCT04578210). Las células se obtuvieron de donantes convalecientes de COVID-19, se expandieron *ex vivo*, se criopreservaron y se administraron a pacientes hospitalizados, donde cuatro de seis (66.6%) experimentaron una recuperación sostenida sin síntomas persistentes un año después del alta hospitalaria(94).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Las células NK de tipo memoria se han usado como herramienta terapéutica alternativa para diversos tipos de cánceres e infecciones virales, mostrando resultados alentadores.

La influenza es una enfermedad infectocontagiosa que produce epidemias y pandemias. En estos contextos algunos enfermos pueden desarrollar casos graves de neumonía.

Por lo tanto, en este trabajo se evaluará el efecto de la criopreservación sobre el inmunofenotipo y la funcionalidad de las células NK de tipo memoria específicas para la nucleoproteína del VIA para su aplicación.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

Las células NK de tipo memoria específicas para la NP del virus de influenza A H1N1pdm09 mantienen su inmunofenotipo y funcionalidad durante diversos tiempos de criopreservación.

CAPITULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la criopreservación sobre el inmunofenotipo y funcionalidad de las células NK de tipo memoria específicas para la NP del virus de influenza A H1N1pdm09.

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar el inmunofenotipo de células NK de tipo memoria específicas de la NP a diversos tiempos de criopreservación.
2. Determinar la función citotóxica de células NK de tipo memoria específicas de la NP criopreservadas en co-cultivo con células epiteliales A549 infectadas con el virus de influenza A H1N1pdm09.
3. Cuantificar la secreción de IFN- γ , TNF- α y granzima B de células NK de tipo memoria criopreservadas específicas de la NP en co-cultivo con células epiteliales A549 infectadas con el virus de influenza A H1N1pdm09.
4. Evaluar el efecto de la criopreservación sobre el título viral en los sobrenadantes de los co-cultivos de células NK de tipo memoria específicas de la NP.

CAPITULO 6

METODOLOGÍA

6.1 Desarrollo de células NK de tipo memoria

6.1.1 Población de estudio

Se incluyeron 11 donantes aparentemente sanos, una vez cumplidos los criterios de inclusión y exclusión, se obtuvo su consentimiento informado por escrito. 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 IN25-00003

6.1.1.1 Criterios de inclusión

- Voluntarios de 18-30 años sin importar sexo.
- Sin ninguna enfermedad aparente.
- Vacuna contra influenza con aplicación no mayor a 3 meses.
- Biometría hemática normal.
- Firma del consentimiento informado.

6.1.1.2 Criterios de exclusión

- Presencia de cualquier padecimiento crónico (Diabetes mellitus, Hipertensión,, Enfermedades autoinmunes, u otra enfermedad crónica).
- Síntomas gripales en las últimas 4 semanas.
- Internamiento tres meses previos por más de 48 h.
- Valores alterados de leucocitos.
- Mujeres embarazadas.

6.1.1.3 Criterios de eliminación

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

6.1.2 Aislamiento de células mononucleares

Se recolectó sangre total en 8 tubos con EDTA por punción venosa y se aislaron PBMC mediante gradiente de centrifugación trabajando en campana de flujo laminar.

El aislamiento se realizó diluyendo la sangre venosa periférica con PBS estéril con una relación 1:1. Posteriormente, la sangre diluida en PBS se colocó cuidadosamente en tubos cónicos de 50 mL que contenía Ficoll-Paque PLUS (cytiva) en relación 2:1. Se centrifugó a 1800 rpm por 30 minutos a 4°C. Se obtuvo la fase de mononucleares y se colocó en tubos cónicos de 15 mL para realizar 3 lavados a las células para eliminar el Ficoll remanente el cual es nocivo para las células y 3 lisis hipotónica de eritrocitos que se pudieron recuperar.

Los lavados se realizaron con 10 mL de PBS estéril, centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos decantando el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular formado en 1 mL de PBS estéril entre cada lavado. Los eritrocitos fueron lisados empleando 3 mL de agua estéril a 4°C incubando por 30 segundos para inmediatamente después agregar 3 mL de PBS 2X a 4°C para centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos obteniendo el botón celular. Finalmente, el botón celular obtenido se resuspendió en 1 mL de medio RPMI incompleto y realizar la cuenta celular con azul de tripano.

6.1.3 Conteo celular

Se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular y se mezcló 10 µL de esta con 90 µL de azul tripano en un tubo eppendorf de 200 µL. De esta solución se tomaron 10 µL y se colocaron en la cámara de Neubauer por capilaridad.

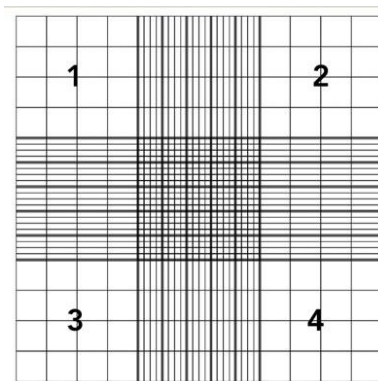


Figura 5. Cámara de Neubauer.

Para el conteo solo se tomaron en cuenta las células no teñidas con el colorante y se encuentran en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara, figura 5. El cálculo del número de células por mililitro se realizó siguiendo la ecuación 1.

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \left(\frac{\text{Total de células}}{4} \right) \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

Ecuación 1

6.1.4 Aislamiento de células NK

Las células NK fueron aisladas de las células mononucleares mediante selección negativa utilizando el kit de aislamiento de células NK humanas (Milteny Biotec). Se resuspendieron 1×10^6 PBMC en 40 μL de Buffer de NK, el cual consistía en 0.05% de EDTA y Albumina Sérica Bovina (BSA) en PBS 1X. Primero se adicionaron 10 μL del coctel de anticuerpos se homogenizo cuidadosamente y se incubo durante 5 minutos a 4°C en oscuridad, y posteriormente se adicionaron los 20 μL de perlas magnéticas de aislamiento y se incubo durante 10 minutos bajo las mismas condiciones descritas; para finalmente aforar a un volumen de total 500 μL con el Buffer de células NK. La suspensión celular se pasó por la columna, previamente hidratada con el Buffer de células NK, a fin de obtener a las células NK purificadas y contabilizarlas en la cámara de Neubauer.

6.1.5 Prueba de viabilidad y pureza

La pureza y viabilidad de las células NK aisladas se analizaron por citometría de flujo tiñendo 100,000 células con Simultest CD3 FITC/CD16+CD56 PE (BD) y 7-AAD (BD), respectivamente. Se adquirieron al menos 10,000 eventos de células individuales en un citómetro BD LSR Fortessa y fueron analizados empleando el software FACSDiva version 9.0.1.

6.1.6 Expansión de células NK

Las células NK se contaron con una cámara de Neubauer y se cultivaron a una densidad de 1.25×10^5 células/mL en medio CTS NK Xpander (gibco), suplementado con 5% de suero humano autólogo, IL-2 a una concentración de 500UI/mL (gibco), y IL-15 a 40 ng/mL (PeproTech) en un frasco de cultivo celular T-25 (Corning incorporated) y se mantuvieron en incubación durante 5 días a 37°C y 5% de CO₂. Al día 5, 8 y 11 se hicieron ajustes de la densidad celular cambiando el medio, siendo en el día 11 se disminuyó la concentración de IL-15 a 5 ng/mL para el mantenimiento de las células.

6.1.7 Estimulación con NP de VIA

En el día 14, se cultivaron las células NK a una densidad de 1×10^6 células/mL en medio RPMI completo, el cual esta suplementado con 10% de SFB y 1% de solución con antibióticos-antimicótico (10,000 U Penicilina, 10 mg Estreptomina y 25 mg/ml Anfotericina B) (Sigma-Aldrich) en frascos de cultivo celular T-75 (Corning incorporated).

Se realizaron dos grupos: 1) células NK solo con medio de cultivo sin péptidos de la nucleoproteína del VIA H1N1 y 2) células NK con medio y 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 RPMI completo para el desarrollo de células NK de tipo memoria.

6.2 Criopreservación

6.2.1 Congelación

Las células NK desarrolladas tanto las estimuladas con la NP como las que no se colocaron en un criovial con una densidad mínima de 1×10^6 células/mL donde se adicionó medio RPMI sin SFB y CPA, siendo el DMSO el último en adicionar gota a gota, para completar un volumen final de 1 mL por criovial. Los agentes y medios crioprotectores (MCP) junto con sus respectivas concentraciones utilizadas se resumen en la tabla 1 y 2.

Tabla 1. Agentes crioprotectores usados para la criopreservación.

CPA	Compañía	Concentración final
Dimetilsulfóxido (DMSO)	ATCC	10%
Albumina Humana	Grifols	2%
Anticoagulant citrate dextrose (ADC)	Terumo BCT	5%
Hydroxi Etyl Starch (HES)	PiSA	2.5%
SFB	Gibco	10%

Tabla 2. Medios crioprotectores probados para la criopreservación.

MCP	Contenido
1	DMSO y Suero Fetal Bovino (SFB)
2	DMSO y Albumina Humana
3	DMSO, Albumina Humana, ADC y HES

El criovial preparado se colocó en el recipiente de congelación Mr. Frosty (NALGENE), el cual se llenó con alcohol isopropílico, y se congeló durante 24 horas en el ultracongelador (Revco, Thermo Scientific) a una temperatura de -80°C . Finalmente, las células se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido (Cryoplus 1, Thermo Scientific) en fase de vapor a una temperatura de -196°C durante 1 o 3 meses.

6.2.2 Descongelación

Las células se transportaron en frío hasta el área de trabajo y se colocó el criovial en un baño de calentamiento a 37°C durante dos minutos e inmediatamente se realizó una dilución 1:10 con medio PRMI completo para posteriormente centrifugarlo durante 10 minutos para neutralizar y eliminar el DMSO. El botón celular obtenido se resuspendió en 1 mL de medio para realizar los ensayos pertinentes, incluyendo la viabilidad celular por medio de citometría de flujo, como viene descrito en el punto 6.1.5.

6.3 Fenotipificación

Se resuspendieron 100,000 células NK en 100 µL de PBS 1X y se adicionaron los siguientes marcadores de superficie: CD56 (AF488 BD Biosciences), NKp46 (APC BioLegend), NKG2C (PE BioLegend) y LAMP-1 (Pacific Blue BioLegend); para incubar durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las células NK fueron tratadas de acuerdo con el protocolo del kit BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization, el cual consistía en adicionar 250 µL de la solución de Fijación y Permeabilización incubar bajo las condiciones descritas previamente y agregar 1 mL de la solución PermWash 1X para lavar centrifugando a 1500 rpm durante 10 minutos. Una vez que las células fueron fijadas y permeabilizadas se tiñeron con los marcadores intracelulares IFN-γ (BV605 BD Horizon) y Granzima B (PE-Cy7 BioLegend). La información completa de los anticuerpos utilizados se encuentra en la tabla 3. Se adquirieron al menos 10,000 eventos de células individuales en un citómetro BD LSR Fortessa y fueron analizados empleando el software FACSDiva version 9.0.1.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

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

6.4 Ensayos de funcionalidad

6.4.1 Líneas celulares

Para las células MDCK (NBL-2; ATCC, Manassas, VA, USA) y A549 (CCL-185; ATCC, Manassas, VA, USA) se utilizó el medio EMEM y F-12K, respectivamente, ambos suplementados con 10% de SFB y 1% de solución con antibióticos-antimicótico (10,000 U Penicilina, 10 mg Estreptomina y 25 mg/ml Anfotericina B). Ambas líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo celular en sus respectivos medios a 37°C y 5% CO₂ realizando cambios de medio y pasajes celulares cuando fuera necesario tomando la cuenta el viraje del medio y la confluencia del cultivo, respectivamente.

6.4.2 Virus

Se propagó el VIA/Virginia/ATCC1/2009 en células MDCK en medio de infección (IVGM), el cual consiste en medio MEM, 1 ug/mL de tripsina TPCK, 10mM de HEPES y 0.125% de BSA, hasta observar un efecto citopático y citolítico en más

del 90% de las células, alrededor de 2 a 5 días. Después del cultivo, los debris celulares fueron precipitados por centrifugación a 10,000 g por 10 minutos a 4°C. Para remover factores solubles de origen celular el VIA fue concentrado y parcialmente purificado utilizando un filtro centricon de peso molecular 100,000 Da (Millipore, Billerica, MA). El virus fue titulado con la técnica de la dosis infectiva de cultivo de tejido al 50% (TCIDs) y congelado en alícuotas de un solo uso al -80°C.

6.4.3 Ensayos de citotoxicidad celular

Las células A549 se cultivaron en placas de 96 pozos con medio RPMI a una densidad de 0.5×10^6 células/mL y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta alcanzar más del 90% de confluencia. Posteriormente, las células se infectaron utilizando el medio de infección (IVGM), con el VIA a una multiplicidad de infección (MOI) de 1, a partir de un stock VIA H1N1 pdm09 obtenido. Luego de 1 hora de adsorción, el inóculo fue eliminado y después un lavado con PBS 1X, se resuspendieron en medio fresco. Después de 24 horas, las células infectadas y control fueron co-cultivadas con 0.5×10^6 células NK durante 6 horas.

Posteriormente, se removieron las células NK y se añadió 100 µL de medio RPMI fresco a cada pozo de la placa para determinar citotoxicidad celular por a través de la prueba de reducción de sal de bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolium (MTT) a formazan.

El ensayo se realizó por triplicado para cada individuo y cada condición, realizándose los siguientes grupos: 1) células NK sin el estímulo con la NP en co-cultivo con células A549 infectadas, 2) células NK estimuladas con la NP en co-cultivo con células A549 infectadas, 3) células NK estimuladas con la NP en co-cultivo con células A549 sin infectar, 4) células A549 infectadas solas, 5) células A549 sin infectar solas. El resumen de los grupos se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Grupos de estudio para ensayo de citotoxicidad (NA: No Aplica)

	Grupo	NK	NP	A549	VIA
1	Co-cultivo de células NK (sin NP)	✓	X	✓	✓
2	Co-cultivo de células NK (con NP)	✓	✓	✓	✓
3	Co-cultivo de células NK (con NP) en A549 sin infectar	✓	✓	✓	X
4	A549 infectadas	X	NA	✓	✓
5	A549 no infectadas	X	NA	✓	X

Se agregó 10 µL por pozo del reactivo del Kit de Proliferación Celular I (MTT) (Sigma Aldrich) y se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂, después se adicionó 100 µL de la solución de solubilización a cada pozo y se dejó incubando toda la noche para al día siguiente medir la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas GloMax® (Mod. E9032 Promega, Madison, WI). El porcentaje de citotoxicidad se calculó con la ecuación 2 comparando con las células A549 no infectadas sin co-cultivo con células NK.

$$\%Citotoxicidad = \frac{Absorbancia\ grupo\ evaluado}{Absorbancia\ A549\ solas} \times 100$$

Ecuación 2

6.4.3 Modelo de co-cultivo

Se co-cultivaron las células NK con células A549 infectadas con VIA, se realizó la metodología descrita en el punto 6.4.5, utilizando las placas de 12 pozos y una incubación de 24 horas. El ensayo se realizó por triplicado para cada individuo y cada condición, realizándose los siguientes grupos: 1) células NK sin el estímulo con la NP en co-cultivo con células A549 infectadas, 2) células NK estimuladas con la NP en co-cultivo con células A549 infectadas, 3) células NK estimuladas con la NP solas infectadas, 4) células NK estimuladas con la NP solas sin infectar, 5) células A549 infectadas solas, 6) células A549 sin infectar solas. El resumen de los grupos se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Grupos de estudio para ensayos de funcionalidad (NA: No Aplica)

	Grupo	NK	NP	A549	VIA
1	Co-cultivo de células NK (sin NP)	✓	X	✓	✓
2	Co-cultivo de células NK (con NP)	✓	✓	✓	✓
3	Células NK (con NP) infectadas solas	✓	✓	X	✓
4	Células NK (con NP) no infectadas solas	✓	✓	X	X
5	A549 infectadas	X	NA	✓	✓
6	A549 no infectadas	X	NA	✓	X

Una vez transcurridas las 24 horas, se recuperaron los sobrenadantes y se dividieron en 3 alícuotas para finalmente almacenarlos a -80°C para su posterior análisis.

6.4.4 Cuantificación de citocinas

A partir de las alícuotas de sobrenadantes previamente almacenadas a -80°C se determinó de forma cuantitativa de TNF- α , IFN- γ y granzima B usando un kit ELISA humano específico para cada citocina (TNF Alpha Human Uncoated ELISA kit; 88-7346-88, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.4.5 Título viral

Las células MDCK se cultivaron en placas de 96 pozos con medio EMEM completo y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta alcanzar más del 90% de confluencia. Posteriormente, las células se infectaron con los sobrenadantes haciendo diluciones seriadas de 10³ hasta 10⁶ utilizando el medio de infección IVGM e incubando durante 2 horas. Después de las 2 horas de adsorción, el inóculo fue eliminado y luego un lavado con PBS 1X, se resuspendieron en medio IVGM fresco para incubar durante 72 horas a 37°C. Posteriormente, se observaron las placas líticas y se eliminó el contenido suspendido en el medio a través de lavados y se llevó la determinación del título viral utilizando el método TCID₅₀ y las ecuaciones 3 y 4; Luego las monocapas se fijaron con

paraformaldehído al 4% y tiñeron con cristal violeta para observar unidades formadoras de placas líticas.

$$PD \text{ (distancia proporcional)} = \frac{(\% \text{ encima del } 50\% - 50)}{(\% \text{ encima del } 50\% - \% \text{ debajo del } 50\%)}$$

Ecuación 3

$$\log_{10}TCID50 = (\log_{10} \text{dilución encima del } 50) + PD \times \log_{10}(\text{factor dilución})$$

Ecuación 4

6.5 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 Kruskal Wallis con prueba post hoc de Dunn para los datos no paramétricos. Además, se hicieron análisis de correlación de Pearson o Spearman según cuál fuera el caso y análisis de regresión lineal. El resumen de las pruebas estadísticas a realizar se muestra en la tabla 6. Todas las pruebas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.3.1. para Windows (San Diego, California, EE. UU.). Los valores de $p < 0.05$ o $r < 0.6$ fueron considerados como significativos.

Tabla 6. Estrategia de pruebas estadísticas.

Muestras	Paramétrica	No paramétrica
Independientes	t-student	U de Mann Whitney
Tres o más Independientes	ANOVA	Kruskal- Wallis
Análisis múltiple	Tukey	Dunn
Correlación	Pearson	Spearman

CAPITULO 7

RESULTADOS

7.1 Características de los sujetos de estudio

Once donantes previamente vacunados contra la influenza participaron en este estudio. Los participantes tenían entre 20 y 31 años, y la toma de muestra de sangre se realizó entre 1.5 y 3 meses después de la vacunación. Todos los donantes presentaban perfiles hematológicos normales, con recuentos totales de leucocitos, linfocitos y monocitos dentro de los rangos de referencia esperados para individuos sanos. Las características demográficas y hematológicas de cada participante se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de los sujetos (F: Femenino, M: Masculino)

Suj.	Edad (años)	Sexo	Tiempo post-vacunación	Leucocitos	Linfocitos	Monocitos
1	23	M	2 meses	6.10x10 ³ /uL	1.92x10 ³ /uL	0.42x10 ³ /uL
2	27	F	2 meses	8.57x10 ³ /uL	2.58x10 ³ /uL	0.66x10 ³ /uL
3	23	F	3 meses	5.59x10 ³ /uL	2.67x10 ³ /uL	0.38x10 ³ /uL
4	26	M	3 meses	3.73x10 ³ /uL	1.39x10 ³ /uL	0.24x10 ³ /uL
5	31	M	2 meses	8.26x10 ³ /uL	3.19x10 ³ /uL	0.58x10 ³ /uL
6	23	M	1 ½ meses	5.94x10 ³ /uL	2.26x10 ³ /uL	0.57x10 ³ /uL
7	21	F	1 ½ meses	5.39x10 ³ /uL	2.09x10 ³ /uL	0.31x10 ³ /uL
8	20	F	2 meses	9.20x10 ³ /uL	3.92x10 ³ /uL	0.70x10 ³ /uL
9	23	M	2 ½ meses	8.36x10 ³ /uL	3.52x10 ³ /uL	0.60x10 ³ /uL
10	20	F	3 meses	7.47x10 ³ /uL	1.66x10 ³ /uL	0.47x10 ³ /uL
11	27	M	2 meses	3.67x10 ³ /uL	1.85x10 ³ /uL	0.28x10 ³ /uL

7.2 Viabilidad de las células posterior a la criopreservación

Con base en los ensayos preliminares realizados con PBMC, el medio de criopreservación MCP3 compuesto por DMSO, albúmina humana, HES y ADC, fue seleccionado para la criopreservación de las células NK. En general, el incremento de temperatura y tiempo de almacenamiento se asoció con una disminución de la viabilidad celular. Al evaluar el rendimiento del medio MCP3 con PBMC almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observó una viabilidad de $94.50\% \pm 0.71$ a las 2 semanas y de $85.43\% \pm 0.77$ a las 3 semanas. Al replicar estas condiciones con las células NK, la viabilidad disminuyó ligeramente a $85.27\% \pm 2.27$ y $81.02\% \pm 0.32$, respectivamente. A pesar de esta reducción, la viabilidad se mantuvo por encima del 80% y fue superior a la obtenida con los medios MCP1 y MCP2, con $89.65\% \pm 0.36$ y $79.57\% \pm 1.38$, respectivamente, bajo la condición más favorable (criopreservación de PBMC a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 semana). En la tabla 8 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los ensayos preliminares.

Tabla 8. Características y resultados de los ensayos preliminares.

	Célula	Temperatura	Tiempo	Viabilidad (%)
MCP1	PBMC	-20°C	1 semana	$79.76\% \pm 0.94$
		-70°C		$89.65\% \pm 0.36$
MCP2	PBMC	-20°C	1 semana	$57.96\% \pm 0.23$
		-70°C		79.57 ± 1.38
MCP3	PBMC	-70°C	2 semanas	$94.5\% \pm 0.71$
			3 semanas	$85.43\% \pm 0.77$
	Células NK		2 semanas	$85.27\% \pm 2.27$
			3 semanas	$81.02\% \pm 0.32$

Cuando MCP3 se empleó para el almacenamiento a largo plazo de células NK en nitrógeno líquido, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 80 % tanto al mes como a los tres meses (Figura 6). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las células frescas y las criopreservadas durante 1 mes (97.80 % [IQR = 95.85- 99.45] vs. 93.05 % [IQR = 88.55 - 96.95], $P = 0.6868$) ni entre las frescas y las almacenadas durante 3 meses (97.80 % [IQR = 95.85- 99.45] vs. 97.90 % [IQR = 85.40 – 98.65], $P = 0.1495$). De manera similar, no se registraron diferencias entre las células NK criopreservadas estimuladas con la NP y aquellas sin estímulo (95.80 % [IQR = 92.75 – 98.10] vs. 93.05 % [IQR = 84.87 – 98.15], $P = 0.6868$), lo que indica que el medio MCP3 proporciona una crioprotección eficaz, manteniendo la viabilidad celular sin inducir muerte celular significativa durante el período de almacenamiento evaluado.

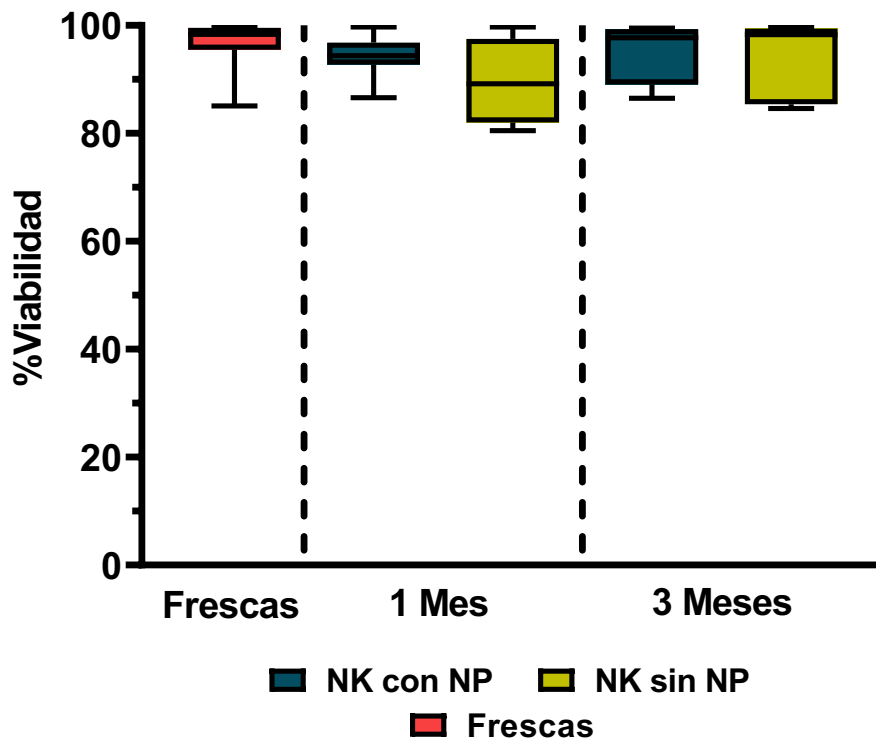


Figura 6. Viabilidad de células NK previo y posterior a su criopreservación. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn, Frescas (n=10) 1 Mes (n=8), 3 Meses (n=6), mediciones por duplicado, $p > 0.05$.

7.3 La criopreservación mantiene el fenotipo de tipo memoria inducido por la NP y activa las células NK

Para el inmunofenotipo se realizó una estrategia de análisis de los marcadores de células NK a evaluar siguiendo los puntos de corte de acuerdo con las lecturas de FMO y las células sin tinción (Figura 7).

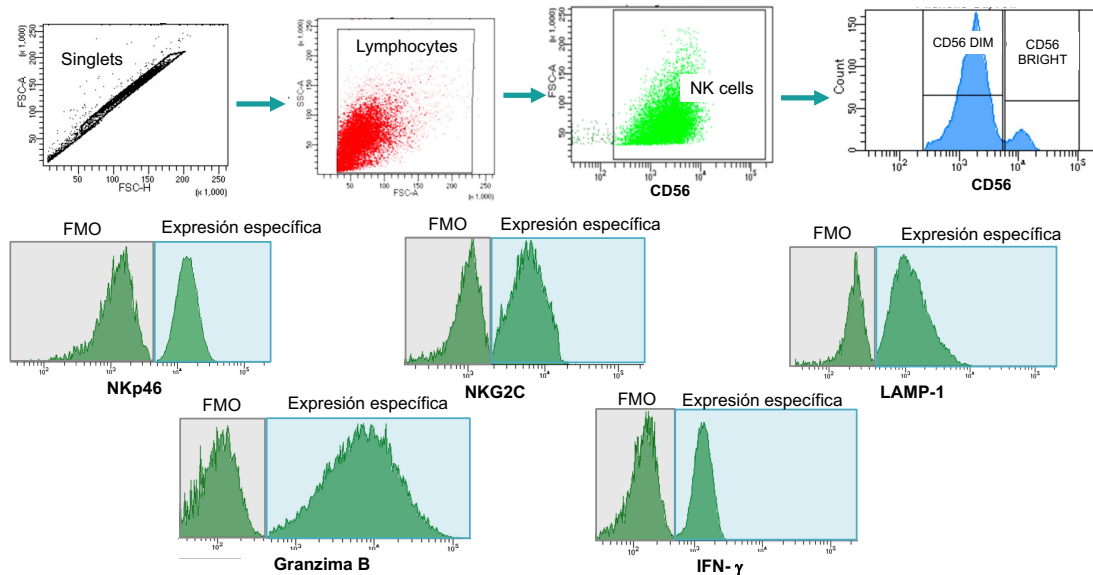


Figura 7. Estrategia de análisis de fenotipo de células NK. Software FACSDiva versión 9.0.1.

El análisis de las subpoblaciones $CD56^{bright}$ y $CD56^{dim}$ no reveló cambios significativos en sus proporciones relativas tras la criopreservación (Figura 8). La proporción de células $CD56^{dim}$ en condiciones frescas fue de $9.38 \pm 6.74\%$, y se mantuvo estable tras un mes ($11.77 \pm 7.62\%$, $p > 0.05$) y tres meses ($13.04 \pm 6.98\%$, $p > 0.05$) de almacenamiento criogénico. Por el otro lado, la subpoblación $CD56^{bright}$ representó el $88.85 \pm 6.01\%$ en condiciones frescas, sin diferencias estadísticamente significativas al mes ($86.36 \pm 7.99\%$, $p > 0.05$) y tres meses ($85.12 \pm 7.16\%$, $p > 0.05$).

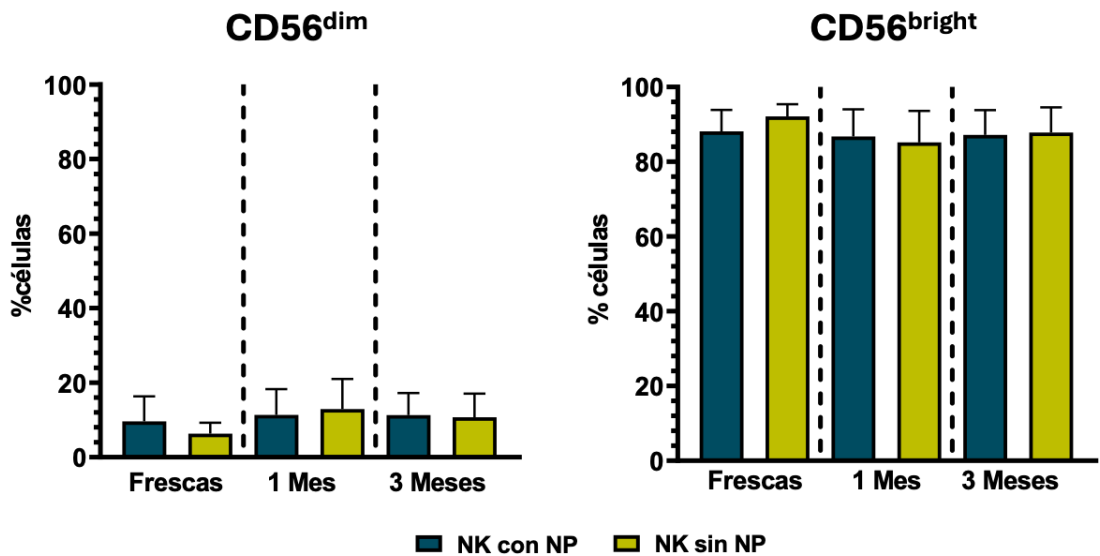


Figura 8. Subpoblaciones de las células NK previo y posterior a su criopreservación. Análisis de ANOVA con comparación múltiple de Tukey, Frescas (n=10) 1 Mes (n=8), 3 Meses (n=6) mediciones por duplicado, $P > 0.05$.

La expresión del receptor NKG2C, asociado al fenotipo de tipo memoria, se mantuvo estable tras la criopreservación en ambos subconjuntos: CD56^{bright} (Figura 9) y CD56^{dim} (Figura 10), sin diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de almacenamiento evaluados. Particularmente en la subpoblación CD56^{bright}, que es la que desarrolla el fenotipo de tipo memoria y la que mayor expresión de NKG2C exhibe tras la estimulación con NP, los niveles fueron de 21.40% [IQR = 12.35-57.05] en condiciones frescas, 6.00% [IQR = 3.77–18.63] al mes y 10.45% [IQR = 3.4-18.63] a los tres meses de criopreservación, sin alcanzar significancia estadística ($P > 0.05$). La preservación de este marcador posterior a la criopreservación sugiere que el medio MCP3 no compromete la identidad fenotípica de tipo memoria adquirida mediante la estimulación antigénica con la NP.

En contraste, el receptor activador NKp46 mostró un incremento en su expresión tras la criopreservación, particularmente en las células no estimuladas con NP y

de manera más pronunciada en el subconjunto CD56^{dim} (Figuras 9 y 10). En esta subpoblación, la expresión de NKp46 aumentó después de 1 mes y 3 meses de criopreservación respecto a las células frescas, tanto en las células estimuladas con NP (0.55% [IQR = 0.00 - 1.23] vs 5.20% [IQR = 0.00 - 5.30] ($P = 0.0026$) y 4.40% [IQR = 2.9 - 5.30] ($P = 0.0020$)) como en las no estimuladas (0.20% [IQR = 0.15 - 0.45] vs 2.70% [IQR = 0.00 - 5.60] ($P = 0.0036$) y 4.40% [IQR = 2.9 - 5.30] ($P = 0.0077$)). En la subpoblación CD56^{bright}, este incremento fue exclusivo de las células no estimuladas con NP, con valores de 4.80 [IQR = 2.25- 9.20] en condiciones frescas, 32.88% [IQR = 24.45 - 36.69] al mes ($P = 0.0004$) y 33.35% [IQR = 32.00 - 34.80] a los tres meses ($P = 0.0043$), lo que sugiere una modulación diferencial de la activación dependiente del estado de estimulación previo a la criopreservación.

En cuanto a los marcadores de funcionalidad, la producción intracelular de IFN- γ no se incrementó tras la criopreservación en ninguna de las subpoblaciones evaluadas (figura 9 y 10). En las células CD56^{dim} estimuladas con NP el grupo con mayor producción de IFN- γ , los valores pasaron de 19.60% [IQR = 2.37 - 42.60] en condiciones frescas a 14.40% [IQR = 4.13 - 17.4] al mes y 7.80% [IQR = 2.1 - 21.04] a los tres meses de criopreservación, sin diferencias significativas ($p > 0.05$). Un patrón similar se observó en la subpoblación CD56^{bright}, con valores de 23.80% [IQR = 22.5 - 50.43] en condiciones frescas, 11.85% [IQR = 4.05 - 38.78] al mes y 30.93% [IQR = 7.82 - 58.34] a los tres meses ($p > 0.05$).

La expresión intracelular de Granzima B disminuyó de forma global y marcada tras la criopreservación (figura 9 y 10). En la subpoblación CD56^{dim}, los niveles se redujeron de 86.30% [IQR = 74.6 - 98.00] en condiciones frescas a 6.50% [IQR = 2.97 - 10.06] al mes ($p = 0.0021$) y 2.48% [IQR = 0.38 - 13.10] a los tres meses ($p < 0.0001$). Una disminución de magnitud similar se observó en el subconjunto CD56^{bright}, con valores de 97.30% [93.95 - 99.35] en condiciones frescas, 24.40% [IQR = 11.45 - 37.51] al mes ($p = 0.014$) y 20.30% [IQR = 9.33 - 24.78] a los tres meses ($p = 0.0001$). Estas reducciones sugieren una pérdida

del contenido de gránulos citotóxicos preformados asociada al proceso de congelación-descongelación.

Por otro lado, la expresión superficial de LAMP-1 (CD107a) aumentó de manera notable tras 3 meses de criopreservación en ambas subpoblaciones y en ambas condiciones de estimulación (Figuras 9 y 10). El porcentaje de células LAMP-1⁺ aumento a los tres meses, respecto a las células tras 3 meses de criopreservación tanto en la subpoblación CD56^{dim} (3.70% [IQR = 1.3 – 14.80] vs 53.20% [IQR = 34.4 – 69.28], $p = 0.0232$) como en la CD56^{bright} (14.00% [IQR = 4.65 – 69.55] vs 94.88% [IQR = 77.87 – 99.65], $p = 0.0003$), al igual que en las células estimuladas con la NP (8.40% [IQR = 1.4 – 39.30] vs 74.03% [IQR = 34.4 – 91.59], $p = 0.0340$), como sin estimular (3.10% [IQR = 0.85 – 3.55] vs 73.18% [IQR = 53.35 – 73.18]), $p < 0.0001$). El aumento de LAMP-1 en ausencia de un incremento equivalente en IFN- γ o Granzima B intracelular indica una mayor movilización de vesículas de desgranulación como respuesta al estrés criogénico, más que a una activación funcional.

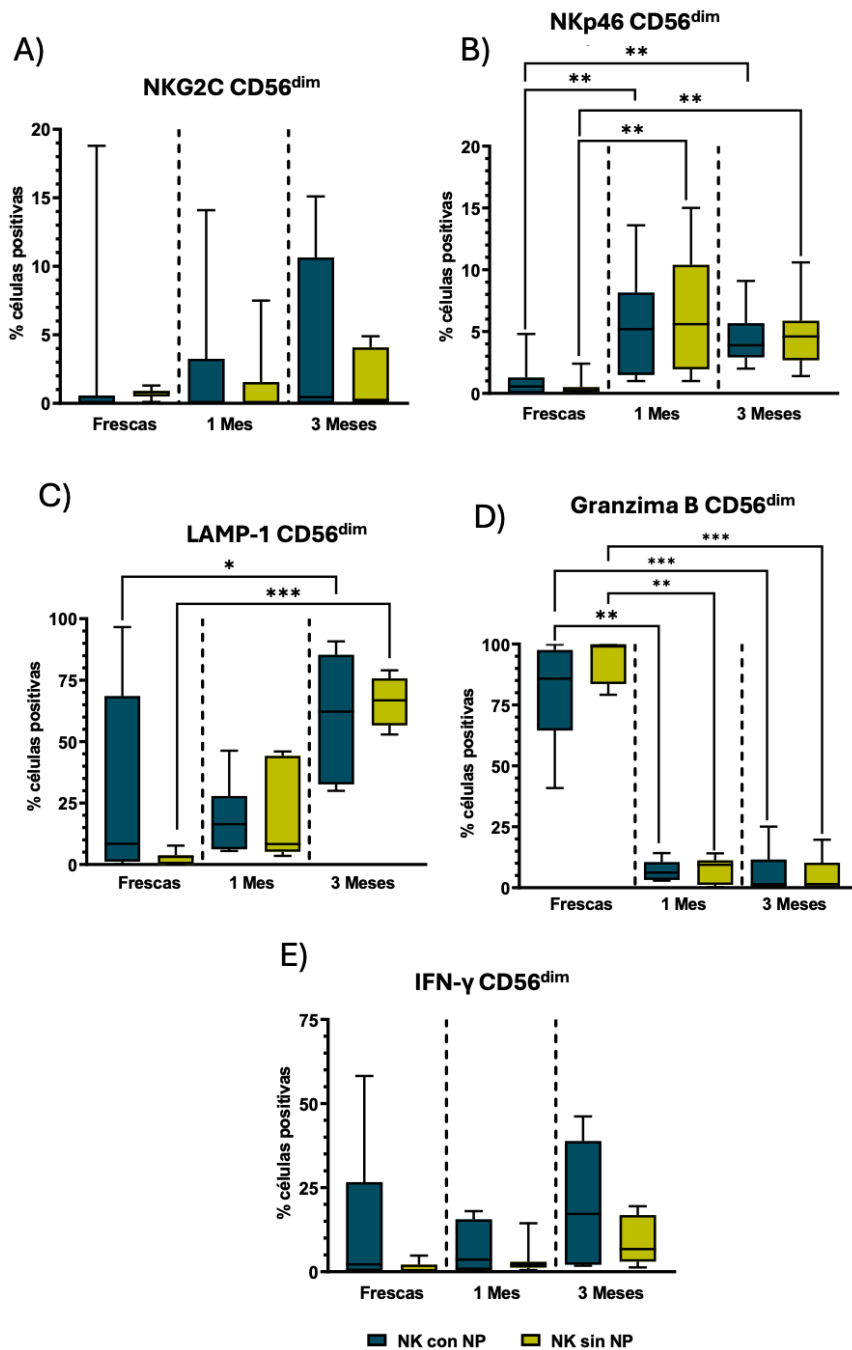


Figura 9. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56^{dim} estimuladas con nucleoproteína y sin estimular, previo y posterior a su criopreservación. Porcentaje de células positivas para A) NKG2C B) NKp46 C) LAMP-1 (CD107a) D) Granzima B intracelular E) IFN- γ intracelular. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn, Frescas (n=10) 1 Mes (n=8), 3 Meses (n=6), mediciones por duplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$

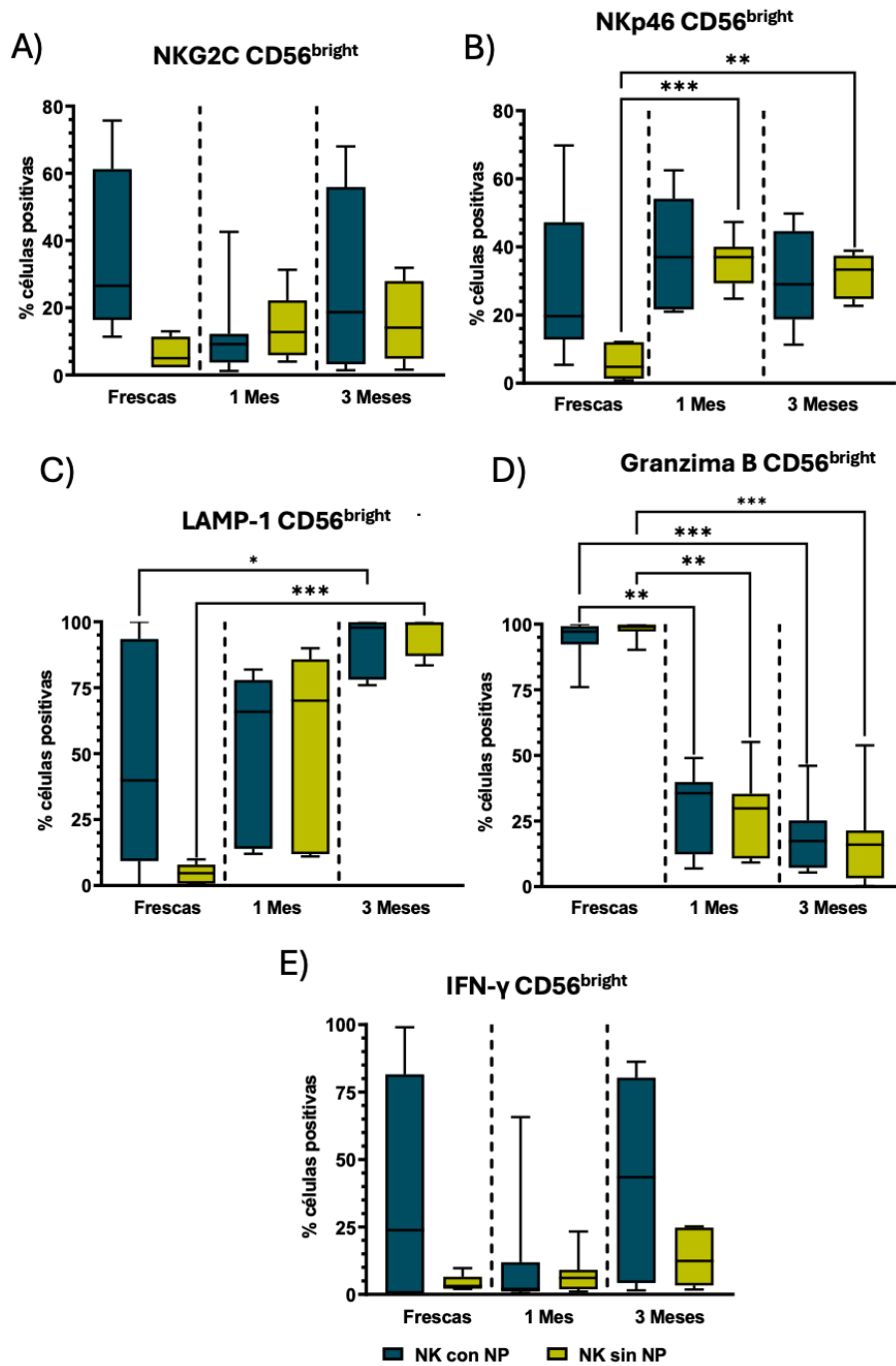


Figura 10. Expresión de marcadores de tipo memoria y de activación en células NK CD56^{bright} estimuladas con nucleoproteína y sin estimular, previo y posterior a su criopreservación. Porcentaje de células positivas para A) NKG2C B) NKp46 C) LAMP-1 (CD107a) D) Granzima B intracelular E) IFN- γ intracelular. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn, Frescas (n=10) 1 Mes (n=8), 3 Meses (n=6), mediciones por duplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$

7.4 La criopreservación disminuye la concentración de Granzima B en los sobrenadantes de los co-cultivos.

Para evaluar la funcionalidad se evaluó la secreción de proteínas que participan en la respuesta antiviral de la célula NK, como es el caso del IFN- γ , TNF- α , y granzima B. Los límites de cuantificación y las curvas de calibración estándar se muestran en la tabla 9 y figura 11, respectivamente.

Tabla 9. Límites de cuantificación de las proteínas.

Analito	Límites de cuantificación
TNF- α	15.6 - 1000 pg/mL
IFN- γ	9.38 - 600 pg/mL
Granzima B	39.1 - 2500 pg/mL

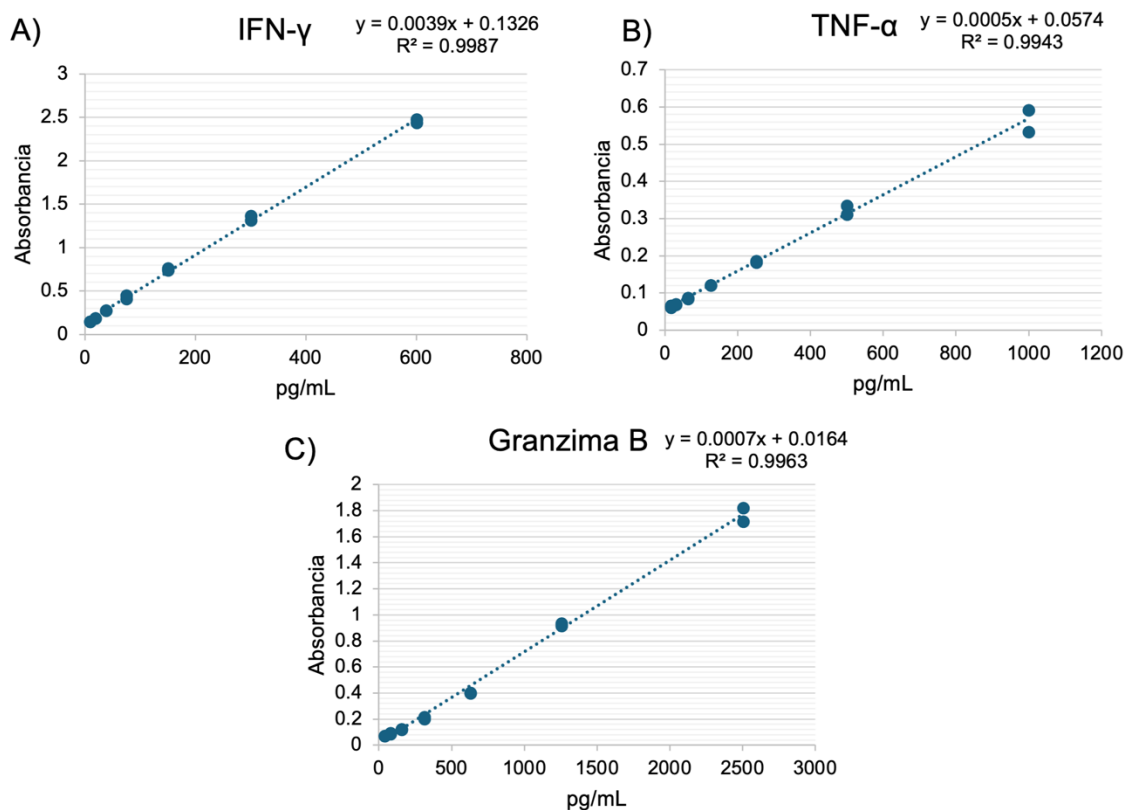


Figura 11. Curvas de calibración estándar y ecuaciones de la recta: A) IFN- γ , B), TNF- α y C) Granzima B.

En células NK recién extraídas estimuladas con NP co-cultivadas con células A549 infectadas con VIA, secretaron niveles similares de Granzima B a los alcanzados cuando las células NK estimuladas con NP infectadas directamente sin co-cultivo (901.66 ± 394.56 pg/mL vs 1053.54 ± 512.36 pg/mL, $p > 0.05$). En los dos grupos restantes, correspondientes a las células NK no estimuladas con NP co-cultivadas con células A549 infectadas con VIA y las células NK estimuladas con NP sin co-cultivo o infección directa, también presentaron concentraciones de Granzima B pero similares entre ellas (605.12 ± 240.99 pg/mL vs 739.65 ± 301.66 pg/mL, $p > 0.05$), pero menores comparados con los primeros dos grupos mencionados (Figura 12).

Posterior a la criopreservación, los niveles extracelulares de Granzima B disminuyeron de manera uniforme en los cuatro grupos experimentales ($p < 0.05$), presentando concentraciones similares entre sí: 339.71 ± 115.28 pg/mL para las células NK estimuladas con la NP co-cultivadas con A549 infectadas, 323.11 ± 130.50 pg/mL para las células NK sin el estímulo con la NP co-cultivadas con A549 infectadas, 329.12 ± 70.26 pg/mL para las células NK estimuladas con la NP directamente infectadas, y 349.54 ± 123.33 pg/mL para las células NK cultivadas en solitario. Las concentraciones de IFN- γ y TNF- α se mantuvieron por debajo del límite de cuantificación del ensayo en todos los grupos y tiempos evaluados (datos no mostrados).

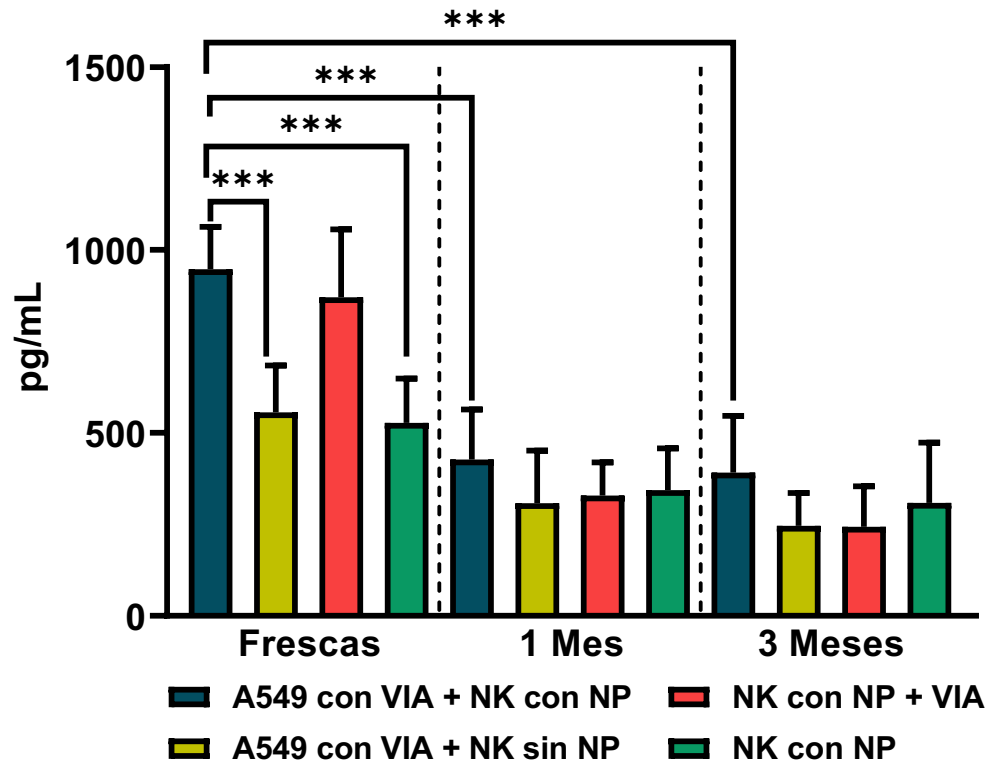


Figura 12. Secreción de granzima B de células NK en los sobrenadantes de los co-cultivos contra células infectadas con VIA A549, previo y posterior a su criopreservación. Análisis de ANOVA con comparación múltiple de Tukey, Frescas (n=10) 1 Mes (n=8), 3 Meses (n=6), *** $p < 0.005$.

7.5 La expresión de LAMP-1 esta correlacionado con los niveles de Granzima B

La criopreservación se asoció con una disminución simultánea de la Granzima B tanto intracelular como extracelular. Para explorar el posible mecanismo, se realizaron análisis de correlación entre la expresión de LAMP-1 y los niveles de Granzima B en ambos compartimentos. Se identificó una correlación negativa significativa entre la expresión de LAMP-1 y la Granzima B intracelular ($r = -0.7696$, $p < 0.0001$), y una correlación positiva significativa entre LAMP-1 y la

Granzima B extracelular en los sobrenadantes de co-cultivo ($r = 0.6002$, $p = 0.0026$) (Figura 13). Estas correlaciones de sentido opuesto indican que la movilización de vesículas de desgranulación hacia la membrana plasmática, reflejada por la expresión de LAMP-1, se acompaña de una liberación activa de Granzima B desde los depósitos intracelulares hacia el medio extracelular.

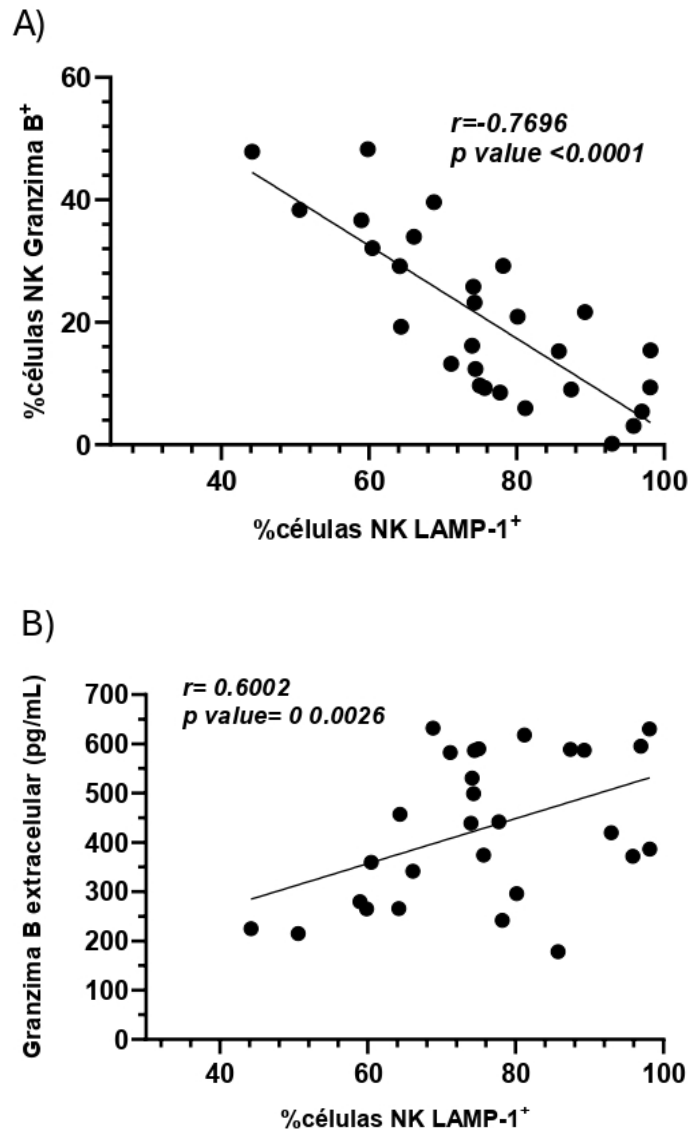


Figura 13. Correlación de la expresión de LAMP-1 con la A) expresión de granzima B intracelular y B) secreción de granzima B (extracelular) en las células NK criopreservadas (n=10). Correlación de Spearman.

7.6 La criopreservación disminuye la citotoxicidad celular

Para evaluar la función citotóxica de las células NK se realizó un ensayo de MTT del co-cultivo contra células infectadas con VIA A549. En la figura 14 se muestran imágenes representativas del ensayo.

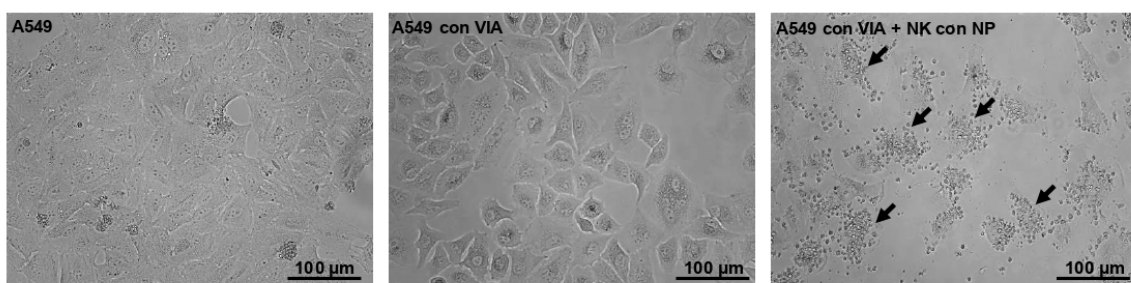


Figura 14. Imágenes representativas del ensayo de citotoxicidad. Las flechas indican la interacción de las células NK con las células A549 infectadas.

En condiciones frescas, las células NK estimuladas con NP exhibieron una citotoxicidad de contra células A549 infectadas, significativamente mayor que la de las células NK no estimuladas con NP (57.79 % [IQR = 50.85 – 63.50] vs 14.07 % [IQR = 9.51- 19.77], $p < 0.0001$) y que la observada en co-cultivos con células A549 sin infectar (57.79 % [IQR = 50.85 – 63.50] vs 17.87 % [IQR = 6.65 – 22.05] $p < 0.0001$), lo que confirma tanto la especificidad como la mayor capacidad efectora de las células con fenotipo de tipo memoria.

Después de la criopreservación la citotoxicidad disminuyó en las células NK estimuladas con NP con valores de 23.95 % [IQR = 22.91 – 23.95] al mes y 22.09 % [IQR = 21.26 – 26.48] a los tres meses, equivalente a una reducción del 39.87% ($P = 0.0393$). A pesar de esta reducción, la jerarquía funcional observada en condiciones frescas se preservó: las células NK estimuladas con NP mantuvieron una citotoxicidad significativamente superior a la de las no estimuladas tanto al mes (23.04 % [IQR = 26.06 – 21.31] vs. 15.67 % [IQR = 12.12 – 19.99], $P = 0.0425$) como a los tres meses de criopreservación 22.09 % [IQR = 21.26 – 26.48] vs. 13.85 % [IQR = 12.23 - 21.14], $P = 0.0014$) (Figura 15).

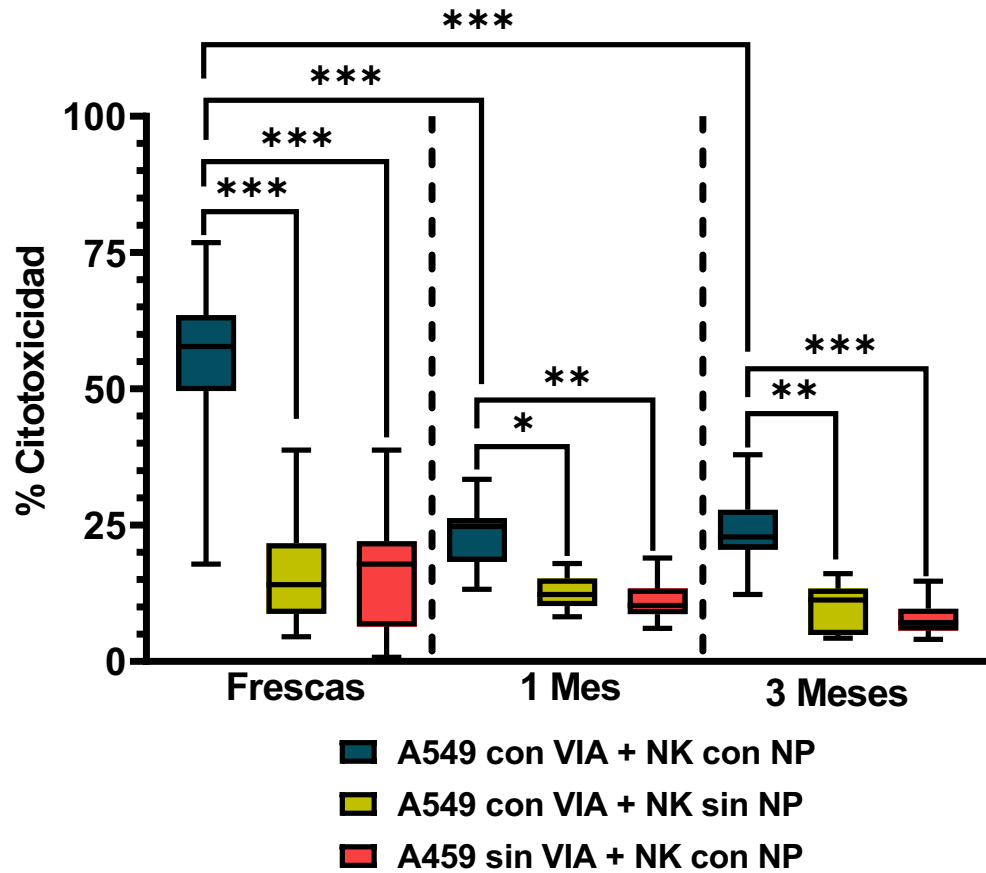


Figura 15. Porcentaje de citotoxicidad de células NK frente a células A549 infectadas con VIA previo y posterior a su criopreservación. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn, Frescas (n=10) 1 Mes (n=8), 3 Meses (n=6), mediciones por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$.

7.7 La criopreservación aumenta el título viral

Para evaluar la actividad antiviral de las células NK se realizaron ensayos de TCID₅₀ para evaluar el título viral en los sobrenadantes de los co-cultivos contra células infectadas con VIA A549. En las figuras 16 y 17 se muestran imágenes representativas del ensayo de título viral.

En condiciones frescas, las células NK estimuladas con NP redujeron el título viral a 6.67×10^7 TCID₅₀/mL, significativamente menor al obtenido en co-cultivos con células NK no estimuladas (4.88×10^8 TCID₅₀/mL, $P = 0.0003$) y comparable al de las células directamente infectadas sin co-cultivo (1.39×10^8 TCID₅₀/mL, $P > 0.05$), lo que evidencia la capacidad de las células NK con fenotipo de tipo memoria para suprimir la replicación viral de manera más eficiente.

Después de la criopreservación, los títulos virales mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a las condiciones frescas ($p > 0.05$, Figura 18). Las células NK estimuladas con NP presentaron títulos de 2.89×10^8 TCID₅₀/mL al mes y 1.75×10^8 TCID₅₀/mL a los tres meses. Al igual que en la citotoxicidad, la jerarquía de control viral se preservó: las células NK estimuladas con NP mantuvieron títulos virales menores que las no estimuladas al mes (2.89×10^8 vs. 5.53×10^8 TCID₅₀/mL, $p = 0.484$), y a los tres meses de criopreservación (1.75×10^8 vs. 4.72×10^8 TCID₅₀/mL, $p = 0.0467$), reproduciendo el patrón observado en condiciones frescas.

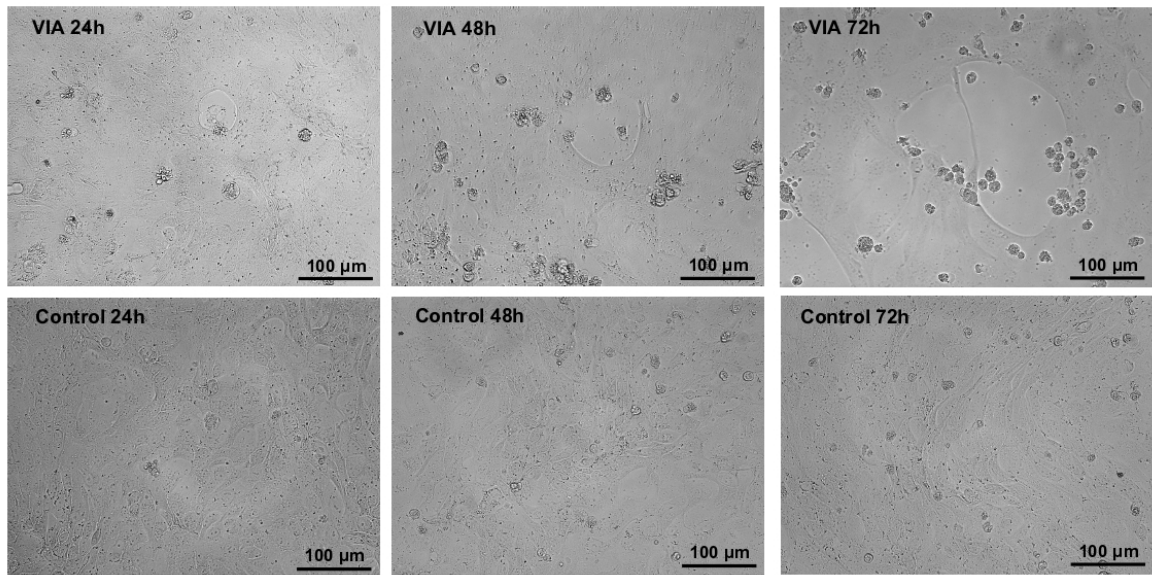


Figura 16. Imágenes representativas de la monocapa celular infectada con stock viral y el control.

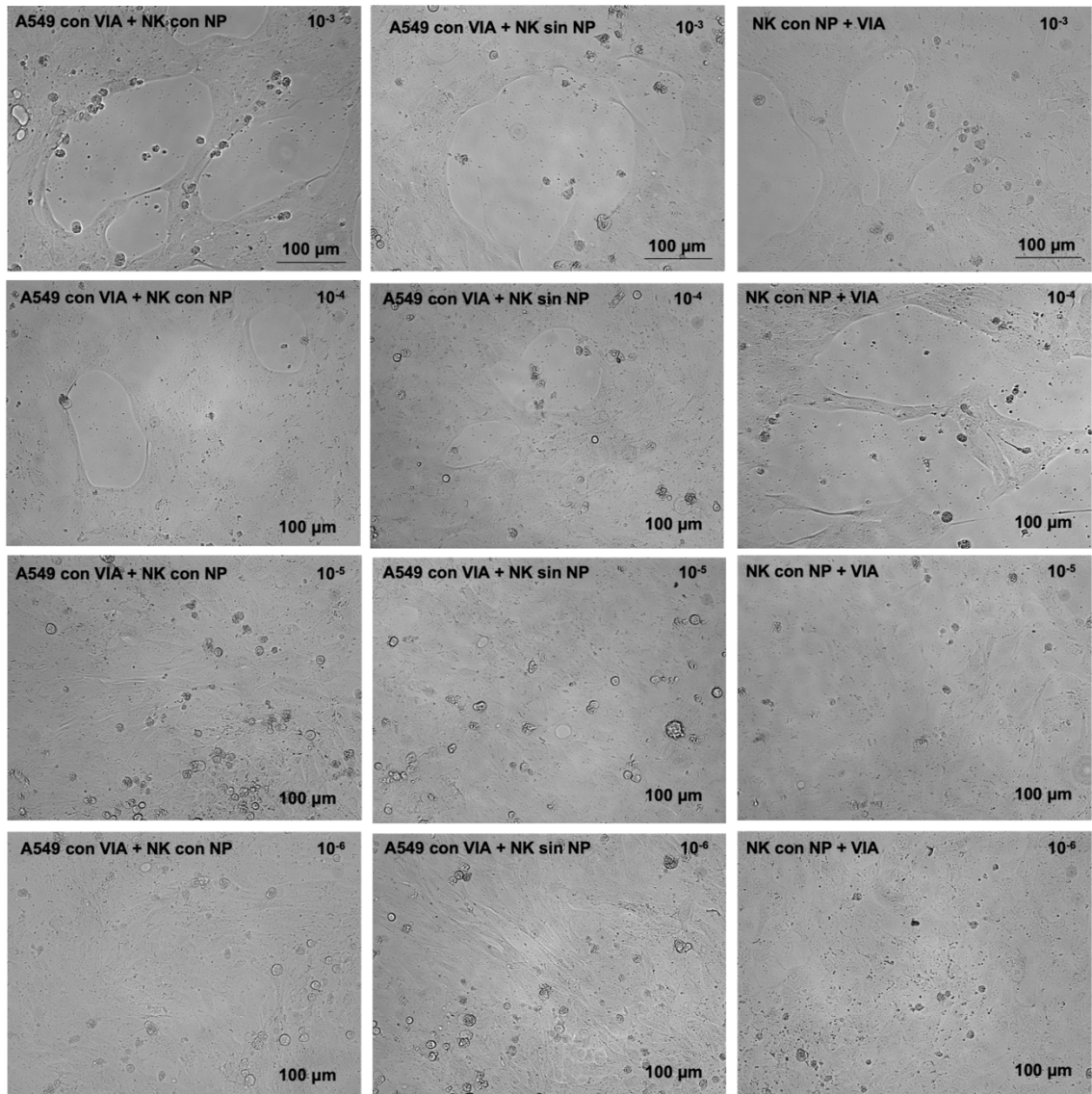


Figura 17. Imágenes representativas de la monocapa celular a las 72 horas posterior a la infección con los sobrenadantes de los co-cultivos de las células NK criopreservadas.

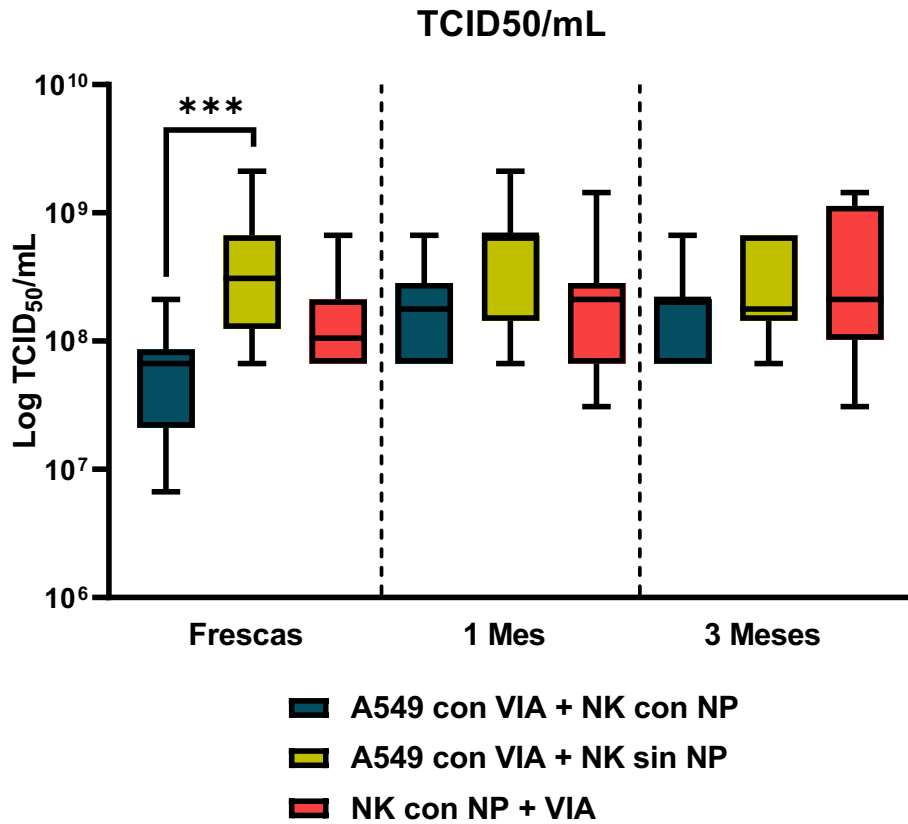


Figura 18. Título viral de sobrenadantes de los co-cultivos de las células NK, previo y posterior a su criopreservación, contra células infectadas con VIA A549. Análisis de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn, Frescas (n=10) 1 Mes (n=8), 3 Meses (n=6), mediciones por triplicado, ***p <0.005.

CAPITULO 8

DISCUSIÓN

Con el avance constante de las terapias celulares y el desarrollo de productos de inmunoterapia basados en células NK, lograr el potencial terapéutico y la viabilidad para su uso inmediato requerirá la optimización de las técnicas de criopreservación para garantizar una recuperación funcional adecuada de las células.

Dadas las discrepancias asociadas a la criopreservación de células NK para su uso clínico, en este estudio se optimizó el medio criopreservante mediante ensayos preliminares. El medio MCP3, formulado por DMSO, albúmina humana, HES y ADC, fue el más adecuado al mostrar consistentemente viabilidades superiores al 80% en todas las condiciones evaluadas, tanto para PBMC como para células NK. En contraste los medios MCP1 (DMSO y SFB) y MCP2 (DMSO y albúmina humana), compuestos por un CPA penetrante (DMSO) y uno no penetrante, típicamente empleados para la preservación de líneas celulares comerciales, mostraron desempeños inferiores. Cabe destacar que, en el caso de MCP2, el SFB fue sustituido por albumina humana para evitar el uso de un producto proteico xenogénico capaz de inducir respuestas inmunogénicas y evitar la transmisión de patógenos no humanos (95).

El desempeño superior de MCP3 es consistente con lo reportado para productos celulares destinados a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, donde combinaciones de 5-10% DMSO con 6% HES (96), 2% dextran (97) y/o 5% albumina humana (98) se obtuvieron cantidades óptimas de células tras la descongelación. El dextran y HES son coloides sintéticos e isooncóticos aprobados por la FDA como expansores del volumen plasmático (99), lo que respalda su seguridad y eficacia como aditivos crioprotectores.

Al usar el MCP3 para la criopreservación en nitrógeno líquido durante periodos de 1 y 3 meses, la viabilidad se mantuvo consistentemente por arriba del 80%, sin diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de

almacenamiento. La viabilidad obtenida por nosotros fue superior a lo reportado por Herrera y colaboradores quienes usaron un medio criopreservante con composición similar al nuestro (50% Plasmalyte + 40% suero AB + 10% DMSO) para criopreservar células de tipo memoria provenientes de donadores convalecientes de COVID-19, donde obtuvieron una viabilidad aproximada del 80% (100).

La viabilidad encontrada entre los tiempos de almacenamiento de 1 y 3 meses fue similar lo que respalda la estabilidad de nuestro protocolo de criopreservación. Este hallazgo concuerda con lo documentado por Lecchi y colaboradores entre 1999 y 2014, quienes, en un análisis retrospectivo de células madre hematopoyéticas de aféresis, reportaron una viabilidad promedio del 85 % en las células nucleadas recolectadas, procesadas, congeladas y descongeladas, indicando un buen control del proceso a lo largo del tiempo (101).

La proporción de las subpoblaciones CD56^{bright} y CD56^{dim} no se vio modificada después de la criopreservación. Este hallazgo coincide con lo reportado en estudios previos donde evaluaron cuatro diferentes subpoblaciones de células NK definidas por CD16 y CD56, sin observarse cambios en su proporción después de 6 y 12 meses de almacenamiento criogénico. La conservación de estas subpoblaciones es relevante dado que el subconjunto CD56^{bright} se asocia con una mayor capacidad productora de citocinas y con la respuesta de tipo memoria inducida por la nucleoproteína (NP) del virus de influenza A (VIA), como se ha descrito previamente por nuestro grupo (89).

El marcador asociado a memoria NKG2C no presentó variaciones significativas en su expresión posterior a la criopreservación, un resultado clave para los objetivos de este estudio. Este receptor se ha vinculado con el fenotipo de tipo memoria inducido tanto por exposición a CMV (81) como a péptidos de la NP del VIA (88). En células NK convencionales, los niveles de NKG2C aumentan tras la expansión y se mantiene después de la criopreservación (66). En contraste, en células NK de memoria específicas para SARS-CoV-2, provenientes de donantes convalecientes de COVID-19, se observó una disminución cercana al 50% en los

marcadores CD57 y NKG2C posterior a la criopreservación (102). La preservación de NKG2C observada en nuestro estudio sugiere que el protocolo de expansión y criopreservación empleado podría estar protegiendo el fenotipo de tipo memoria inducido por la NP. Esta diferencia respecto a nuestros resultados podría explicarse por múltiples factores. En primer lugar, las células NK de donantes convalcientes se generan bajo condiciones de inflamación sistémica intensa, lo que favorece la diferenciación hacia fenotipos terminalmente maduros (CD57⁺ y CD56^{dim}) (103–105). Estas células se caracterizan por menor capacidad proliferativa y mayor susceptibilidad al estrés, especialmente en contextos de activación crónica (106). En contraste, la expansión con IL-2 e IL-15 empleada en el presente trabajo favoreció el desarrollo del fenotipo de memoria (NKG2C⁺, NKp46⁺) en la subpoblación CD56^{bright} (89), la cual corresponden a células menos maduras, que presentan mayor plasticidad y resistencia al estrés, lo que podría explicar su menor susceptibilidad a la pérdida de NKG2C tras la criopreservación. Asimismo la naturaleza del estímulo antigénico también podría contribuir, dado que la NP del VIA es una proteína altamente conservada (37), capaz de inducir respuestas más uniformes y reproducibles, en contraste con la mayor heterogeneidad observada en respuestas frente a SARS-CoV-2 (102).

A diferencia de la expresión de NKG2C, el marcador de activación NKp46 mostró un incremento en su expresión posterior a la criopreservación, particularmente en las células no estimuladas con la NP y de manera más evidente en la subpoblación CD56^{dim}. Estudios previos reportan que los NCR, fundamentales para la activación de la citotoxicidad mediada por células NK, generalmente no se modifican después de la descongelación (64,66), con excepción de NKp46 (66) y NKG2D (64), los cuales se han reportado disminuidos en comparación con células frescas. La discrepancia observada en nuestros resultados puede atribuirse a diferencias en los protocolos de criopreservación, particularmente la composición del medio criopreservante. En los trabajos mencionados anteriormente, se emplearon formulaciones con una mayor concentración de agentes crioprotectores no penetrantes, como 50% Plasmalyte, 40% suero

humano AB 10% DMSO (64), o bien 20% albúmina, 25% dextrano y 5% DMSO (66). En contraste, en el presente trabajo se utilizó un medio con una menor concentración de agentes crioprotectores. Estas diferencias podrían haber modulado el grado de estrés osmótico y criogénico durante la congelación y descongelación, promoviendo la sobreexpresión de NKp46 como respuesta adaptativa.

El incremento de NKp46 es importante para el reconocimiento del virus de la influenza, su elevada expresión debe interpretarse con cautela en el contexto clínico, ya que podría representar un riesgo potencial para el desarrollo del SLC. No obstante, en este estudio la producción de IFN- γ no se vio alterada, lo que limitaría dicho riesgo. Este resultado es consistente con reportes que indican que la criopreservación no modifica los niveles intracelulares de IFN- γ en células NK estimuladas con citocinas (IL-12, IL-15 e IL-18) y/o células K562 (47) o células tumorales (66).

El aumento de NKp46 no implica necesariamente una activación funcional desregulada; sin embargo, este aumento deberá ser verificado en estudios posteriores, especialmente si se considera un uso terapéutico de estas células. Sobre todo, porque no fue posible detectar las citocinas (IFN- γ y TNF- α) en los sobrenadantes de los co-cultivos. Esto puede explicarse porque los sobrenadantes fueron recolectados a las 24 horas, mientras estudios previos de cinética han demostrado que la secreción de estas citocinas alcanzan su punto máximo aproximadamente a las 6 horas con la estimulación con células K562, para posteriormente disminuir progresivamente (56). La cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de cultivos de células NK criopreservadas es poco evaluada. Sin embargo, Damodharan y colaboradores encontraron niveles disminuidos de IFN- γ intracelular y extracelular posterior a la criopreservación. Además, el tratamiento con Ruxolitinib (inhibidor de JAK1/JAK2) redujo la concentración de esta citocina en los sobrenadantes de las células NK frescas, pero no afectó los niveles de IFN- γ en las células NK criopreservadas y descongeladas, sugiriendo que la producción de IFN- γ podría ser impulsada por CD137L y no por citocinas como la IL-2 o IL-15 (64).

Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio fue la disminución en la granzima B intracelular posterior a la criopreservación, acompañada de un aumento en la expresión de LAMP-1 (CD107a). Un patrón similar se ha observado, en un estudio realizado por Berjis y colaboradores donde observaron una reducción transitoria de los niveles intracelulares de granzima B mediada por desgranulación controlada, evaluado por los niveles elevados de LAMP-1 y granzima B extracelular en cultivo de células NK con IL-15 e IL-18 previo al congelamiento. Por lo anterior, los autores propusieron a estos hallazgos como un posible mecanismo de protección celular inducido por citocinas para evitar la acumulación intracelular de granzima B, la cual puede ser citotóxica para la propia célula (67). En el protocolo empleado en el presente trabajo se utilizó IL-15 durante la expansión de las células NK lo que podría haber favorecido la inducción de este mecanismo de protección previo a la criopreservación. Este hallazgo contrasta con estudios que emplean otras técnicas de expansión, en los cuales no se observaron cambios en la expresión de LAMP-1 ni en los niveles intracelulares de granzima B (47,64,66).

Inesperadamente, la granzima B en los sobrenadantes también se encontró disminuida después de la criopreservación. Sin embargo, al analizar en conjunto los resultados de granzima B intracelular, extracelular y la expresión de LAMP-1, se identificó una correlación negativa entre LAMP-1 y la granzima B intracelular, y una correlación positiva entre LAMP-1 y la granzima B extracelular. Estos resultados son coherentes con el mecanismo de protección celular descrito por Berjis y colaboradores (67) donde la célula NK libera granzima B para evitar su acumulación intracelular y aunque los niveles extracelulares son menores en comparación con células frescas, la correlación positiva con LAMP-1 confirma que la desgranulación continua siendo activa. Esta interpretación es consistente con el mantenimiento parcial de la citotoxicidad tras la criopreservación, dado que la granzima B liberada ejerce su acción citolítica sobre las células blanco.

Los ensayos de citotoxicidad mostraron una capacidad citotóxica de las células NK disminuida tras la criopreservación. No obstante, se mantuvo la tendencia observada en condiciones frescas: las células NK estimuladas con la NP

mostraron una mayor citotoxicidad en comparación con las no estimuladas, independientemente del tiempo de criopreservación. Aunque la criopreservación reduce parcialmente la funcionalidad, la respuesta mejorada inducida por la estimulación con la NP persiste. La reducción en citotoxicidad dependiente e independiente de anticuerpos observada después la criopreservación ha sido descrita en múltiples estudios principalmente la línea celular K562 y líneas celulares tumorales. En si la expansión y activación de las células NK antes de la criopreservación mejora la citotoxicidad, sin embargo, no la restaura completamente (64) por ello se han evaluado diferentes alternativas, como el cultivo en un medio suplementado con IL-2 posterior a la criopreservación o el aumento de la proporción célula efectora: célula diana en los ensayos funcionales.

En cultivos posteriores a la criopreservación se han mostrado resultados variables, entre las 12 y 24 horas de cultivo después de la descongelación las células NK empiezan a sufrir muerte celular mediada por apoptosis (67), además la citotoxicidad solo es detectable durante las primeras 4 horas (64). Múltiples reportes han demostrado la restauración e incluso la mejora de la citotoxicidad de las células NK posterior a la descongelación cuando son re-cultivadas con la IL-2 (47,64,68,107), mientras otros investigadores no encontraron ningún cambio (66,108). Recientemente, se ha explorado una estrategia basada en la señalización localizada de IL-2, debido a que el co-cultivo de células NK criopreservadas con células T activadas durante 24 horas restaura e incrementa la citotoxicidad. Este efecto requiere contacto físico directo entre ambos tipos celulares y no se replica mediante la difusión de IL-2 en el sobrenadante. Esto sugiere que la administración local de IL-2 en el sitio de contacto NK-T es el mecanismo clave, hallazgo que fue confirmado al utilizar células sintéticas recubiertas con IL-2 de manera covalente(108). Por otro lado, se ha propuesto una estrategia preventiva basada en citocinas, ya que el pretratamiento con IL-15 e IL-18 previo a la criopreservación mejora la recuperación celular post-descongelación, al reducir transitoriamente los niveles intracelulares de granzima B y promover la expresión del gen antiapoptótico BCL2L(67).

El aumento de la proporción de célula efectora: célula diana, es otra alternativa utilizada y evaluada. Una proporción aumentada de célula efectora: célula diana (10:1) se ha observado que mejora la citotoxicidad (47,66,109,110), mientras la proporción 20:1 restaura el efecto citotóxico a niveles similares obtenidos con las células frescas (68,107). Incluso se han evaluado proporciones superiores al 20:1, encontrando que la citotoxicidad se mantiene e igual a 20:1 (64).

En los ensayos de TCID₅₀, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los títulos virales entre los grupos con células frescas y criopreservadas, aunque se observa cierta tendencia al incremento del título viral en las condiciones criopreservadas. A pesar de ello, se mantuvo la tendencia de que las células NK estimuladas con NP presentaron menores títulos virales en comparación con aquellas no estimuladas, reforzando la relevancia funcional del fenotipo de tipo memoria. A la fecha, no se han reportado estudios que evalúen directamente la actividad antiviral de células NK criopreservadas en co-cultivo con células infectadas con el virus mediante el título viral. En la mayoría de los trabajos publicados, la funcionalidad se evalúa frente a la línea K562 o líneas tumorales, infiriendo indirectamente la actividad antiviral a partir del incremento en la citotoxicidad. En este sentido, los resultados del presente estudio constituyen la primera evidencia donde se evalúa de manera directa esta relación en células NK criopreservadas.

En conjunto, los resultados de este estudio demuestran que el uso de este protocolo de criopreservación permite conservar de manera eficaz la viabilidad y el fenotipo de tipo memoria de las células NK específicas para la NP del virus de la influenza durante periodos de hasta tres meses en la fase de vapor de nitrógeno líquido. Si bien las limitaciones de tiempo del estudio restringieron la evaluación a este periodo se ha reportado que los efectos de la criopreservación sobre el fenotipo y la funcionalidad de PBMCs han sido evaluados por más de 20 años sin encontrar efectos significativos (111), lo que sugiere que la estabilidad observada podría mantenerse a largo plazo.

La criopreservación no alteró las proporciones de las subpoblaciones CD56^{bright} y CD56^{dim}, ni la expresión del marcador de memoria NKG2C, ni la producción intracelular de IFN- γ . Por otro lado, indujo un incremento en la expresión de NKp46 y LAMP-1, así como una disminución en la granzima B intracelular, cambios que podrían explicarse por un mecanismo de protección celular mediado por la desgranulación. La citotoxicidad y la actividad antiviral, aunque reducidas en comparación con las células frescas, mantuvieron la diferencia funcional inducida por la estimulación con NP, lo que refuerza el potencial terapéutico de estas células como candidatas para la inmunoterapia contra la influenza.

CAPITULO 9

CONCLUSIÓN

La criopreservación afecta la activación y la citotoxicidad de las células NK de tipo memoria específicas para la NP del virus de influenza A H1N1pdm09.

CAPÍTULO 10

PERPECTIVAS

- Realizar ensayos de citotoxicidad empleando relaciones célula efectora: célula diana de 5:1 y 10:1.
- Cuantificar la producción de citocinas a las 6 horas posteriores al co-cultivo con células A549 infectadas.
- Evaluar mecanismos epigenéticos, metabólicos y citotóxicos asociados a la función efectora
- Emplear modelos *in vivo*, utilizando ratones, para evaluar la cinética de la respuesta, así como modelos tridimensionales basados en organoides.
- Evaluar la funcionalidad celular a las 24 y 48 horas posteriores a la descongelación.

REFERENCIAS

1. Jaiswal AN, Vagga A. Cryopreservation: A Review Article. *Cureus*. 14(11):e31564. doi:10.7759/cureus.31564 PubMed PMID: 36540535; PubMed Central PMCID: PMC9756256.
2. Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, Langer R, Roth AE, Church GM, et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol*. 2017 Jun 7;35(6):530–42. doi:10.1038/nbt.3889 PubMed PMID: 28591112; PubMed Central PMCID: PMC5724041.
3. Fowler C. The Svalbard Seed Vault and Crop Security. *BioScience*. 2008 Mar 1;58(3):190–1. doi:10.1641/B580302
4. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014 Sep;111(6):1021–46. doi:10.1038/bjc.2014.166
5. Swain JE, Smith GD. Cryoprotectants. In: Quinn P, Chian RC, editors. *Fertility Cryopreservation* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2010 [cited 2026 Mar 4]. p. 24–38. Available from: <https://www.cambridge.org/core/books/fertility-cryopreservation/cryoprotectants/F31235D226B2AB7049D147E16BDCA431> doi:10.1017/CBO9780511730207.005
6. Sun J, Zhang M, Gehl A, Fricke B, Nawaz K, Gluesenkamp K, et al. COVID 19 vaccine distribution solution to the last mile challenge: Experimental and simulation studies of ultra-low temperature refrigeration system. *Rev Int Froid*. 2022 Jan;133:313–25. doi:10.1016/j.ijrefrig.2021.11.005 PubMed PMID: 34776559; PubMed Central PMCID: PMC8572735.
7. Kypraiou C, Varzakas T. Evolution and Evaluation of Ultra-Low Temperature Freezers: A Comprehensive Literature Review. *Foods*. 2025 Jun

- 28;14(13):2298. doi:10.3390/foods14132298 PubMed PMID: 40647050; PubMed Central PMCID: PMC12248920.
8. Qi K, Jia D, Zhou S, Zhang K, Guan F, Yao M, et al. Cryopreservation of Immune Cells: Recent Progress and Challenges Ahead. *Adv Biol.* 2024 Dec;8(12):e2400201. doi:10.1002/adbi.202400201 PubMed PMID: 39113431.
 9. Huang H, He X, Yarmush ML. Advanced technologies for the preservation of mammalian biospecimens. *Nat Biomed Eng.* 2021 Aug;5(8):793–804. doi:10.1038/s41551-021-00784-z PubMed PMID: 34426675; PubMed Central PMCID: PMC8765766.
 10. Murray KA, Gibson MI. Chemical approaches to cryopreservation. *Nat Rev Chem.* 2022 Aug;6(8):579–93. doi:10.1038/s41570-022-00407-4
 11. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007;368:39–57. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_3 PubMed PMID: 18080461.
 12. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology.* 1977 Jun;14(3):251–72. doi:10.1016/0011-2240(77)90175-4 PubMed PMID: 330113.
 13. Morris GJ, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation--a review. *Cryobiology.* 2013 Apr;66(2):85–92. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.11.007 PubMed PMID: 23246475.
 14. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnol Bioeng.* 2009 Nov 1;104(4):719–28. doi:10.1002/bit.22435 PubMed PMID: 19593758.
 15. Sciorio R, Cantatore C, D'Amato G, Smith GD. Cryopreservation, cryoprotectants, and potential risk of epigenetic alteration. *J Assist Reprod Genet.* 2024 Nov;41(11):2953–67. doi:10.1007/s10815-024-03287-3 PubMed PMID: 39436484; PubMed Central PMCID: PMC11621268.

16. Hubel A. *Preservation of Cells: A Practical Manual*. John Wiley & Sons; 2018. 229 p.
17. Yao X, Matosevic S. Cryopreservation of NK and T cells without DMSO for adoptive cell-based immunotherapy. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther*. 2021 Sep;35(5):529–45. doi:10.1007/s40259-021-00494-7 PubMed PMID: 34427899; PubMed Central PMCID: PMC12376086.
18. Gutteridge JM, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Oct 20;1159(3):248–54. doi:10.1016/0167-4838(92)90052-f PubMed PMID: 1327159.
19. Li R, Johnson R, Yu G, McKenna DH, Hubel A. Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials. *Cytotherapy*. 2019 Sep;21(9):943–57. doi:10.1016/j.jcyt.2019.07.004 PubMed PMID: 31416704; PubMed Central PMCID: PMC6746578.
20. Meneghel J, Kilbride P, Morris GJ. Cryopreservation as a Key Element in the Successful Delivery of Cell-Based Therapies—A Review. *Front Med*. 2020 Nov 26;7. doi:10.3389/fmed.2020.592242
21. Cox MA, Kastrup J, Hrubiško M. Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide. *Cell Tissue Bank*. 2012 Jun;13(2):203–15. doi:10.1007/s10561-011-9248-2 PubMed PMID: 21394484.
22. Schultz-Cherry S. Role of NK cells in influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:109–20. doi:10.1007/82_2014_403 PubMed PMID: 24992894.
23. Zhang J, Yin Z, Liang Z, Bai Y, Zhang T, Yang J, et al. Impacts of cryopreservation on phenotype and functionality of mononuclear cells in

- peripheral blood and ascites. *J Transl Intern Med.* 2024 Feb;12(1):51–63. doi:10.2478/jtim-2023-0136 PubMed PMID: 38525442; PubMed Central PMCID: PMC10956725.
24. Letafati A, Ardekani OS, Naderisemiromi M, Norouzi M, Shafiei M, Nik S, et al. Unraveling the dynamic mechanisms of natural killer cells in viral infections: insights and implications. *Virol J.* 2024 Jan 12;21(1):18. doi:10.1186/s12985-024-02287-0 PubMed PMID: 38216935; PubMed Central PMCID: PMC10785350.
 25. Maia A, Tarannum M, Lérias JR, Piccinelli S, Borrego LM, Maeurer M, et al. Building a Better Defense: Expanding and Improving Natural Killer Cells for Adoptive Cell Therapy. *Cells.* 2024 Mar 5;13(5):451. doi:10.3390/cells13050451 PubMed PMID: 38474415; PubMed Central PMCID: PMC10930942.
 26. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001 Nov;22(11):633–40. doi:10.1016/s1471-4906(01)02060-9 PubMed PMID: 11698225.
 27. van Erp EA, van Kampen MR, van Kasteren PB, de Wit J. Viral Infection of Human Natural Killer Cells. *Viruses.* 2019 Mar;11(3):243. doi:10.3390/v11030243
 28. Islam R, Pupovac A, Evtimov V, Boyd N, Shu R, Boyd R, et al. Enhancing a Natural Killer: Modification of NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Cells.* 2021 May;10(5):1058. doi:10.3390/cells10051058
 29. Lanier LL. Five decades of natural killer cell discovery. *J Exp Med.* 2024 Aug 5;221(8):e20231222. doi:10.1084/jem.20231222 PubMed PMID: 38842526; PubMed Central PMCID: PMC11157086.
 30. Kärre K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):477–80. doi:10.1038/ni0508-477 PubMed PMID: 18425103.

31. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017 Sep 13;8. doi:10.3389/fimmu.2017.01124
32. Judge SJ, Murphy WJ, Canter RJ. Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:49. doi:10.3389/fcimb.2020.00049 PubMed PMID: 32117816; PubMed Central PMCID: PMC7031155.
33. Samji T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale J Biol Med.* 2009 Dec;82(4):153–9. PubMed PMID: 20027280; PubMed Central PMCID: PMC2794490.
34. Smith DM, Schafer JR, Tullius B, Witkam L, Paust S. Natural killer cells for antiviral therapy. *Sci Transl Med.* 2023 Jan 4;15(677):eabl5278. doi:10.1126/scitranslmed.abl5278 PubMed PMID: 36599006.
35. Mendelson M, Tekoah Y, Zilka A, Gershoni-Yahalom O, Gazit R, Achdout H, et al. NKp46 O-glycan sequences that are involved in the interaction with hemagglutinin type 1 of influenza virus. *J Virol.* 2010 Apr;84(8):3789–97. doi:10.1128/JVI.01815-09 PubMed PMID: 20147410; PubMed Central PMCID: PMC2849520.
36. Cianci C, Gerritz SW, Deminie C, Krystal M. Influenza nucleoprotein: promising target for antiviral chemotherapy. *Antivir Chem Chemother.* 2012 Jul 26;23(3):77–91. doi:10.3851/IMP2235 PubMed PMID: 22837443.
37. 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. doi:10.1016/0042-6822(85)90131-x PubMed PMID: 2416114.
38. Bodewes R, Geelhoed-Mieras MM, Wrammert J, Ahmed R, Wilson PC, Fouchier RAM, et al. In Vitro Assessment of the Immunological Significance

of a Human Monoclonal Antibody Directed to the Influenza A Virus Nucleoprotein. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2013 Aug;20(8):1333–7. doi:10.1128/CVI.00339-13 PubMed PMID: 23761662; PubMed Central PMCID: PMC3754521.

39. Du N, Guo F, Wang Y, Cui J. NK Cell Therapy: A Rising Star in Cancer Treatment. *Cancers*. 2021 Aug 17;13(16):4129. doi:10.3390/cancers13164129 PubMed PMID: 34439285; PubMed Central PMCID: PMC8394762.
40. Berrien-Elliott MM, Jacobs MT, Fehniger TA. Allogeneic natural killer cell therapy. *Blood*. 2023 Feb 23;141(8):856–68. doi:10.1182/blood.2022016200 PubMed PMID: 36416736; PubMed Central PMCID: PMC10023727.
41. Caporale JR, Naeimi Kararoudi M, Lamb MG, Lee DA. Dark NKnight rising: a current perspective on NK cell and CAR-NK cell therapy. *Cytotherapy*. 2025 Jul;27(7):812–25. doi:10.1016/j.jcyt.2025.04.064 PubMed PMID: 40459488.
42. Lee DA. Cellular therapy: Adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunol Rev*. 2019;290(1):85–99. doi:10.1111/imr.12793
43. Fang F, Wang W, Chen M, Tian Z, Xiao W. Technical advances in NK cell-based cellular immunotherapy. *Cancer Biol Med*. 2019 Nov;16(4):647–54. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0187 PubMed PMID: 31908885; PubMed Central PMCID: PMC6936239.
44. Zhao X, Lin M, Huang X. Current status and future perspective of natural killer cell therapy for cancer. *Med Rev*. 3(4):305–20. doi:10.1515/mr-2023-0031 PubMed PMID: 38235405; PubMed Central PMCID: PMC10790210.
45. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30264.

doi:10.1371/journal.pone.0030264 PubMed PMID: 22279576; PubMed Central PMCID: PMC3261192.

46. Oyer JL, Pandey V, Igarashi RY, Somanchi SS, Zakari A, Solh M, et al. Natural killer cells stimulated with PM21 particles expand and biodistribute in vivo: Clinical implications for cancer treatment. *Cytotherapy*. 2016 May;18(5):653–63. doi:10.1016/j.jcyt.2016.02.006 PubMed PMID: 27059202.
47. Oyer JL, Croom-Perez TJ, Dieffenthaler TA, Robles-Carillo LD, Gitto SB, Altomare DA, et al. Cryopreserved PM21-Particle-Expanded Natural Killer Cells Maintain Cytotoxicity and Effector Functions In Vitro and In Vivo. *Front Immunol*. 2022 Apr 7;13. doi:10.3389/fimmu.2022.861681
48. Romee R, Leong JW, Fehniger TA. Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica*. 2014;2014:205796. doi:10.1155/2014/205796 PubMed PMID: 25054077; PubMed Central PMCID: PMC4099226.
49. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, et al. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3633–8. doi:10.1182/blood-2001-12-0293 PubMed PMID: 12393617.
50. Mujal AM, Delconte RB, Sun JC. Natural Killer Cells: From Innate to Adaptive Features. *Annu Rev Immunol*. 2021 Apr 26;39(Volume 39, 2021):417–47. doi:10.1146/annurev-immunol-101819-074948
51. Domínguez-Andrés J, Joosten LA, Netea MG. Induction of innate immune memory: the role of cellular metabolism. *Curr Opin Immunol*. 2019 Feb;56:10–6. doi:10.1016/j.coi.2018.09.001 PubMed PMID: 30240964.
52. 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.

doi:10.1053/j.seminhematol.2020.11.003 PubMed PMID: 33256911;
PubMed Central PMCID: PMC7810422.

53. van Willigen WW, Bloemendal M, Gerritsen WR, Schreibelt G, de Vries IJM, Bol KF. Dendritic Cell Cancer Therapy: Vaccinating the Right Patient at the Right Time. *Front Immunol*. 2018;9:2265. doi:10.3389/fimmu.2018.02265 PubMed PMID: 30327656; PubMed Central PMCID: PMC6174277.
54. Buhl T, Legler TJ, Rosenberger A, Schardt A, Schön MP, Haenssle HA. Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2012 Nov;61(11):2021–31. doi:10.1007/s00262-012-1262-0 PubMed PMID: 22527251; PubMed Central PMCID: PMC3493671.
55. Usero L, Miralles L, Esteban I, Pastor-Quiñones C, Maleno MJ, Leal L, et al. Feasibility of using monocyte-derived dendritic cells obtained from cryopreserved cells for DC-based vaccines. *J Immunol Methods*. 2021 Nov;498:113133. doi:10.1016/j.jim.2021.113133 PubMed PMID: 34480950.
56. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010 Mar 18;115(11):2167–76. doi:10.1182/blood-2009-08-238469
57. Peters JH, Preijers FW, Woestenenk R, Hilbrands LB, Koenen HJPM, Joosten I. Clinical grade Treg: GMP isolation, improvement of purity by CD127 Depletion, Treg expansion, and Treg cryopreservation. *PloS One*. 2008 Sep 8;3(9):e3161. doi:10.1371/journal.pone.0003161 PubMed PMID: 18776930; PubMed Central PMCID: PMC2522271.
58. Seale AC, de Jong BC, Zaidi I, Duvall M, Whittle H, Rowland-Jones S, et al. Effects of cryopreservation on CD4+ CD25+ T cells of HIV-1 infected individuals. *J Clin Lab Anal*. 2008;22(3):153–8. doi:10.1002/jcla.20234 PubMed PMID: 18484654; PubMed Central PMCID: PMC6649017.

59. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):1061–70. doi:10.1182/blood-2010-07-293795 PubMed PMID: 20952687; PubMed Central PMCID: PMC3035067.
60. Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015 Sep 10;373(11):1040–7. doi:10.1056/NEJMoa1504542 PubMed PMID: 26352815; PubMed Central PMCID: PMC4646711.
61. Xu H, Cao W, Huang L, Xiao M, Cao Y, Zhao L, et al. Effects of cryopreservation on chimeric antigen receptor T cell functions. *Cryobiology*. 2018 Aug;83:40–7. doi:10.1016/j.cryobiol.2018.06.007 PubMed PMID: 29908946.
62. Klingemann H. Challenges of cancer therapy with natural killer cells. *Cytotherapy*. 2015 Mar;17(3):245–9. doi:10.1016/j.jcyt.2014.09.007 PubMed PMID: 25533934.
63. Berg M, Lundqvist A, McCoy P, Samsel L, Fan Y, Tawab A, et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009;11(3):341–55. doi:10.1080/14653240902807034 PubMed PMID: 19308771; PubMed Central PMCID: PMC2736058.
64. Damodharan SN, Walker KL, Forsberg MH, McDowell KA, Bouchlaka MN, Drier DA, et al. Analysis of ex vivo expanded and activated clinical-grade human NK cells after cryopreservation. *Cytotherapy*. 2020 Aug;22(8):450–7. doi:10.1016/j.jcyt.2020.05.001 PubMed PMID: 32536506; PubMed Central PMCID: PMC7387178.

65. Mark C, Czerwinski T, Roessner S, Mainka A, Hörsch F, Heublein L, et al. Cryopreservation impairs 3-D migration and cytotoxicity of natural killer cells. *Nat Commun.* 2020 Oct 16;11(1):5224. doi:10.1038/s41467-020-19094-0 PubMed PMID: 33067467; PubMed Central PMCID: PMC7568558.
66. Min B, Choi H, Her JH, Jung MY, Kim HJ, Jung M young, et al. Optimization of Large-Scale Expansion and Cryopreservation of Human Natural Killer Cells for Anti-Tumor Therapy. *Immune Netw.* 2018 Aug 13;18(4). doi:10.4110/in.2018.18.e31
67. Berjis A, Muthumani D, Aguilar OA, Pomp O, Johnson O, Finck AV, 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. doi:10.1038/s41467-024-47574-0 PubMed PMID: 38729924; PubMed Central PMCID: PMC11087472.
68. Holubova M, Miklikova M, Leba M, Georgiev D, Jindra P, Caprnda M, et al. Cryopreserved NK cells in the treatment of haematological malignancies: preclinical study. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016 Sep 10;142(12):2561–7. doi:10.1007/s00432-016-2247-8 PubMed PMID: 27614454; PubMed Central PMCID: PMC11819048.
69. 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. doi:10.1038/ni1332 PubMed PMID: 16617337.
70. 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;11(12):1127–35. doi:10.1038/ni.1953 PubMed PMID: 20972432; PubMed Central PMCID: PMC2982944.
71. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2009 Feb 10;106(6):1915–9. doi:10.1073/pnas.0813192106 PubMed PMID: 19181844; PubMed Central PMCID: PMC2644138.
72. 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. doi:10.1182/blood-2012-04-419283 PubMed PMID: 22983442; PubMed Central PMCID: PMC3520618.
73. 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. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2014 Apr;20(4):463–73. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.006 PubMed PMID: 24434782; PubMed Central PMCID: PMC3959288.
74. 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):357ra123. doi:10.1126/scitranslmed.aaf2341 PubMed PMID: 27655849; PubMed Central PMCID: PMC5436500.
75. Terrén I, Orrantia A, Mosteiro A, Vitallé J, Zenarruzabeitia O, Borrego F. Metabolic changes of Interleukin-12/15/18-stimulated human NK cells. *Sci Rep*. 2021 Mar 19;11(1):6472. doi:10.1038/s41598-021-85960-6 PubMed PMID: 33742092; PubMed Central PMCID: PMC7979769.
76. 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;5(9):e1219009. doi:10.1080/2162402X.2016.1219009 PubMed PMID: 27757318; PubMed Central PMCID: PMC5048776.
77. Becker-Hapak MK, Shrestha N, McClain E, Dee MJ, Chaturvedi P, Leclerc GM, et al. A Fusion Protein Complex that Combines IL-12, IL-15, and IL-18

- Signaling to Induce Memory-Like NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2021 Sep 1;9(9):1071–87. doi:10.1158/2326-6066.CIR-20-1002
78. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature.* 2009 Jan 29;457(7229):557–61. doi:10.1038/nature07665 PubMed PMID: 19136945; PubMed Central PMCID: PMC2674434.
79. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011 Aug 26;11(10):645–57. doi:10.1038/nri3044 PubMed PMID: 21869816; PubMed Central PMCID: PMC4408539.
80. Brillantes M, Beaulieu AM. Memory and Memory-Like NK Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:102. doi:10.3389/fcimb.2020.00102 PubMed PMID: 32269968; PubMed Central PMCID: PMC7109401.
81. Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, et al. Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood.* 2006 May 1;107(9):3624–31. doi:10.1182/blood-2005-09-3682 PubMed PMID: 16384928.
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;19(5):453–63. doi:10.1038/s41590-018-0082-6 PubMed PMID: 29632329.
83. Cichocki F, Wu CY, Zhang B, Felices M, Tesi B, Tuininga K, et al. ARID5B regulates metabolic programming in human adaptive NK cells. *J Exp Med.* 2018 Sep 3;215(9):2379–95. doi:10.1084/jem.20172168 PubMed PMID: 30061358; PubMed Central PMCID: PMC6122973.

84. Liu LL, Landskron J, Ask EH, Enqvist M, Sohlberg E, Traherne JA, et al. Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Rep.* 2016 May 3;15(5):1088–99. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.005 PubMed PMID: 27117418; PubMed Central PMCID: PMC4858565.
85. 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;10(3):e0121258. doi:10.1371/journal.pone.0121258 PubMed PMID: 25781472; PubMed Central PMCID: PMC4363902.
86. 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. *J Immunol.* 2016 Jul 1;197(1):313–25. doi:10.4049/jimmunol.1502049 PubMed PMID: 27233958; PubMed Central PMCID: PMC4911617.
87. 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):10.1128/jvi.00165-21. doi:10.1128/jvi.00165-21
88. 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 8;8(90):eadi3974. doi:10.1126/sciimmunol.adi3974 PubMed PMID: 38064568; PubMed Central PMCID: PMC11104516.
89. Montes Zapata EI. Desarrollo de células NK de tipo memoria específicas de la nucleoproteína para el control de la infección por el virus de influenza AH1N1 pdm09 [masters] [Internet]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2025 [cited 2026 Apr 13]. Available from: <http://eprints.uanl.mx/30154/>

90. Rutella S, Vadakekolathu J, Cashen AF, Mahajan N, Ruiz-Heredia Y, Martín-Muñoz A, et al. Adoptively Infused Memory-like Natural Killer Cells Impact Adaptive Immune Responses in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2023 Nov 2;65th ASH Annual Meeting Abstracts142:4813. doi:10.1182/blood-2023-184986
91. Rutella S, Muth J, Vadakekolathu J, Leedom T, Hamil A, Arthur L, et al. WU-NK-101 (W-NK), a Memory-like (ML) NK Cell, Intrinsically Overcomes Factors Restricting Adoptive Cell Therapy (ACT) in Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2023 Nov 2;142(Supplement 1):466. doi:10.1182/blood-2023-184923
92. Sullivan R, Mathyer M, Govero J, Dean J, Martens A, Zhou Y, et al. 188 Development of WU-NK-101, a feeder cell-free expanded allogeneic memory NK cell product with potent anti-tumor activity. *J Immunother Cancer*. 2021 Nov 10;9(Suppl 2). doi:10.1136/jitc-2021-SITC2021.188 PubMed PMID: 10.1136/jitc-2021-SITC2021.188.
93. Shapiro RM, Sheffer M, Booker MA, Tolstorukov MY, Birch GC, Sadel-Feldman M, et al. First-in-human evaluation of memory-like NK cells with an IL-15 super-agonist and CTLA-4 blockade in advanced head and neck cancer. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2025 Feb 14;18(1):17. doi:10.1186/s13045-025-01669-3 PubMed PMID: 39948608; PubMed Central PMCID: PMC11827236.
94. Hernández-Blanco C, Al-Akioui-Sanz K, Herrera L, Aguirre-Portolés C, Lozano-Ojalvo D, Pérez-Rodríguez L, et al. The phase I RELEASE clinical trial to evaluate the safety of NK cells in COVID-19. *iScience*. 2025 Feb 21;28(2):111698. doi:10.1016/j.isci.2024.111698
95. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*. 2010;27(1):53–62. doi:10.14573/altex.2010.1.53 PubMed PMID: 20390239.

96. Rowley SD, Feng Z, Chen L, Holmberg L, Heimfeld S, MacLeod B, et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Jun;31(11):1043–51. doi:10.1038/sj.bmt.1704030
97. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Comparison of the Effects of Different Cryoprotectants on Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells Int.* 2016;2016(1):1396783. doi:10.1155/2016/1396783
98. Smagur A, Mitrus I, Ciomber A, Panczyniak K, Fidyk W, Sados-Wojciechowska M, et al. Comparison of the cryoprotective solutions based on human albumin vs. autologous plasma: its effect on cell recovery, clonogenic potential of peripheral blood hematopoietic progenitor cells and engraftment after autologous transplantation. *Vox Sang.* 2015;108(4):417–24. doi:10.1111/vox.12238
99. Akel S, Regan D, Wall D, Petz L, McCullough J. Current thawing and infusion practice of cryopreserved cord blood: the impact on graft quality, recipient safety, and transplantation outcomes. *Transfusion (Paris).* 2014;54(11):2997–3009. doi:10.1111/trf.12719
100. Herrera L, Martin-Inaraja M, Santos S, Inglés-Ferrández M, Azkarate A, Perez-Vaquero MA, et al. Identifying SARS-CoV-2 “memory” NK cells from COVID-19 convalescent donors for adoptive cell therapy. *Immunology.* 2022 Feb;165(2):234–49. doi:10.1111/imm.13432 PubMed PMID: 34775592; PubMed Central PMCID: PMC8652867.
101. Lecchi L, Giovanelli S, Gagliardi B, Pezzali I, Ratti I, Marconi M. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci.* 2016 Jun 1;54(3):324–36. doi:10.1016/j.transci.2016.05.009

102. Herrera L, Martin-Inaraja M, Santos S, Inglés-Ferrándiz M, Azkarate A, Perez-Vaquero MA, et al. Identifying SARS-CoV-2 “memory” NK cells from COVID-19 convalescent donors for adoptive cell therapy. *Immunology*. 2022 Feb;165(2):234–49. doi:10.1111/imm.13432 PubMed PMID: 34775592; PubMed Central PMCID: PMC8652867.
103. 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 17;42(3):443–56. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.008 PubMed PMID: 25786176; PubMed Central PMCID: PMC4612277.
104. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3865–74. doi:10.1182/blood-2010-04-282301 PubMed PMID: 20733159; PubMed Central PMCID: PMC2981540.
105. Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, et al. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3366–9. doi:10.1182/blood-2005-03-1100
106. Eller MA, Eller LA, Ouma BJ, Thelian D, Gonzalez VD, Guwatudde D, et al. Elevated natural killer cell activity despite altered functional and phenotypic profile in Ugandans with HIV-1 clade A or clade D infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Aug 1;51(4):380–9. doi:10.1097/QAI.0b013e3181aa256e PubMed PMID: 19487954.
107. LAPTEVA N, DURETT AG, SUN J, ROLLINS LA, HUYE LL, FANG J, et al. Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*. 2012 Oct;14(9):1131–43.

doi:10.3109/14653249.2012.700767 PubMed PMID: 22900959; PubMed Central PMCID: PMC4787300.

108. Zhou X, Zhang S, Yang W, Gonder S, Sadjadi Z, Piernitzki N, et al. Restoring NK Cell Cytotoxicity Post-Cryopreservation via Synthetic Cells. *Adv Sci.* 2025;12(42):e05731. doi:10.1002/advs.202505731
109. El Assal R, Abou-Elkacem L, Tocchio A, Pasley S, Matosevic S, Kaplan DL, et al. Bioinspired Preservation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Adv Sci.* 2019;6(6):1802045. doi:10.1002/advs.201802045
110. Oh E, Min B, Li Y, Lian C, Hong J, Park G min, et al. Cryopreserved Human Natural Killer Cells Exhibit Potent Antitumor Efficacy against Orthotopic Pancreatic Cancer through Efficient Tumor-Homing and Cytolytic Ability. *Cancers.* 2019 Jul;11(7):966. doi:10.3390/cancers11070966
111. Dyer WB, Suzuki K, Levert A, Starr M, Lloyd AR, Zaunders JJ. Preservation of functionality, immunophenotype, and recovery of HIV RNA from PBMCs cryopreserved for more than 20 years. *Front Immunol.* 2024 Aug 16;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1382711

PRODUCCIÓN ACADÉMICA

Los resultados de este trabajo fueron presentados en diversos congresos nacionales:

Congreso	Lugar y Fecha	Título	Modalidad
XLIX Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica	Monterrey, Nuevo León, del 14 al 17 de mayo de 2025.	Incremento de la expresión de NKG2C y Granzima B en células NK de sujetos vacunados contra el virus de influenza A	Póster
XXVI Congreso Nacional de Inmunología	Chihuahua, Chihuahua, del 28 de septiembre al 2 de octubre de 2025.	Cryopreservation induces changes in phenotype and functionality of antigen-specific NK cells	Póster y presentación Oral
XXVI Congreso Nacional de Química Clínica Y Medicina de Laboratorio	Puebla de Zaragoza, Puebla, del 29 de abril al 3 de mayo de 2026.	Las células NK tipo memoria específicas para la nucleoproteína de influenza a expresan marcadores de activación y muestran mayor citotoxicidad en células A549 infectadas.	Póster y presentación Oral
L Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica	Guadalajara, Jalisco, del 6 al 9 de mayo de 2026.	Efecto de la criopreservación en células NK específicas para la NP del virus de la Influenza A	Póster

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Fernanda Michelle Velarde Rocha

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

Título de tesis: Análisis del efecto de la criopreservación en el inmunofenotipo y la funcionalidad de las células NK de tipo memoria específicas para la nucleoproteína del virus de la Influenza A H1N1 pdm09.

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México el 21 de agosto de 2001, hija de José Rafael Velarde Fernández y Enriqueta Dinorah Rocha Mata.

Educación:

Químico Clínico Biólogo, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. 2024.