

## KNOCK OUT DE CD16B EN UNA LÍNEA CELULAR NEUTROFÍLICA COMO PRUEBA DE CONCEPTO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE UNA TERAPIA CELULAR PARA REDUCIR RIESGOS DE ALOINMUNIZACIÓN

José A. Cruz-Cárdenas<sup>1</sup>, Mabel Rodríguez-González<sup>2</sup>, Héctor Cabrera-Fuentes<sup>1</sup>, Laureano de la Vega<sup>3</sup>, Laura A. Palomares<sup>2</sup>, Marion E. G. Brunck<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Biotecnología-FEMSA, ITESM, Monterrey N.L. Cp. 64849. [marion.brunck@tec.mx](mailto:marion.brunck@tec.mx). <sup>2</sup>Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos. Cp.62210. <sup>3</sup>Division of Cancer Research, School of Medicine, University of Dundee, Dundee, Scotland.  
*Palabras clave: CRISPR/Cas9, Knock-Out, Terapia Celular.*

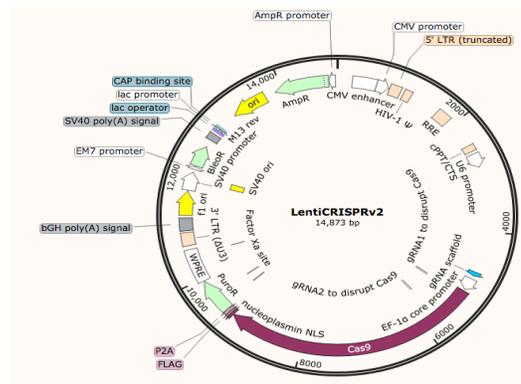
**Introducción.** La neutropenia es un efecto secundario del tratamiento con quimioterapia en pacientes con leucemia. Se caracteriza por una disminución crítica de neutrófilos en sangre, y tiene como consecuencia un aumento del riesgo de infecciones en los pacientes afectados. Actualmente, una estrategia para prevenir o tratar infecciones neutropénicas es la transfusión de neutrófilos de donantes, sin embargo este tratamiento puede generar diversas complicaciones clínicas. Durante la transfusión, las células del sistema inmune del hospedero pueden producir anticuerpos contra ciertas proteínas presentes en la superficie de los neutrófilos del donante, lo que puede promover el desarrollo de condiciones adversas tales como la neutropenia aloinmune, o la lesión pulmonar aguda producida por transfusión (TRALI, por sus siglas en inglés), entre otras. Existen reportes que indican que los anticuerpos producidos contra las proteínas CD16b y CD177 están relacionados con el desarrollo de condiciones clínicas adversas (1). Se han reportado casos de fenotipo nulo para CD16b y CD177 en neutrófilos humanos, sin pérdida de función inmunológica. Esto es debido a que esas deficiencias se ven compensadas por la regulación de CD32 y CD87 (Tabla 1), respectivamente (1,2,3,4).

En el contexto del desarrollo y optimización de una terapia universal de neutrófilos, surge la posibilidad de optimizar células desarrolladas *in vitro* para prevenir casos de aloinmunización. Aquí proponemos, como prueba de concepto, modificar el genoma de la línea celular promielocítica HL-60 mediante el Knock-Out de CD16b y posteriormente diferenciarla a neutrófilos para evaluar su fenotipo y función inmunológica. A largo plazo, se pretende contribuir con una terapia universal de neutrófilos más segura que la de neutrófilos de donantes, que reduzca los efectos adversos relacionados con la transfusión de neutrófilos y que pueda ser utilizada en pacientes que presenten la condición de neutropenia.

**Metodología.** Se diseñó una estrategia de producción *ex vivo* de neutrófilos derivados de la línea celular HL-60 genéticamente modificados por el Knock-Out del gen CD16b (HNA-1) usando herramientas CRISPR/Cas 9 y recombinación homóloga con el Knock-In de una proteína fluorescente, o Knock-Out mediante NHEJ. Se diseñaron RNA guías y se clonaron en el vector lentiCRISPR v2. Posteriormente, se transfectó la línea celular HL-60 con esta construcción usando polietilimina y una vez comprobada la modificación genética en clonas aisladas, se diferenciaron a neutrófilos mediante DMSO, y se evaluó el fenotipo usando citometría de flujo y qRT-PCR.

**Resultados.** Se diseñaron *in silico* las construcciones del sistema CRISPR/CAS9 usando el plásmido lentiCRISPR v2 (Fig.

1) y el software SnapGene Viewer, posteriormente se realizaron las construcciones *in vitro* y con las construcciones resultantes se transfectaron células de la línea celular HL-60 usando polietilimina, se comprobó la edición genética mediante secuenciación Sanger, y se diferenciaron las nuevas líneas celulares hasta neutrófilos. Posteriormente se analizó el fenotipo celular mediante citometría de flujo.



**Fig. 1. Plásmido lentiCRISPR v2.** Mapa del plásmido lentiCRISPR v2, los RNA guía se clonaron en este plásmido que ya incluye la secuencia codificante para Cas 9.

**Tabla 1.** Reportes de ausencia de CD16b y CD177 en pacientes.

Molécula	Ausencia compensada por	Autores que lo reportan
CD16b (HNA-1)	CD32	Flesch et al., 2018; Muschter et al., 2018
CD177 (HNA-2)	CD87	Stroncek et al., 2004

**Conclusiones.** Se evaluó el fenotipo mediante citometría de flujo y qRT-PCR y se logró evidenciar la eliminación de CD16b en neutrófilos derivados de la línea celular HL-60.

### Bibliografía.

- Flesch B, Reil A. (2018). *Transfus Med Hemother.* 45(10): 300-309.
- Muschter S et al., (2011). *Current opinion in hematology.* 18(9): 452-460.
- Riera N et al., (2009). *Medicina Casuística.* 69(5):442-446.
- Stroncek et al., (2004) *J. Trans Medicine.* 2(9): 8-17.
- “SnapGene software (from GSL Biotech; available at [snapgene.com](http://snapgene.com)).

