

**CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE DEFECTOS EN EL NÚMERO Y
FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS NKT INVARIANTES EN PACIENTES CON
INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE**

Por:

LUCÍA VICTORIA ERAZO BORRÁS, Ingeniera Biológica

**Tesis sometida para obtener el título de Maestro en Microbiología y
Bioanálisis, Área Inmunología**

Tutor:

CLAUDIA MILENA TRUJILLO VARGAS, Bact.,MSc, PhD

Grupo de Inmunodeficiencias Primarias

Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia

PROGRAMA MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

2015

**CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE DEFECTOS EN EL NÚMERO Y
FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS NKT INVARIANTES EN PACIENTES CON
INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE**

Por:

LUCÍA VICTORIA ERAZO BORRÁS, Ingeniera Biológica

**Tesis sometida para obtener el título de Maestro en Microbiología y
Bioanálisis, Área Inmunología**

Comité Tutorial:

Carlos Julio Montoya, MD, MSc, PhD

Andrés Baena MSc, PhD

Claudia Milena Trujillo Vargas, Bact., MSc, PhD

Grupo de Inmunodeficiencias Primarias

Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

PROGRAMA MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

2015

DEDICATORIA

A mis padres y hermana, Gladys, Omar y Camila que aún en la distancia me brindaron su amorosa comprensión, su entrega y apoyo incondicional.

A mi familia paterna y materna, que con su fe en mí, me impulsan cada día a mejorar y a creer en mis metas.

A Gabriel, por ser mi amigo y compañero en este proceso.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Claudia Milena Trujillo, quien me brindó la oportunidad de entrar al mundo de la inmunología y quien con su perseverancia, paciencia y apoyo, me ayudó a formarme como investigadora y ser una mejor persona. Muchas gracias por guiarme en este proceso.

Al profesor Juan Álvaro López, por creer en mi capacidad de aprendizaje y apoyar mi formación en el campo de la inmunología.

A los integrantes del Grupo IDP: Los profesores José Luis Franco, Mónica Giraldo, Julio César Orrego, Andrés Arias, a mis compañeros y amigos Jesús Armando Álvarez, Camilo Pérez, Catalina Martínez, Sebastián Gutiérrez, Estefanía Vásquez, Diego Góngora, Isaura Sánchez, Carolyn Álvarez y Alexander Franco.

A los pacientes, quienes son el principal motivo para desarrollar esta investigación y contribuyeron desinteresadamente para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Citometría de la Universidad de Antioquia, en especial al profesor Mauricio Rojas, por su contribución en la ejecución de nuestros objetivos.

A la Unidad de Inmunología Experimental dirigida por Paolo Dellabona, en Milán, Italia, por su cordial recibimiento en el desarrollo de mi pasantía.

A Colciencias y al Grupo IDP de la Universidad de Antioquia por la financiación y el soporte locativo para el desarrollo de esta investigación.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la culminación exitosa de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	5
2. SUMMARY	9
3. PREFACIO GENERAL	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
5. OBJETIVOS.....	17
5.1. Objetivo General	17
5.2. Objetivos Específicos	17
6. CAPITULO I.....	18
7. CAPITULO II.....	27
7.1. INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE	27
7.2. FASES DE DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LOS LB	28
7.3. PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS.....	37
7.4. MECANISMOS DE COOPERACIÓN DE LOS LNKTi A LOS LB	44
7.5. LNKTi EN PACIENTES CON ICV	51
8. CAPITULO III.....	53
9. DISCUSIÓN GENERAL.....	86
10.PRINCIPALES APORTES DE LA INVESTIGACION	96
11.REFERENCIAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1. RESUMEN

La inmunodeficiencia común variable (ICV) es la inmunodeficiencia primaria (IDP) sintomática más frecuente en el mundo y en la mayoría de los pacientes se desconocen sus bases genéticas y moleculares. Esta enfermedad está caracterizada por hipogamaglobulinemia y producción deficiente de anticuerpos específicos, hallazgos asociados a infecciones sinopulmonares y gastrointestinales que generan múltiples complicaciones y pueden llevar a la muerte. Entre los pocos defectos genéticos que se han caracterizado en ICV, se han involucrado moléculas implicadas en el reconocimiento de antígenos por los linfocitos B (LB) o en la coestimulación que otras células del sistema inmune le brindan a estos linfocitos para inducir una respuesta inmune adecuada. En adición a la distribución anormal en sangre periférica (SP) de las subpoblaciones de LB en los pacientes con ICV, se han reportado anomalías en el número y función de los linfocitos NKT invariantes (LNKTI) en estos pacientes. Sin embargo, no se ha realizado un análisis más detallado de la interacción de los LNKTI con otras células del sistema inmune en ICV y su relevancia en el fenotipo clínico de este síndrome. Por este motivo, en esta investigación se caracterizó el número, fenotipo y función de los LNKTI obtenidos de SP de los pacientes con ICV y de forma más relevante, se evaluó la capacidad de estos linfocitos de proveer ayuda de contacto *in vitro* a los LB y a su vez, la capacidad de respuesta de los LB a antígenos glicolipídicos en el contexto de ICV

El primer objetivo de esta tesis fue realizar una caracterización fenotípica de los LNKTI en el contexto de ICV. Se observó una profunda disminución en los números absolutos de los LNKTI doble negativos (DN, CD4⁻CD8⁻) y en una menor

instancia de aquellos CD4⁺, en concomitancia con una reducción numérica de los LNKTi efectoras CCR5⁺/CXCR3⁺. A partir de estos hallazgos, se postula que los LNKTi DN, reportados como células Th1 pueden migrar y actuar como células efectoras en tejidos periféricos para el control de infecciones recurrentes de los pacientes con ICV, con su consecuente disminución en SP.

Por otra parte, se evaluó la función de los LNKTi después de una estimulación inespecífica de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con PMA/ionomicina. Se encontró que en un estado basal, los LNKTi CD40L^{high} están enriquecidos en las CMSP de los pacientes con ICV. En los linfocitos T (LT), una alta expresión de CD40L se relaciona con un fenotipo de memoria. Esto permite inferir, que existe una acumulación de los LNKTi CD40L^{high} activados en SP de los pacientes con ICV. Después del estímulo, se observó una disminución en la frecuencia de los LNKTi productores de IFN- α y TNF- α en estos pacientes, muy probablemente debido a la ausencia de los LNKTi CCR5⁺/CXCR3⁺ efectoras.

El último objetivo de este trabajo fue determinar la habilidad de los LNKTi CD4⁺ para proporcionar ayuda de contacto a los LB. Se observó que los LB de los pacientes no proliferaron ante el estímulo de LNKTi CD4⁺ autólogos pulsados con α -GalactosilCeramida (α GalCer) y que esta función no se recupera aún en presencia de los LNKTi CD4⁺ pulsados de los donantes sanos (DS). Sin embargo, los LB de los DS, proliferan tanto en cultivos autólogos como heterólogos. A pesar del defecto proliferativo en los LB de los pacientes, estos aún conservan la capacidad de secretar inmunoglobulinas (Igs) en niveles comparables a los secretados por los LB de DS, ya sea en cultivos autólogos o heterólogos. Estos hallazgos podrían ser debido a una disminución en los LNKTi ayudadores foliculares (LNKTi_{fh}) que se ha observado son aquellos linfocitos con mayor capacidad de inducir proliferación y respuesta de anticuerpos de los LB. Para esto, se evaluó la doble expresión de CD45RO y CXCR5 en los LNKTi en SP de

pacientes con ICV y DS como marcadores del fenotipo LNKT_{ifh}. De manera sorprendente, se observó una frecuencia incrementada de los LNKT_{ifh} en SP de los pacientes con ICV. Esto sugiere que el defecto en ICV parece ser debido a un problema intrínseco de los LB de los pacientes al ser estimulados por LNKT_{is} y no a las LNKT_{is} per se.

No obstante, otro elemento importante para el establecimiento de la ayuda de contacto LNKT_i:LB es la expresión intracelular de la molécula llamada proteína asociada a SLAM (SAP). Por esta razón, se evaluó la expresión intracelular de SAP en los LNKT_i contenidos en las CMSP de pacientes con ICV y DS comparados con la expresión de esta molécula en los linfocitos NK y LT de SP. De manera importante, este estudio logró establecer que los LNKT_i, NK y LT de los pacientes con ICV presentan una reducción importante en el índice de expresión intracelular de SAP. Previamente se ha demostrado que en modelos de ratones deficientes en SAP, existe una profunda reducción del tiempo de interacción LT:LB, hecho que impide la formación de CG e induce una salida rápida de los LT_{ifh} de los folículos del bazo, sin embargo, el contacto celular es suficiente para generar una respuesta de anticuerpos primaria. Estos reportes previos nos permiten sugerir, que el defecto en la proliferación de los LB de los pacientes con ICV observados en los co-cultivos de LNKT_i:LB, está relacionado con la baja expresión intracelular de SAP en los linfocitos de estos pacientes. Estos resultados parecen contradictorios debido a que a pesar que los LNKT_i de DS tienen niveles normales de SAP, no estimulan la proliferación de LB. Sin embargo, Detre y colaboradores demostraron que la deficiencia de SAP, afecta la respuesta humoral de los LB dependiendo de su entorno genético. Nosotros sugerimos que debido al background genético de los LB de pacientes con ICV, ellos no pueden responder a los LNKT_i de DS, aunque estos expresen niveles normales de SAP

En conclusión, estos resultados demuestran que la disminución de los LNKTi en SP de los pacientes con ICV es específica de estos linfocitos con un fenotipo efector, probablemente por su migración a sitios de inflamación. Adicionalmente, el enriquecimiento de LNKTi CD40L^{high} en las CMSP y los altos porcentajes de LNKTi_{fh} en SP de los pacientes, apoya la hipótesis de una salida de los linfocitos efectores con una correspondiente acumulación de LNKTi de memoria en SP. Finalmente, se muestra evidencia convincente sobre el deterioro de la ayuda de contacto LNKTi:LB en ICV, un hallazgo que puede estar relacionado con la disminución de la expresión intracelular de la molécula SAP en los linfocitos de estos pacientes y a su vez depende de su entorno genético e inmunológico pues estos LB en ICV ya no son capaces de responder incluso en presencia de LNKTi con niveles normales de SAP. Estos resultados nos orientan a seguir investigando los defectos genéticos que están involucrados tanto en la ICV como el desarrollo y función de los LNKTi, lo que ofrecerá alternativas para restaurar la función de los LB en los pacientes con ICV.

2. SUMMARY

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent symptomatic primary immunodeficiency (PID) in the world however, the genetic and molecular defects underlying this immune dysfunction are unknown. This disease is characterized by hypogammaglobulinemia and poor production of specific antibodies, which confers susceptibility to sinopulmonary and gastrointestinal infections leading to disability and death. Among the few genetic defects characterized in CVID, molecules related with antigen recognition by B cells or those related with B cell help and costimulation have been involved. In addition to abnormal distribution of B cell subpopulations in peripheral blood (PB) from patients with CVID, abnormalities in the number and function of invariant NKT lymphocytes (iNKT) have been reported in these patients. However, a more detailed analysis of iNKT interaction with other cells of the immune system in CVID and its relevance in the clinical phenotype of this syndrome has not been addressed. For these reasons, in this study it was characterized the number, phenotype and function of PB iNKT obtained from PB of CVID patients and in a more relevant way the *in vitro* capacity of these cells to provide cognate B cell help in the context of CVID.

The first goal of this thesis was to perform a phenotypic characterization of iNKT in CVID. A profound decrease in the absolute numbers of double negative iNKT (DN, CD4⁻CD8⁻) and to a lesser extent, in those CD4⁺, accompanied by a numerical reduction of CCR5⁺/CXCR3⁺ effector iNKT was observed. From these findings, it is postulated that the DN iNKT, reported as Th1-like cells can migrate and function as effector cells in peripheral tissues to control recurrent infections of CVID patients, with their consequent decrease in PB.

Moreover, iNKT cellular function was assessed after nonspecific peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulation with PMA/ionomycin. It was found that in a

steady state, CD40L^{high} iNKTL were enriched in PBMC from CVID patients. However, high expression of CD40L is related to a memory phenotype In T cells. It can be argued that an accumulation of CD40L^{high} memory-like iNKTL exists in PB from these patients. After stimulation, a decrease in the frequency of IFN-gamma and TNF-alpha producing-iNKTL was observed in CVID patients, a finding consistent with the absence of effectors iNKTL in these individuals PB.

The final aim of this work was to determine the ability of CD4⁺ iNKTL to provide B cell help in the presence of α -GalactosylCeramide (α GalCer). However, B cells do not proliferate in the presence of α GalCer pulsed autologous CD4⁺ iNKTL and this function was not recovered in the presence of pulsed CD4⁺ iNKTL from healthy donors (HD). However, the HD B cells proliferated in both autologous and heterologous co-cultures. Despite the proliferation defect in patients B cells, the ability to secrete Igs of these lymphocytes is preserved in autologous and heterologous co-cultures. To dismiss the probability that these results come from an absence of follicular helper iNKTL (_{fh}iNKTL), the cells capable of eliciting proliferation and antibody response of B cells in the iNKTL:B cell co-cultures (previously reported in murine model), we evaluated the double expression of CD45RO and CXCR5 as markers of _{fh}iNKTL phenotype, in the iNKTL in PB from CVID patients. An increased _{fh}iNKTL frequency was observed in CVID patients PB. These data suggest an enrichment of _{fh}iNKTL in iNKTL:LB co-cultures, where they promote stimulation of B cells. However, even under these conditions, the CVID patients B cells did not proliferate in the presence of autologous _{fh}iNKTL, suggesting an intrinsic defect in B cells from patients not in iNKTL *per se*.

Nevertheless, another important element for cognate iNKTL:B cell help, is the intracellular expression of the SAP molecule. Therefore, we assessed the intracellular expression of SAP in iNKTL from PBMC and in NK cells and LT from PB from patients, compared with HD. Importantly, it was found a significant

reduction in the expression index of intracellular SAP in iNKTL, NK and T cells from CVID patients.

Interestingly, it has been previously demonstrated a profound decrease in T:B cell interaction time in a SAP-deficient mouse model, this inhibits the germinal center formation and induces a rapid outlet of f_h T cells from spleen follicles. Despite of these defects, this T:B cell contact is sufficient to generate a primary antibody response. These previous findings allow us to suggest that the defect in proliferation of LB from patients with CVID observed in the iNKTL:LB co-cultures, is related to the low intracellular expression of SAP in the lymphocytes from these patients. These results seem contradictory despite the normal SAP levels in iNKTL from HD. However, Detre et al, demonstrated that SAP deficiency, regulate the humoral LB response according the genetic background. We suggest that the genetic background of B cell from CVID patients, bring on the proliferative B cell defect even in presence of SAP sufficient cells.

In conclusion, our results show that the decrease of iNKTL in CVID patients PB is specific to an effector iNKTL phenotype, probably because of their migration to inflammation sites. Additionally, the iNKTL CD40L^{high} enrichment in PBMC and iNKTL_{f_h} high percentages in PB from patients further supported this hypothesis, which induces a concomitant accumulation of memory iNKTL in PB. Finally, I presented compelling evidence that the iNKT:B cell cognate help is impaired in CVID, a finding that may be related to a decreased expression of the intracellular SAP protein in the lymphocytes from these patients. These results lead us to further investigate the genetic defects that are involved in CVID, which in this case, point to a defect in the function of the SAP molecule, in addition to providing new insights on alternatives to restore B cell function in patients with CVID.

3. PREFACIO GENERAL

Este trabajo se realizó como requisito para la obtención del título de Maestro en Microbiología y Bioanálisis en la Universidad de Antioquia. Estuvo enfocado en el estudio y la caracterización del número y la función de los LNKTi en pacientes con ICV y su asociación con las principales características clínicas e inmunológicas de estos individuos.

La presente tesis incluye una introducción general (Capítulos I y II) como respaldo teórico de la naturaleza del objeto de investigación. El primer capítulo, es un artículo de revisión ya publicado, que comienza con la ontogenia de los LNKTi, explica las funciones cada una de sus subpoblaciones, y por último, resume las aplicaciones de estas investigaciones en humanos, específicamente en cáncer, en la cual se emplean experimentalmente los LNKTi como estrategia terapéutica.

El segundo capítulo, comprende las fases de maduración de los LB y el fenotipo y función de las subpoblaciones de estas células. También, describe los mecanismos de cooperación LNKTi:LB y finalmente, se introduce una visión general de la ICV junto con la descripción de los defectos numéricos y funcionales en el contexto de ICV reportados para los LNKTi.

Siguiendo el cumplimiento del objetivo general de este trabajo: evaluar la capacidad funcional de los LNKTi y su habilidad para cooperar con los LB en el marco de la ICV, el Capítulo III presenta el artículo “Impaired invariant NKT:B cell help and decrease SAP expression in blood lymphocytes from patients with common variable immunodeficiency”, en el que se describen los resultados obtenidos de la evaluación fenotípica y funcional de los LNKTi con énfasis en la ayuda de contacto LNKTi:LB. Este artículo fue sometido a la revista *Journal of Innate Immunology* y actualmente se encuentra en revisión.

Por último, en el capítulo IV se hace una discusión general de todos los aspectos planteados en los demás capítulos para establecer las contribuciones de este trabajo al conocimiento de los mecanismos celulares de los defectos en el número y función de los LNKTi como un componente adicional de las características inmunológicas en los individuos con ICV.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las IDP son alteraciones genéticas que comprometen cualquiera de los componentes de la respuesta inmune. Hasta el momento, se han descrito las bases moleculares de más de 250 IDP que comprenden tanto defectos en las células de la inmunidad innata como en la adaptativa(1). Sin embargo, las IDP por defectos en la producción de anticuerpos abarcan aproximadamente un 60% de los diagnósticos. Estas enfermedades son la principal causa del síndrome de infección recurrente anormal (SIRA), que es una entidad caracterizada principalmente por infecciones recurrentes severas y prolongadas ocasionadas frecuentemente por gérmenes inusuales u oportunistas con una respuesta inadecuada al tratamiento con agentes anti-infecciosos. Sin embargo, las IDP por defectos en la producción de anticuerpos abarcan aproximadamente un 60% de los diagnósticos. Desde 1994 hasta la fecha, el grupo de IDP de la Universidad de Antioquia ha diagnosticado 875 pacientes con IDPs. De estas personas, 653 fueron diagnosticadas con deficiencias predominantes de anticuerpos (74.62%). Considerando que se calcula que estas enfermedades tienen una frecuencia de presentación es de 1:1250 nacidos vivos, se podría inferir que un gran porcentaje de la población colombiana podría estar sufriendo de IDP sin posibilidades de un diagnóstico preciso y tratamiento oportuno, lo cual se traduce en un alto costo de hospitalizaciones, medicamentos y atención médica para el sistema de salud del país.

La ICV es la IDP sintomática más frecuente en el mundo y en la mayoría de los pacientes se desconocen sus bases genéticas y moleculares. Esta enfermedad está caracterizada por hipogamaglobulinemia y producción deficiente de anticuerpos específicos, hallazgos asociados a infecciones sinopulmonares y gastrointestinales que pueden llevar a la muerte. En la actualidad, el único

tratamiento efectivo para controlar los síntomas de la ICV es la administración periódica de gammaglobulina humana intravenosa, sin embargo, se calcula que los costos de esta terapia pueden llegar a 35000 dólares anuales por paciente, lo que la convierte en una terapia de alto costo. Esto sumado a los 80000 dólares anuales que se calcula se necesita por paciente para su atención en salud después de un diagnóstico acertado.

Entre los pocos defectos genéticos que se han caracterizado en ICV, se han involucrado moléculas implicadas en el reconocimiento de antígenos por el LB o en la coestimulación que otras células del sistema inmune le brindan al LB para inducir una adecuada producción de anticuerpos. Varios estudios han demostrado que los LNKTi coestimulan a los LB durante estimulaciones antigénicas que generan respuestas tanto primarias como de memoria. La importancia de estos linfocitos radica en que son los responsables de la respuesta a antígenos glicolipídicos provenientes por ejemplo, de patógenos como especies de *Sphingomonas*, *Borrelia burgdorferi* y *Streptococcus pneumoniae*(2) a los cuales los pacientes con ICV son particularmente susceptibles. Por el contrario, los LT CD4+ por ejemplo, responden solo a antígenos proteicos. Sin embargo, cabe mencionar que las células NKTi son LT que poseen una cadena alfa del receptor de antígeno (TCR) con rearrreglos VJ limitados que interaccionan de manera restringida con la molécula CD1d, la cual presenta antígenos glicolipídicos en las células presentadoras de antígeno (APC). Aunque los ligandos naturales de CD1d hasta ahora se están caracterizando, se conoce que moléculas como las α -galactosil-ceramidas, las α -glicuronosil-ceramidas y el diacilglicerol se unen específicamente a CD1d en las APC, activando los LNKTi. Se ha reportado que los LNKTi están disminuidos en SP de los pacientes con ICV y que presentan algunas alteraciones en su fenotipo y función. Sin embargo, a pesar de todos estos hallazgos, no se conoce si existen defectos en los LNKTi que alteren a su vez la

función de los LB y la producción adecuada de anticuerpos, como tampoco se ha investigado si la activación adecuada de los LNKTi con glicolípidos específicos puede recuperar la defectuosa respuesta inmune humoral que se observa en ICV.

Por esta razón, el presente trabajo pretendió responder las siguientes preguntas:

- Los pacientes con ICV presentan defectos cuantitativos en los LNKTi de SP?
- Específicamente que componente de la función de los LNKTi (producción de citoquinas, capacidad de coestimulación, etc) se ve afectado en estos pacientes?

Además, se buscó la posibilidad de plantear nuevas alternativas de tratamiento de ICV por medio de la manipulación de los LNKTi como se han ensayado para otras enfermedades.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

Evaluar la capacidad funcional de los LNKTi y su habilidad para cooperar con los LB en pacientes con ICV.

5.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar el número y fenotipo de los LNKTi en SP de individuos con ICV
- Determinar *in vitro* si la estimulación de los LNKTi junto a glicolípidos específicos puede recuperar la función de los LB de los pacientes con ICV
- Relacionar los hallazgos sobre las subpoblaciones de LNKTi de SP en pacientes con ICV y sus manifestaciones clínicas.



Revisión

Linfocitos NKT invariantes: ontogenia, fenotipo y función



Lucía Victoria Erazo-Borrás*, Jesús Armando Álvarez-Álvarez
y Claudia Milena Trujillo-Vargas

Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 19 de septiembre de 2013

Aceptado el 14 de enero de 2014

On-line el 11 de marzo de 2014

Palabras clave:

Linfocitos NKTi

CD4⁺

CD8αβ⁺

CD8αα⁺

CD1d

TCR invariante

Cáncer

RESUMEN

Las células NKT invariantes (NKTi) fueron identificadas inicialmente por presentar características similares a las células T y NK. Actualmente se han definido como linfocitos T con características únicas, desde su selección y diferenciación en el timo hasta su respuesta a estímulos específicos. A partir de estudios realizados en ratones se han caracterizado las vías de maduración y diferenciación de esta población celular, en las cuales la molécula CD1d, tiene un papel fundamental en la selección de sus precursores y, adicionalmente, en la presentación de glucolípidos para la activación de las células NKTi en periferia. En sangre periférica humana se han encontrado 4 subpoblaciones de células NKTi: CD4⁺, CD8αβ⁺, CD8αα⁺ y Doble Negativas, las cuales cooperan e interactúan de forma particular con las demás células del sistema inmune. Finalmente, estudios de las células NKTi muestran la posibilidad de plantear alternativas terapéuticas, pero a su vez abren más interrogantes sobre el comportamiento de este tipo de linfocitos.

© 2013 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Invariant NKT lymphocytes: Ontogeny, phenotype and function

ABSTRACT

Invariant natural killer (iNK) T lymphocytes (iNKTL) were initially identified due to having similar characteristics to NK and T cells. Nowadays, it is known that these cells are T lymphocytes with unique characteristics, from their maturing process and differentiation in the thymus to the response at specific stimuli. Studies in mice have been useful for examining the maturing process and differentiation pathways of iNKTL. In these pathways the CD1d molecule has a fundamental role in the selection of their precursors, and also in the peripheral glycolipid presentation for the activation of iNKTL. Four sub-populations of iNKTL CD4⁺, CD8αβ⁺, CD8αα⁺ and Double Negatives, were identified in human peripheral blood. They particularly cooperate and interact with others immune cells. The information

Keywords:

iNKT lymphocytes

CD4⁺

CD8αβ⁺

CD8αα⁺

CD1d

Invariant TCR

Cancer

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lucia.victoria.erazo@gmail.com (L.V. Erazo-Borrás).

0213-9626/\$ - see front matter © 2013 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2014.01.004>

obtained by studying iNKT cells opens the possibility of proposing this cell line as a therapeutic alternative, but further studies on the behavior of this type of lymphocyte are needed.

© 2013 Sociedad Española de Inmunología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El término linfocitos «NKT» fue publicado por primera vez en 1995 para referirse a un subgrupo de linfocitos T murinos que comparten características con los linfocitos asesinos naturales (NK, del inglés *natural killer*), específicamente, la expresión del marcador NK1.1¹. No obstante, ya en 1987, 3 grupos diferentes publicaron estudios de una subpoblación particular de linfocitos T α/β en ratones que expresa niveles intermedios del receptor de la célula T (TCR), presenta la cadena V β 8 del TCR a una frecuencia 2 a 3 veces mayor que los linfocitos T convencionales y carece de la expresión de CD4 o CD8². El interés en estas células aumentó cuando se descubrió que son fuente importante de muchas citoquinas inmunorreguladoras, incluyendo la IL-4, el IFN- γ y el TNF- α ³. Observaciones adicionales revelaron que el desarrollo de estos linfocitos T NK1.1+ es independiente de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I en el timo, pero dependiente de la β 2-microglobulina (β 2m), y hasta ese momento se pensaba que ellos no expresaban CD8⁴. Esto llevó a dilucidar el papel de la molécula CD1d como ligando importante en la función de las células T NK1.1+⁵. CD1d es una molécula homóloga a CMH clase I, expresada principalmente en células del linaje hematopoyético (monocitos, células dendríticas y linfocitos T y B) pero también en células no hematopoyéticas (células epiteliales tímica, queratinocitos y hepatocitos, entre otros)⁶. Similar a CMH clase I, CD1d tiene 3 dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3), que forman un heterodímero con la β 2m, como se observa en la *figura 1*. Adicionalmente se descubrió que la mayoría de las células NKT usan una cadena α invariante del TCR. Por otra parte, existían evidencias crecientes que las moléculas CD1 presentan antígenos lipídicos hidrofóbicos a las células T, y se identificó la α -galactosil-ceramida (α GalCer) como un potente factor estimulador de las células NKT⁷. α GalCer es un glucolípido sintético, derivado de una esponja marina, que contiene enlaces glucosídicos α anómicos de residuos de galactosa en una base de esfingosina⁸.

Todas estas observaciones llevaron a caracterizar un nuevo linaje de linfocitos T, llamado NKT invariante (NKTi), cuya característica fundamental es su reactividad a α GalCer y lípidos estructuralmente relacionados en el contexto de CD1d⁹. Adicionalmente, la gran mayoría de estas células en humanos expresa la cadena V α 24-J α 18 junto con la cadena V β 11 del TCR, marcadores de fenotipo de células T de memoria efectora como CD45RO¹⁰ y que tiene una gran capacidad de producir citoquinas. Anteriormente se incluía entre las características únicas de las células NKTi en humanos la expresión del marcador específico de células NK, CD161; sin embargo, actualmente se conoce que otras subpoblaciones de linfocitos T convencionales pueden expresar este marcador después de su activación, y que los niveles de expresión de CD161 varían con los estados de maduración y activación celular¹¹.

Ontogenia de las células NKT invariantes: un proceso coordinado y con características particulares en relación con los linfocitos T convencionales

Como para todos los linfocitos T, el desarrollo de las células NKTi se lleva a cabo en el timo, donde estas células experimentan procesos de selección positiva y negativa que están determinados principalmente por la avididad de la interacción del TCR a ligandos específicos^{12,13}. Sin embargo, una de las características más peculiares que tiene el proceso de diferenciación de las células NKTi en el timo es que, a diferencia del proceso de selección positiva para los linfocitos T convencionales el cual es mediado por células epiteliales tímicas que expresan moléculas del CMH, los linfocitos NKTi involucran a la molécula CD1d expresada en los timocitos corticales doble positivos (DP, CD4+/CD8+) en la presentación antigénica. Esta afirmación es soportada por evidencias que indican que específicamente las células NKTi están ausentes en los ratones deficientes en CD1d¹⁴. Cuando se reconstituye el timo de estos ratones con timocitos DP CD1d+/+, las células NKTi se desarrollan normalmente¹⁵. Por otra parte, utilizando ratones quiméricos cuyas células de médula ósea carecen de la expresión de CD1d se demostró que los timocitos DP CD1d-/- son incapaces de soportar el desarrollo tímico de las células NKTi. Sin embargo, no solo se requiere que CD1d se exprese en los timocitos DP, sino también que su interacción con los precursores NKTi se lleve a cabo de manera adecuada, ya que pequeños cambios en la estructura de esta molécula afectan la avididad de su interacción con el TCR de los precursores de las células NKTi, influyendo la producción de estas en el timo y el hígado¹⁶.

Respecto a los autoantígenos naturales presentados por el CD1d en los timocitos corticales DP para la selección de las células NKTi, no existen aún datos concluyentes. Sin embargo, se ha planteado que fosfolípidos, glucoesfingolípidos, gangliósidos y galactosil-cerámidas pueden participar en este proceso¹⁷. α GalCer no se incluye en este grupo porque no es un ligando natural de estas células en mamíferos. Sin embargo, un estudio reciente demostró que isoformas de la β D-glucopiranosilceramida podrían representar autoantígenos importantes de las células NKTi murinas y humanas en el timo^{18,19}. La isoglobotrihexosilceramida (iGb3) ha sido propuesta como un potente autoantígeno en el modelo murino, mas su papel en la activación de las células NKTi humanas ha sido controversial; sin embargo, después de realizar un análisis de la activación y función de las células NKTi de sangre periférica (SP) de personas sanas en respuesta a iGb3, en comparación a la respuesta inducida por α GalCer, se determinó que iGb3 no estimula la expansión de las células NKTi ni tampoco la liberación de citoquinas como IL-4, IFN- γ , IL-13 o GM-CSF, demostrando que iGb3 no es un antígeno esencial en la biología de los las células NKTi en el contexto humano²⁰.

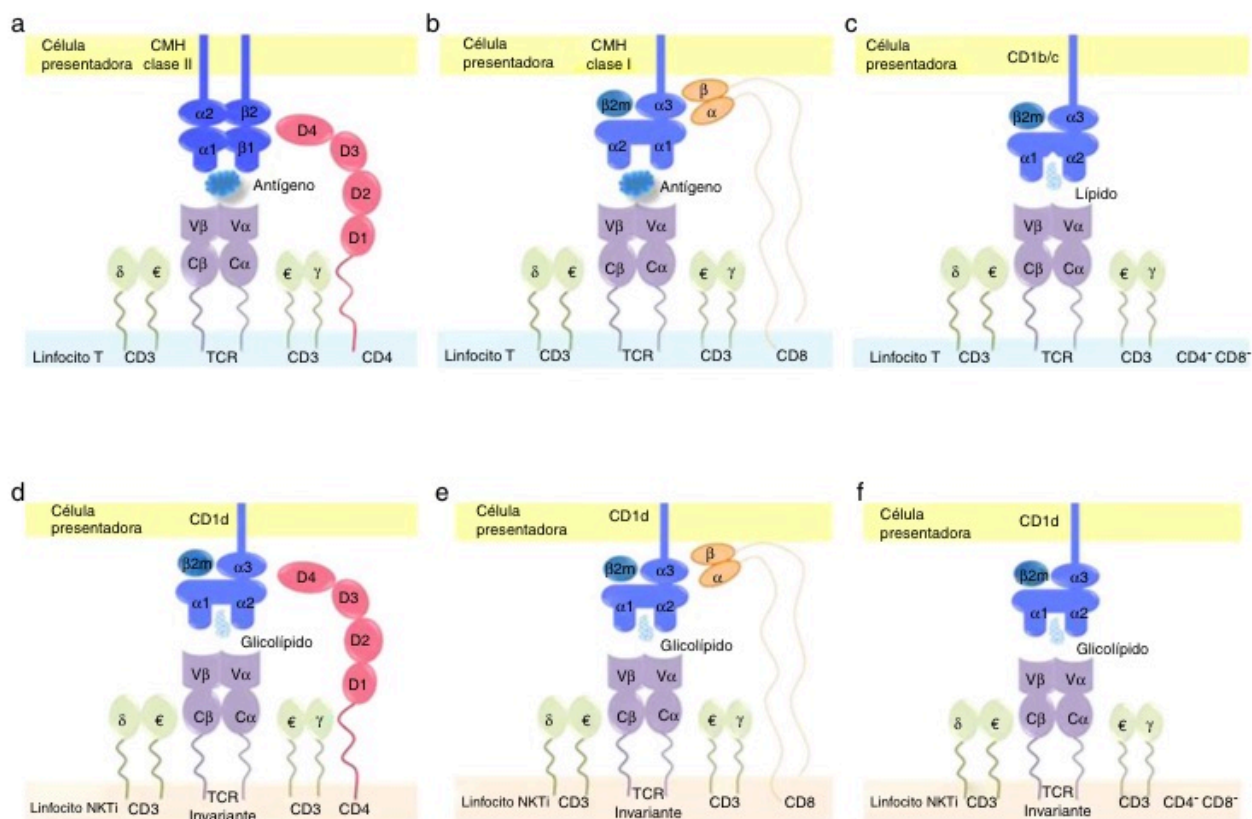


Figura 1 – Sinapsis inmunológica en los linfocitos T convencionales y en las células NKTI. Los linfocitos T convencionales, tanto CD4⁺ (a) como CD8⁺ (b), reconocen antígenos presentados por células especializadas a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y clase I, respectivamente, a través de su receptor de célula T (TCR por sus siglas en inglés). El correceptor CD4 interactúa con las regiones β1 y β2 del CMH clase II, mientras que CD8 lo hace con las regiones α1 y α2 del CMH clase I. Por su parte, los LT doble negativos DN, CD4⁻/CD8⁻ (c) reconocen lípidos presentados por CD1b o CD1c, moléculas no convencionales estructuralmente asociadas al CMH clase I. Para las células NKTI, la presentación antigénica también se realiza por moléculas no convencionales, específicamente por la proteína CD1d, que expone antígenos glucolipídicos al TCR invariante de la célula NKTI. Los correceptores CD4 (d) y CD8 (e) interactúan con las regiones α1 y α2 de CD1d. Sin embargo, aun en ausencia de estas moléculas en células NKTI DN (f), esta interacción también se traduce en activación celular.

La diferenciación de las células NKTI comienza, al igual que para los demás linfocitos T, con el rearreglo de los segmentos génicos de la cadena β del TCR. Sin embargo, para la generación del TCR invariante este proceso continúa en ratones, con el rearreglo de los segmentos que codifican Vα14 y Jα18 de esta molécula²¹, lo que permite su selección positiva, al reconocer antígenos lipídicos presentados por la molécula CD1d expresada en la superficie de timocitos seleccionadores DP²². La interacción homotípica entre estos timocitos DP (uno funcionando como seleccionador y el otro como precursor de linfocitos NKTI) permite la interacción homofílica de proteínas miembros de la familia SLAM; SLAM y Ly108, lo cual activa vías de señalización en las cuales participan la proteína adaptadora de SLAM (SAP), la tirosina quinasa Fyn y factores de señalización como PKCθ y NFκB. Estas moléculas son necesarias en la selección positiva, ya que influyen en la expresión del TCR invariante y también en la expansión de las células NKTI, hecho evidenciado por el bloqueo del desarrollo de las

células NKTI (mas no en los linfocitos T convencionales), en ratones deficientes en SAP o Fyn^{23,24}.

Luego de la selección positiva, se han formulado 4 fases para la maduración de las células NKTI en ratones, basadas en la presencia de CD24, CD44 y NK1.1, tal como se observa en la tabla 1²⁵. CD24 es una molécula de adhesión celular que se expresa en granulocitos maduros, en linfocitos B y en células en diferenciación. CD44, por su parte, es una glucoproteína de membrana utilizada para rastrear el desarrollo de los linfocitos T convencionales en el timo y es un marcador de activación. NK 1.1, como ya se ha mencionado, es un marcador de las células NK característico de las células NKTI murinas. En humanos, de los marcadores de maduración establecidos en ratones, solamente el homólogo de NK1.1, CD161, ha sido estudiado. En los ensayos realizados por Hu et al.²⁶, CD161 se expresa en una proporción mayor en las células NKTI en SP en comparación con los presentes en el timo. Por otra parte, la expresión de CD161 es menor en donantes menores a los

Tabla 1 – Fases de la maduración en células NKTi murinas, en timo y órganos periféricos

Fase	Fenotipo	Características
Estadio 0	CD24 ^{hi} , CD44 ^{lo} , NK1.1 ⁻	Fenotipo de las células NKTi inmediatamente luego de la selección positiva en la corteza tímica. En este estadio se determina el fenotipo de estas células. En algunas se regula negativamente CD4, generando una subpoblación doble negativa (DN)
Estadio 1	CD24 ^{lo} , CD44 ^{lo} , NK1.1 ⁻	Proliferación marcada. La población total de linfocitos NKTi aumenta aproximadamente 100 veces. Estas células tienen capacidad de producir principalmente IL-4
Estadio 2	CD24 ^{lo} , CD44 ^{hi} , NK1.1 ⁻	Proliferación marcada. Adquisición del fenotipo de memoria. Las células adquieren la capacidad de producir IFN- γ y otras citoquinas
Estadio 3	CD24 ^{lo} , CD44 ^{hi} , NK1.1 ⁺	Después de adquirir el marcador NK1.1 ⁺ , algunos linfocitos NKTi maduran extratímicamente. Sin embargo, algunas células maduran en el timo originando linfocitos residentes terminales de larga vida

De Benlagha et al.²⁷, Pellicci et al.²⁸ y Berzins et al.²⁹.

6 meses de edad respecto a niños mayores. Todo lo anterior indica que CD161 es un marcador de madurez de las células NKTi, pero aún se deben definir los marcadores relacionados con las fases de maduración de las células NKTi humanas en el timo.

Aunque para los linfocitos T convencionales es reconocido que los procesos de selección negativa se relacionan con el reconocimiento de antígenos propios con alta afinidad, los mecanismos que regulan la selección negativa de las células NKTi aún no se entienden completamente. Se ha observado que en ratones inyectados intraperitonealmente con altas dosis de α -GalCer en el día 3-14 después del nacimiento hay una disminución de las células reactivas a esta molécula en el timo, efecto que no se observa en ratones adultos³⁰. El mismo efecto se observa cuando se sobreexpresa CD1d en el estroma tímico³¹. Estos datos indican que la exposición a autoantígenos lipídicos en el timo en etapas tempranas del desarrollo puede seleccionar negativamente las células NKTi que presentan una alta afinidad a estas moléculas, pero se conoce muy poco sobre los mecanismos o las moléculas antigénicas que median este proceso.

Otro interrogante que no se ha resuelto en la actualidad sobre la ontogenia de las células NKTi son los factores que determinan la expresión de las moléculas CD4 y CD8 en su superficie, lo cual, como veremos más adelante, le confiere características funcionales diferentes. Estudios iniciales sugieren que un factor de transcripción como THPOK bloquea la expresión de CD8 en estas células en el timo, aunque también cumple esta función en los linfocitos T convencionales³². Adicionalmente, se ha sugerido que las células NKTi doble negativas (DN) se originan de timocitos DP^{dim} en el timo¹².

Fenotipo y función de las células NKTi: plasticidad y adaptabilidad en los diferentes patrones de cooperación celular

Al salir del timo, las células NKTi son activadas en la periferia por moléculas lipídicas asociadas a CD1d, generando ciclos de expansión clonal en el bazo, el hígado y la médula ósea. Aunque poco se conoce sobre los antígenos naturales que son presentados mediante CD1d en la periferia, se ha observado que α -glucuronosil-cerámidas o diacilglicerol aislado de bacterias gramnegativas como las del género *Sphingomonas* o

glucolípidos de *Borrelia burgdorferi* se unen específicamente a CD1d³³. Aunque se presume que la activación de las células NKTi mediada por la molécula CD1d de las células presentadoras de antígeno se lleva a cabo por presentación de lípidos derivados de patógenos, evidencias crecientes sugieren que antígenos lipídicos propios pueden participar también en la activación de estas células en situaciones en las que antígenos lipídicos exógenos no están presentes. Esta propiedad confiere a estas células la capacidad de ser activadas en diferentes contextos patológicos y a partir de un umbral de afinidad con el antígeno^{18,34}. La expansión de las células NKTi mediada por moléculas asociadas a CD1d se relaciona entonces con una producción sostenida de citoquinas que contribuye a la activación de las células NK, células dendríticas, linfocitos B y otros linfocitos T³⁵.

La evaluación del número de células NKTi en SP humana es complicada, principalmente por su baja frecuencia en sangre y por las diferencias en los anticuerpos usados para su caracterización. Analizando 90 controles sanos, Montoya et al.¹⁰ describen que la frecuencia de las células NKTi varía de 0,01 a 0,92% de los linfocitos totales usando una combinación del anticuerpo obtenido de la clona 6B11 (que reconoce el TCR V α 24-J α 18) y anti-CD3 para su caracterización. Sin embargo, en este artículo no se presentan los valores absolutos de estas células en SP. En otro estudio, realizado por Bienemann et al.³⁶, se reporta que la frecuencia de las células NKTi puede variar de 0,021 a 0,712% de los linfocitos totales en SP de niños sanos con valores absolutos que fluctúan entre 515 y 8.762 células/ml. Por otra parte, se ha determinado que la frecuencia de células NKTi en sangre humana disminuye con la edad, un efecto que es más marcado en hombres, a expensas de una disminución de subpoblación DN (revisado por Peralbo et al.³⁷).

También existe mucha variabilidad en los métodos usados para estudiar las diferentes subpoblaciones de las células NKTi en SP humana. En la literatura se ha reportado que existen 4 subpoblaciones: CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, CD4⁻/CD8 α ⁺ β ⁺ y CD4⁻/CD8⁻, y se ha descrito que existe una relación inversa entre el número total de las células NKTi y el porcentaje de las células NKTi CD4⁺¹⁰. Los linfocitos NKTi CD4⁺ producen mayores cantidades de IL-4, IL-13, GM-CSF e IL-2 que sus contrapartes DN (CD4⁻, CD8 α ⁻) y CD8 α ⁺ (que comprende las subpoblaciones CD8 α ⁺ β ⁺ y CD8 α ⁺ β ⁻)³⁸. Realizando un estudio comparativo en el que se cultivaron cada una de las

subpoblaciones de células NKTi junto a linfocitos T convencionales CD4⁺ o CD8⁺, linfocitos NK o B, obtenidos de SP de donantes sanos, se observó que las células NKTi CD4⁺ fueron la subpoblación con la mayor capacidad de inducir la regulación positiva de los marcadores CD69 y CD25 en linfocitos T CD4⁺ y B frente a las otras subpoblaciones. Estas células también exhiben mayor capacidad de inducir la expresión del marcador CD69 en linfocitos NK. Es importante resaltar, sin embargo, que en este estudio las células NKTi CD8⁺ y DN también mostraron la capacidad de activar linfocitos T CD4⁺, NK y B autólogos, aunque en menor proporción comparados con sus contrapartes CD4⁺. Por su parte, las células NKTi CD8β⁺ mostraron una mayor capacidad para inducir la expresión de CD25 en linfocitos T CD8⁺ convencionales. Esta capacidad cooperadora de las células NKTi con otros linfocitos se asocia con su habilidad para producir diferentes citoquinas, mostrando los linfocitos NKTi CD4⁺ habilidad para secretar tanto IFN-γ como IL-4, mientras que los CD8⁺ y DN producen casi exclusivamente IFN-γ³⁸. Este estudio, sin embargo, no analizó la subpoblación de células NKTi CD8αα⁺, aunque presumimos que se incluye dentro de las células DN (CD4⁻/CD8β⁻). Se ha observado adicionalmente que las células NKTi CD8αβ⁺ exhiben un fenotipo Th1 y actividad citotóxica, al igual que las células NKTi DN, y tienen una mayor capacidad de eliminar células tumorales en relación a las células NKTi CD4⁺ o DN³⁹. Por su parte, las células NKTi DN han mostrado habilidad para secretar IL-17 tras la estimulación con PMA/ionomicina o αGalCer y la exposición a células HeLa transfectadas con CD1d⁴⁰.

En otro estudio, en el cual se intenta caracterizar las subpoblaciones de las células NKTi CD4⁺ o DN (no se caracteriza la subpoblación de estas células que expresa CD8), las células NKTi DN (CD4⁻/CD8β⁻) expresan en mayor cantidad receptores de quemoquinas y marcadores de membrana del linaje celular NK (como CCR5 y CD94/NKG2A, entre otros) respecto a las células NKTi CD4⁺. Además, estas células producen IFN-γ y TNF-α en altas cantidades⁴¹. Sin embargo, varios estudios evidencian que la capacidad de producir citoquinas o expresar determinados receptores de superficie en estas células depende en gran medida del estímulo utilizado^{35,40,42}. De esta manera, cuando se altera la molécula αGalCer acortando sus residuos de esfingosina, las células NKTi exhiben un fenotipo Th2, mientras que una activación mediada por la molécula NK1.1 favorece una respuesta Th1^{41,43}. De igual manera, las células NKTi DN producen mayor cantidad de perforina comparadas con las CD4⁺ al activarse con αGalCer, IL-2, IL-12 o LPS, mientras que se observa el efecto contrario cuando estas células se activan con PMA/ionomicina³⁶.

Respecto a las células NKTi CD8αα⁺, se ha evidenciado que pueden tener un efecto supresivo en la proliferación de linfocitos T activados, ya que adicionando clones de las diferentes subpoblaciones de células NKTi humanas a un cultivo de células mononucleares de SP estimuladas con estreptoquinasa, se observó una reducción dosis-dependiente de la respuesta proliferativa de linfocitos T específicos hasta en el 70% cuando se co-cultiva con las células NKTi CD8αα⁺, sugiriendo que esta subpoblación está directamente relacionada con la regulación de los linfocitos T convencionales después de su estimulación⁴⁴. En la figura 2 se

representa la ontogenia de los las células NKTi y su diferenciación a células CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8αα⁺, CD4⁻/CD8αβ⁺ y CD4⁻/CD8⁻.

Linfocitos NKTi: una posible herramienta terapéutica en humanos

Algunos fenómenos autoinmunes parecen tener una marcada influencia en el número de células NKTi circulantes en humanos. Se ha reportado, por ejemplo, una marcada disminución en el número absoluto de células NKTi en SP de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES)⁴⁵ al igual que en los pacientes con Artritis Reumatoidea, en quienes se ha relacionado con la severidad de la enfermedad⁴⁶. Sin embargo, este no es un hallazgo constante de todas las enfermedades autoinmunes ya que por ejemplo, en diabetes mellitus tipo 1 las células NKTi circulantes se han encontrado aumentadas, normales o disminuidas comparadas con aquellas de los controles sanos⁴⁷.

En lo relacionado con enfermedades infecciosas, se ha reportado que en pacientes con tuberculosis los niveles de células NKTi de SP están significativamente disminuidos, hallazgo que se correlaciona inversamente con los niveles de proteína C reactiva y con la actividad de la infección⁴⁸. En individuos afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) la disminución en los números absolutos de células NKTi también se relaciona con la progresión de la enfermedad⁴⁹. De igual forma, durante estadios crónicos de hepatitis B la frecuencia en SP de las células NKTi está disminuida, pero estos valores aumentan después de terapia antiviral⁵⁰. Curiosamente, durante la infección por el virus de la hepatitis C esta subpoblación celular no se encuentra afectada en número en SP⁵¹.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, se han realizado estudios que buscan proponer nuevas estrategias de inmunoterapia por medio de la activación de las células NKTi in vivo o in vitro, proponiendo como primera aproximación la administración de análogos sintéticos de α-GalCer^{52,53}. En 2007 se realizó un estudio fase I/II en 40 pacientes con hepatitis C crónica, a quienes se les suministraron diferentes concentraciones de KRN7000 en intervalos de 4 semanas. Solamente en un paciente se observó una reducción marcada de los niveles de ARN del virus de la hepatitis C⁵¹. De igual forma, la capacidad antiviral de KRN7000 se evaluó en 27 pacientes con hepatitis B crónica, en quienes no se observó una disminución en el ADN viral en SP después del tratamiento, que además fue poco tolerado por los pacientes⁵⁴.

Los ensayos clínicos se han centrado, sin embargo, en pacientes con cáncer. En 2002, Giaccone et al.⁵⁵ administraron KRN7000 (el análogo sintético de αGalCer) en 24 pacientes con tumores sólidos por cáncer avanzado a diferentes tiempos durante 4 semanas. Clínicamente, 7 de los pacientes que recibieron KRN7000 presentaron estabilización en la progresión tumoral, mientras que en 15 de ellos se observó una progresión de la enfermedad.

Por otra parte, se han realizado ensayos clínicos infundiendo células pulsadas con glucolípidos para inducir la activación de las células NKTi de una manera más efectiva. Uno de los primeros estudios clínicos de fase I publicados se

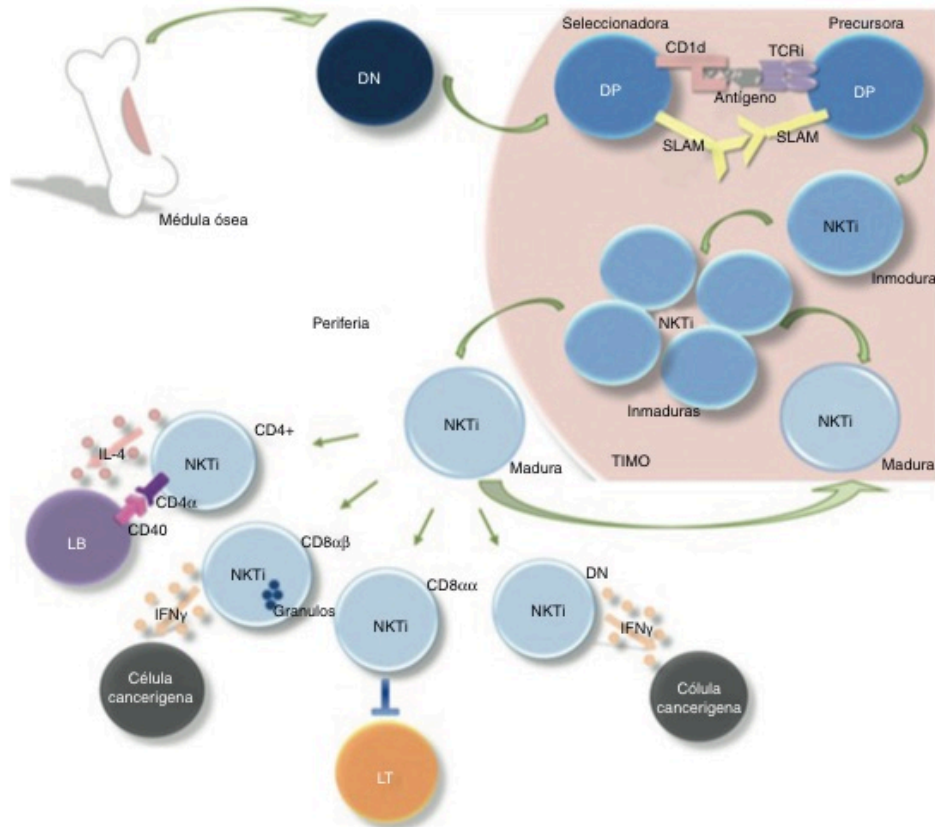


Figura 2 – Proceso de selección y maduración de los linfocitos NKTi. Una célula doble negativa (DN) proveniente de la médula ósea pasa al timo para su diferenciación en célula precursora de linfocitos doble positiva (DP). Su selección ocurre por la interacción de una célula seleccionadora (presentadora de antígeno por CD1d) y una célula precursora (que posee un TCR invariante), originándose una célula NKTi inmadura. Posteriormente, estas células inmaduras proliferan y continúan su proceso de maduración tanto en el timo como en la periferia. La diferenciación en las distintas subpoblaciones de linfocitos NKTi ($CD4^+$, $CD8\alpha\beta$, $CD8\alpha\alpha$ y DN) sucede extratímicamente, en donde cumplen funciones específicas de cooperación e interacción con otras células del sistema inmune.

realizó en 12 pacientes con metástasis malignas de diferentes tipos de cáncer. En intervalos de 2 semanas se infundieron células dendríticas derivadas de monocitos pulsadas (CDMo) con KRN7000 marcadas radiativamente. Se demostró que después de 24 h la mayoría de estas CDMo migraron desde los pulmones al hígado y al bazo, y en menor proporción a la médula ósea. Aunque la respuesta tumoral no era un objetivo del estudio, se observó que los marcadores tumorales en suero disminuyeron en 2 pacientes con adenocarcinoma, se desarrolló necrosis extensa del tumor en otro de los participantes con carcinoma de células renales y se redujeron en suero las enzimas hepatocelulares de otros 2 pacientes con infiltración tumoral hepática⁵⁶. Adicionalmente, se ha probado la infusión intravenosa de células dendríticas estimuladas con KRN7000 en combinación con fármacos antitumorales, demostrando una reducción tumoral relacionada con el protocolo terapéutico⁵⁷.

Se establece entonces que la administración en diferentes dosis de KRN7000 resulta bien tolerada por pacientes con cáncer; sin embargo, no es suficiente la estimulación con el glucolípido in vivo para lograr una respuesta inmune

antitumoral efectiva. En cuanto a los parámetros inmunológicos, todos estos estudios muestran que en SP las células NKTi presentan variaciones transitorias tras las infusiones de glucolípido o células pulsadas con este. Sin embargo, se comprueba que la activación de las células NKTi por estos métodos incrementa la producción de citoquinas en suero, y cuando estos parámetros se evalúan, también la citotoxicidad de las células NK y la expresión de un fenotipo de memoria por parte de las células NKTi. Al parecer, la producción de $IFN-\gamma$ por parte de estas células es determinante para su eficacia clínica. Esta afirmación se fundamenta en el trabajo de Ishikawa et al.⁵⁸, quien después de evaluar la seguridad de su protocolo de transferencia adoptiva determina los números de células productoras de $IFN-\gamma$ de SP en 17 pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, en respuesta a inyecciones de CMSP pulsadas con KRN7000. Los números de células productoras de $IFN-\gamma$, identificadas como células NK, y las células NKTi se incrementaron en 10 pacientes después de la estimulación. En estos 10 casos se observó un incremento en el tiempo medio de supervivencia (31,9 meses promedio) y 4 se clasificaron como de enfermedad estable. De los 7 pacientes

en los cuales no se observó incremento en las células productoras de IFN- γ , el tiempo medio de supervivencia fue menor (9,7 meses en promedio), y solo un caso fue clasificado como estable⁵⁹.

Conclusiones

Desde los primeros estudios realizados a las células NKTi, el análisis de su fenotipo y de sus funciones ha demostrado la importancia de esta subpoblación de linfocitos T en la respuesta inmune. A partir de su caracterización en ratones se ha logrado establecer diferentes estadios de maduración celular; sin embargo, estos estadios no son claros en las células NKTi en humanos, lo cual genera preguntas como: ¿cuáles son los marcadores celulares relevantes en el proceso de maduración de estas células en el timo humano? ¿En qué partes del timo ocurre este proceso? ¿Cuáles son los factores determinantes de la diferenciación en las células NKTi CD4⁺, CD8 $\alpha\beta$ ⁺, CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ o DN?

Por otra parte, la identificación de la molécula presentadora de antígenos glucolipídicos CD1d, como elemento indispensable para la selección y la activación de los las células NKTi, la señala como un blanco de investigación en el entendimiento de la relación de las células NKTi y sus potenciales antígenos. Sin embargo, es necesario identificar con precisión los autoantígenos que son presentados por esta molécula en el timo y los que inducen una respuesta por parte de las células NKTi en la periferia, ya que, como se mencionó anteriormente, tanto α -GalCer como KRN7000 son moléculas no fisiológicas.

El estudio de la función de los las células NKTi ha permitido dilucidar el efecto de la interacción entre las diferentes subpoblaciones de estos linfocitos y otras subpoblaciones celulares del sistema inmune, como la activación de linfocitos B asociada a las células NKTi CD4⁺, la regulación de la proliferación de linfocitos T activados por las células NKTi CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ y la actividad citotóxica contra células tumorales asociada a las células NKTi CD8 $\alpha\beta$ ⁺, entre otras. Estos hallazgos hacen evidente la importancia de estas células como mediadoras de la respuesta inmune y permite plantearlas como indicadores del avance de ciertas enfermedades y como alternativas terapéuticas. Las evidencias indican que tanto el uso terapéutico de glucolípidos específicos como la infusión de células presentadoras de antígeno pulsadas con estos puede potenciar la respuesta inmune innata y adaptativa. Sin embargo, se necesita optimizar e individualizar estos protocolos para lograr una mayor eficacia clínica.

Financiación

Este trabajo fue escrito en el marco del proyecto «Estudio de la coestimulación de los linfocitos NKT invariantes a los linfocitos B en Inmunodeficiencia Común Variable: Un posible mecanismo para explicar deficiencias en la producción de anticuerpos en humanos», aprobado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS, código 11115-519-29012.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Makino Y, Kanno R, Ito T, Higashino K, Taniguchi M. Predominant expression of invariant α 14 TCR α chain in NK1.1+ T cell populations. *Int Immunol*. 1995;7:1157-61.
- Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, et al. A novel population of T-cell receptor α β -bearing thymocytes which predominantly expresses a single V β gene family. *Nature*. 1987;329:251-4.
- Zlotnik A, Godfrey D, Fischer M, Suda T. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. α β -T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol*. 1992;149:1211-5.
- Onteki T, MacDonald H. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor- α / β + cells in the liver of mice. *J Exp Med*. 1994;180:699-704.
- Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*. 1995;268:863-5.
- Brigl M, Brenner M. CD1: Antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:817-908.
- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. 1997;278:1626-9.
- Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. α -galactosylceramide: Potential immunomodulatory activity and future application. *Curr Med Chem*. 2004;11:241-52.
- Godfrey DI, Macdonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, van Kaer L. NKT cells: What's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004;4:231-7.
- Montoya CJ, Pollard D, Martinson D, Kumari K, Wasserfall K, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122:1-14.
- Van den Heuvelm J, Garg N, van Kaer L, Haeryfar SM. NKT cell costimulation: Experimental progress and therapeutic promise. *Trends Mol Med*. 2011;17:65-77.
- Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, et al. Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity*. 2005;22:705-16.
- Yassai M, Cooley B, Gorski J. Developmental dynamics of post-selection thymic DN iNKT. *PLoS One*. 2012;7:e43509.
- Dao T, Guo D, Ploss A, Stolzer A, Saylor C, Boursalian TE, et al. Development of CD1d-restricted NKT cells in the mouse thymus. *Eur J Immunol*. 2004;34:3542-52.
- Bendelac A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med*. 1995;182:2091-6.
- Li Y, Thapa P, Hawke D, Kondo Y, Furukawa K, Furukawa K, et al. Immunologic glycosphingolipidomics and NKT cell development in mouse thymus. *J Proteome Res*. 2009;8:2740-51.
- Zhou D, Mattner J, Cantu 3rd C, Schrantz N, Yin N, Gao Y. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*. 2004;306:1786-9.

18. Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim E, Tuli A, Sanderson J, et al. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol.* 2011;12:1202-11.
19. Sanderson JP, Brennan PJ, Mansour S, Matulis G, Patel O, Lissin N, et al. CD1d protein structure determines species-selective antigenicity of isoglobotrihexosylceramide (iGb3) to invariant NKT cells. *Eur J Immunol.* 2013;43:815-25.
20. Godfrey DI, Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin Immunol.* 2010;22:61-7.
21. D'Cruz LM, Yang CY, Goldrath AW. Transcriptional regulation of NKT cell development and homeostasis. *Curr Opin Immunol.* 2010;22:199-205.
22. Das R, Sant'angelo DB, Nichols KE. Transcriptional control of invariant NKT cell development. *Immunol Rev.* 2010;238:195-215.
23. Darmoise A, Teneberg S, Bouzonville L, Brady RO, Beck M, Kaufmann SH. Lysosomal alpha-galactosidase controls the generation of self lipid antigens for natural killer T cells. *Immunity.* 2010;33:216-28.
24. Engel I, Kronenberg M. Making memory at birth: understanding the differentiation of natural killer T cells. *Curr Opin Immunol.* 2012;24:184-90.
25. Berzins SP, Cochrane AD, Pellicci DG, Smyth MJ, Godfrey DI. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *Eur J Immunol.* 2005;35:1399-407.
26. Hu T, Gimferrer I, Alberola-Ila J. Control of early stages in invariant natural killer T-cell development. *Immunology.* 2011;134:1-7.
27. Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science.* 2002;296:553-5.
28. Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med.* 2002;195:835-44.
29. Berzins SP, McNab FW, Jones CM, Smyth MJ, Godfrey DI. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J Immunol.* 2006;176:4059-65.
30. Pellicci DG, Uldrich AP, Kyriakopoulos K, Crowe NY, Brooks AG, Hammond KJ, et al. Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol.* 2003;33:1816-23.
31. Chun T, Page MJ, Gapin L, Matsuda JL, Xu H, Nguyen H, et al. CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. *J Exp Med.* 2003;197:907-18.
32. Wang L, Carr T, Xiong Y, Wildt KF, Zhu J, Feigenbaum L, et al. The sequential activity of Gata3 and Thpok is required for the differentiation of CD1d-restricted CD4+ NKT cells. *Eur J Immunol.* 2010;40:2385-90.
33. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, Fujio M, Garcia-Navarro R, Benhnia MR, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol.* 2006;7:978-86.
34. Shiratsuchi T, Schneck J, Kawamura A, Tsuji M. Human CD1 dimeric proteins as indispensable tools for research on CD1-binding lipids and CD1-restricted T cells. *J Immunol Method.* 2009;345:49-59.
35. Van Kaer L. Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells. *Immunol Res.* 2004;30:139-53.
36. Bienemann K, Iouannidou K, Schoenberg K, Krux F, Reuther S, Feyen O. iNKT cell frequency in peripheral blood of Caucasian children and adolescent: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood. *Scand J Immunol.* 2011;74:406-11.
37. Peralbo E, Corona A, Solana R. Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: Two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. *Exp Gerontol.* 2007;42:703-8.
38. Lin H, Nieda M, Hutton JF, Rozenkov V, Nicol AJ. Comparative gene expression analysis of NKT cell subpopulations. *J Leukoc Biol.* 2006;80:164-73.
39. O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+ CD8α+ and CD4-CD8α- invariant natural killer T cells. *PLoS One.* 2011;6:e28648.
40. Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, et al. Cutting edge: Analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2002;168:3140-4.
41. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature.* 2001;413:531-4.
42. Lee Pt, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med.* 2002;195:637-41.
43. Exley M, Porcelli S, Furman M, Garcia J, Balk S. CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V alpha 24J alpha Q T cell receptor alpha chains. *J Exp Med.* 1998;188:867-76.
44. Ho LP, Urban BC, Jones L, Ogg GS, McMichael AJ. CD4(-)CD8alpha subset of CD1d-restricted NKT cells controls T cell expansion. *J Immunol.* 2004;172:7350-8.
45. Cho YN, Kee SJ, Lee SJ, Seo SR, Kim TJ, Lee SS, et al. Numerical and functional deficiencies of natural killer T cells in systemic lupus erythematosus: their deficiency related to disease activity. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:1054-63.
46. Parietti V, Chiffot H, Sibia J, Muller S, Monneaux F. Rituximab treatment overcomes reduction of regulatory iNKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol.* 2010;134:331-9.
47. Roman-Gonzalez A, Moreno ME, Alfaro JM, Uribe F, Latorre-Sierra G, Rugeles MT, et al. Frequency and function of circulating invariant NKT cells in autoimmune diabetes mellitus and thyroid diseases in Colombian patients. *Hum Immunol.* 2009;70:262-8.
48. Kee SJ, Kwon YS, Park YW, Cho YN, Lee SJ, Kim TJ, et al. Dysfunction of natural killer T cells in patients with active mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun.* 2012;80:2100-8.
49. Mureithi MW, Cohen K, Moodley R, Poole D, Mncube Z, Kasmar A, et al. Impairment of CD1d-restricted natural killer T cells in chronic HIV type 1 clade C infection. *AIDS Res Hum Retrov.* 2011;27:501-9.
50. Jiang X, Zhang M, Lai Q, Huang X, Li Y, Sun J, et al. Restored circulating invariant NKT cells are associated with viral control in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One.* 2011;6:e28871.
51. Veldt BJ, van der Vliet HJ, von Blomberg BM, van Vlierberghe H, Gerken G, Nishi N, et al. Randomized placebo controlled phase I/II trial of alpha-galactosylceramide for the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2007;47:356-65.
52. O'Konek J, Terabe M, Berzofsky J. The role of NKT cells in the immune regulation of neoplastic disease. En: Wang RF, editor. *Innate Immune Regulation and Cancer Immunotherapy.* Springer; 2012. p. 7-21.
53. Hunn MK, Hermans IF. Exploiting invariant NKT cells to promote T-cell responses to cancer vaccines. *Oncoimmunology.* 2013;2:e23789.
54. Woltman AM, ter Borg MJ, Binda RS, Sprengers D, von Blomberg BM, Scheper RJ, et al. alpha-Galactosylceramide in chronic hepatitis B infection: Results from a randomized

- placebo-controlled Phase I/II trial. *Antivir Ther.* 2009;14:809-18.
55. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2002;8:3702-9.
56. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, et al. Therapeutic activation of V α 24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood.* 2004;103:383-9.
57. Richter J, Neparidze N, Zhang L, Nair S, Monesmith T, Sundaram R, et al. Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma. *Blood.* 2013;121:423-30.
58. Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, Fuchida H, Higashino K, Otsuji M, et al. A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1910-7.
59. Motohashi S, Nagato K, Kunii N, Yamamoto H, Yamasaki K, Okita K, et al. A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol.* 2009;182:2492-501.

7. CAPITULO II

7.1. INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE

La ICV se ha considerado un grupo de diferentes desordenes genéticos cuya prevalencia varia de 1 en 25000 a 1 en 50000 (3), y sus manifestaciones clínicas más comunes son las infecciones sinopulmonares y gastrointestinales acompañado de linfadenopatias y organomegalias. ICV también ha sido asociada con desórdenes autoinmunes como trombocitopenia autoinmune, anemia hemolítica y tiroiditis (4). Se ha encontrado que su distribución entre hombre y mujeres es homogénea y que su presentación ocurre generalmente en la adultez (>18 años) siendo para los hombres, relativamente más temprano (23 años comparado con 28 en las mujeres) (5). Identificado como una desregulación inmune, se ha tratado de identificar las causas genéticas de la ICV, sin embargo, esta enfermedad no puede atribuirse a un solo defecto genético, si no a diferentes alteraciones que convergen en unas manifestaciones clínicas similares.

Entre los defectos genéticos identificados hasta la fecha, se incluyen aquellos en genes que codifican para proteínas transmembranales, moduladores de calcio y ligandos para estimulación de la inmunidad celular. ICOS (del inglés, inducible costimulator) (6), TACI (del inglés, transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) (7) y miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral como BAFFR (del inglés, B-cell activating factor receptor) (8), además de deficiencias en moléculas del complejo de señalización del BCR como CD19 (9), CD20 (10), CD21 (11), CD81 (12) y CD40L (13) han sido los defectos genéticos ya reportados asociados con esta enfermedad.

Inmunológicamente, todas alteraciones genéticas se reflejan en grado variable con alteraciones en la distribución de las subpoblaciones de LB de SP y se

caracterizan por niveles reducidos de IgG, IgA y/o IgM en suero acompañado de una reducida o ausente respuesta a la vacunación.

7.2. FASES DE DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LOS LB

Para entender cuáles son las posibles causas de los defectos en los LB y sus consecuencias clínicas en los pacientes con ICV, es necesario conocer el desarrollo y función celular de estos linfocitos.

7.2.1. Primera Fase: Independiente de antígeno

En humanos, el desarrollo temprano de los LB después del nacimiento ocurre en la médula ósea a partir de células precursoras hematopoyéticas que originan LB inmaduros que posteriormente se dirigen en la periferia donde maduran progresivamente. Esta primera fase de desarrollo de LB es independiente de antígeno, y comienza con el proceso de configuración funcional de la estructura del receptor de la célula B (BCR), conformado por las cadenas pesadas μ , unidas por puentes disulfuro a las cadenas livianas kappa (κ) o lambda (λ).

Los rearrreglos de los segmentos génicos D y J de la cadena pesada en células CD10⁺/CD34⁺/CD19⁺ definen a las células progenitoras de LB (pro-B). Estas moléculas, a su vez, son marcadores celulares que permiten identificar el fenotipo temprano estas células; así, CD10 también llamado Neprilesina, es una proteína dependiente de zinc que se encuentra unida a la membrana celular y es reconocida como un marcador de progenitores linfoides; CD34, por su parte, es miembro de las sialumucinas y es expresado selectivamente en células progenitoras hematopoyéticas humanas y, finalmente, CD19 hace parte del co-receptor del LB y forma un complejo junto con el BCR para facilitar la transducción

de señales. El subsiguiente rearrreglo VL y JL de los segmentos génicos de la cadena liviana del BCR da lugar a las células pre-B identificadas como CD34⁻/CD10⁺/CD19⁺(14). Estas células pre-B expresan en su membrana un pre-BCR compuesto por las cadenas pesadas asociadas a una cadena liviana sustituta, que tiene la función de transducir señales que inducen el proceso de exclusión alélica de los segmentos génicos de esas cadenas pesadas y el rearrreglo de los genes de la cadena liviana.

Aunque muchas moléculas participan en la ontogenia de los LB, una de las mejor caracterizadas es proteína tirosina quinasa de Bruton (btk), cuya regulación positiva en las células pre-B es indispensable para la amplificación de las señales recibidas por el BCR (15), necesarias para la inducción de supervivencia de estas células. Btk es miembro de la familia de quinasas Tec, responsable parcialmente del reclutamiento y activación del fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) al complejo BCR. Esta unión, induce la liberación del calcio intracelular y contribuye a la activación de quinasas como la proteína quinasa C (PKC), la cual a su vez activa la vía canónica del factor de transcripción nuclear NF- κ B, conduciendo finalmente a la activación, proliferación y diferenciación del LB. La deficiencia de esta proteína cuyo gen está localizado en el cromosoma X es la principal causante de una enfermedad denominada agamaglobulinemia ligada al X (XLA) (16). En XLA hay un defecto en la diferenciación de las células pre-B en médula ósea hacia su fenotipo transicional (17), lo que genera ausencia de LB maduros y una severa reducción de Ig séricas con la consecuente alteración en la respuesta a infecciones, sobre todo por microorganismos encapsulados.

La diferenciación de LB en la médula ósea, finaliza entonces con un LB aún inmaduro que expresa un BCR funcional en la forma de una molécula de IgM en la superficie celular (18).

Antes de salir a la periferia, se identifican los LB inmaduros autoreactivos los cuales re-editan la cadena liviana del BCR o se seleccionan negativamente a

través de anergia o apoptosis. Aquellos linfocitos que pasen este punto de chequeo se denominan LB transicionales (Tr), pues están capacitados para transitar por la circulación y dirigirse hacia órganos linfoides secundarios. En el modelo murino, se ha identificado que esta migración ocurre en respuesta a quemoquinas relacionadas con el tránsito a tejidos linfoides, como la proteína quimioatrayente de tejido linfoide (SLC), la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-3 β , el factor derivado de células estromales (SDF-1 α), la quemoquina de atracción de LB (BCA-1) y a la expresión de los receptores de quemoquinas como CXCR5 y CCR6 (19), lo que les permite a los LB Tr migrar a lugares como bazo, amígdalas, placas de peyer, nódulos linfoides, donde finalizan el desarrollo temprano, en la fase dependiente de antígeno.

7.2.2. Segunda Fase: Dependiente de antígeno

Después de su paso por la médula ósea, los LB entran a un estado de transición, viajan en periferia y a los diferentes órganos linfoides, en donde sucede el reto antigénico. Este contacto estimula la activación de los LB, su maduración e induce su diferenciación terminal lo que define sus diferentes subpoblaciones.

Los LB Tr aún poseen un fenotipo inmaduro con una respuesta mediada por BCR atenuada (20). Su identificación se basa en la expresión de las moléculas de superficie CD19 y CD10 junto con CD20, una fosfoproteína expresada en la membrana celular del LB, involucrada en la activación celular y en la regulación del crecimiento y del flujo de calcio transmembranal. Además, ellos muestran una muy alta expresión de CD38, una proteína transmembranal que al unirse a anticuerpos agonistas, induce la activación de la vía de la proteína quinasa C, desencadenando señales de supervivencia, proliferación y cambio de isotipo. También se ha incluido para su identificación, la alta expresión de la molécula CD24, una sialoglicoproteína que modula señales de maduración y diferenciación

además de una alta expresión de IgD. Los LB Tr son también CD27 negativos, un marcador que comúnmente se utiliza para identificar células de memoria.

Se ha observado que existen dos estadios en los LB Tr dependiendo de la intensidad de la expresión de la molécula CD21, un miembro del correceptor del BCR compuesto además por CD19 y CD81, los LB Tr CD21^{low} y un subsecuente estadio CD21^{high}. Los LB Tr CD21^{low} son funcionalmente menos maduros, con una capacidad de proliferación y producción de anticuerpos reducida. Se postula que estos son entonces precursores del estadio CD21^{high}, que presentan un fenotipo más maduro. Adicionalmente, se ha demostrado que los LB Tr CD21^{low} en SP de DS, después de un estímulo T-dependiente, producen mayores cantidades de anticuerpos que reconocen componentes autólogos citoplasmáticos y nucleares (ANA) en comparación con aquellos CD21^{high}, demostrando que los LB Tr CD21^{low} presentan un fenotipo autoreactivo. Esta diferencia también sugiere que entre la transición de LB Tr CD21^{low} al estadio CD21^{high}, existe un punto de chequeo en la periferia que controla el paso de los LB Tr autoreactivos para aquellos auto-antígenos que no son expresado en médula ósea (21). Estudios en pacientes con deficiencias en CD40 ligando (CD40L) y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, sugieren que este punto de chequeo de autoreactividad es controlado por LT CD4⁺(22). Además, la acumulación de LB Tr autorreactivos, ha sido relacionada con el desarrollo de enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoidea (AR) ya que en SP de estos pacientes, se observan altas frecuencias de LB autoreactivos y polireactivos con un fenotipo transicional y virgen (23).

Después de pasar este punto de chequeo, los LB Tr CD21^{high} migran hacia el bazo y nódulos linfáticos en donde se activan y de manera gradual regulan negativamente la expresión de CD10 e IgM, dando paso al fenotipo de LB vírgenes (24).

Los LB vírgenes expresan en su membrana IgM e IgD pero carecen de CD27. En nódulos linfáticos, los LB vírgenes forman folículos que se encuentran separados de la zona de LT por una región interfolicular (25). Estas células pueden migrar a lugares de alta exposición antigénica como la mucosa intestinal, captar antígenos circulantes en órganos como el bazo, para diferenciarse a LB de zona marginal (LB ZM) o iniciar su diferenciación terminal a LB de memoria o plasmablastos (26).

Los LB ZM se identifican por un fenotipo IgM^{high}, CD21^{high}, CD1d^{high} y CD27+ acompañado de una expresión variable de IgD y la regulación negativa de CD23, el receptor de baja afinidad para IgE. Los LB ZM constituyen la primera línea de defensa en contra de los patógenos transportados por la sangre, ya que se encuentran en lugares altamente expuestos a antígenos como el epitelio de las criptas en las amígdalas, la pared interna de los senos subcapsulares de los nódulos linfoides, el subepitelio de las placas de Peyer, y en la zona marginal el bazo, que es la región de interfase entre la pulpa roja de tejido no-linfoide y la pulpa blanca de tejido linfoide de este órgano. La alta presencia de LB ZM en esta región es la razón de su denominación. Estas células expresan BCR polireactivos, es decir, moléculas en su mayoría de IgM, que reconocen una gran variedad de antígenos foráneos como propios que no se relacionan estructuralmente. Esta cualidad, les permite reconocer bacterias provenientes del ambiente así como también, células propias dañadas (27). De hecho, en modelos murinos como el de artritis autoinmune inducida por colágeno, inducida ya sea por una deficiencia en CD21 o en el receptor II-b para la porción Fc de la IgG, las células que principalmente expresan IgM específica para colágeno son los LB ZM. Este efecto se amplifica cuando estos LB son estimulados por la vía de los receptores de tipo-Toll (TLR), TLR4 y TLR9, sugiriendo que el desarrollo de la autoinmunidad mediada por los LB ZM está regulada por la activación de estos dos tipos de señales (BCR y TLR) (28). En este orden de ideas, se ha reportado que los LB ZM

(como los LB de memoria) también presentan una alta expresión de TLR, hecho que les confiere una capacidad de respuesta de tipo innato. De manera interesante, pacientes deficientes en MyD88 e IRAK- 4 presentan una reducción en el número de LB IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ en sangre periférica, un efecto más pronunciada para aquellos individuos con deficiencia en IRAK-4 (29).

Adicionalmente los LB ZM, son células efectoras responsables en gran parte de la respuesta inmune a polisacáridos. Usando polisacáridos de neumococo marcados fluorescentemente, se ha observado que los LB IgM⁺ CD27⁺ de SP son las células que principalmente reconocen estos antígenos y se incrementan luego de la aplicación de la vacuna polisacárida 23-valente contra neumococo (30). Como respaldo de esta afirmación, se ha demostrado que la baja respuesta a vacunas polisacáridas y una alta susceptibilidad a infecciones por microorganismos capsulados está correlacionado con una profunda disminución o ausencia LB ZM en SP, como se observa en personas con asplenia congénita o inducida, niños menores de 2 años, ancianos mayores de 65 años, pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un grupo de pacientes con ICV (31).

Otro aspecto importante a considerar de los LB ZM es su alta expresión de CD1d, lo que le confiere a estas células una capacidad elevada de presentar de antígenos glicolípidicos. Zietara y colaboradores purificaron LB ZM y células dendríticas (CD) del bazo de ratones silvestres y las sensibilizaron con diferentes concentraciones de α GalCer *in vitro*, para posteriormente co-cultivarlas con LNKTi, obtenidos del bazo de ratones transgénicos cuyos LT expresan la cadena α -invariante del TCR invariante V α 14J α 18 unida a V β 8.2, V β 7 o V β 2. Se observó que los LB ZM inducen mayor proliferación en los LNKTi en comparación con las CD, un efecto directamente proporcional a la concentración de α GalCer empleada.

Sin embargo, los LB ZM inducen primordialmente una respuesta tipo Th2 en los LNKTi (32). Adicionalmente, se ha comprobado que los LNKTi murinos son activados preferencialmente por LB ZM en comparación con LB foliculares esplénicos (33).

Sin embargo, para asegurar el desarrollo de una respuesta inmune humoral de larga duración, el desarrollo de los LB dependiente de antígeno debe dar paso a la generación de LB de memoria que lleven a cabo los procesos de cambio de isotipo e hipermutación somática (SHM). Convencionalmente ellos se identifican como LB IgD⁻/CD27⁺ en sangre periférica. No obstante, se ha cuestionado el uso de CD27 como marcador de memoria de LB, pues se ha identificado en SP, una población de LB CD27⁻/IgG⁺ cuyo análisis de las regiones Vh de IgG, muestran una distinguible, pero menor acumulación de mutaciones y una preferencia por la expresión de IgG2 e IgG3 que sus contraparte CD27⁺, sugiriendo que el factor determinante de sus diferencias no es la ausencia o presencia de CD27 si no los niveles de SHM y su respuesta inmune secundaria (34). Adicionalmente, un estudio por secuenciación de alto rendimiento del repertorio de las cadenas pesadas de Ig (IgH), demostró un alto grado de similitud entre las subpoblaciones de LB CD27⁺ y CD27⁻ (35).

Esto sugiere que CD27 debe ser usado en combinación con otras moléculas de superficie, para diferenciar los LB vírgenes de otras subpoblaciones, y que una mejor aproximación a las diferentes subpoblaciones de memoria es evaluar la proliferación extensiva producida por antígeno e SHM como la marca típica de los LB de memoria, por medio de la cuantificación de la historia de replicación y la frecuencia de nucleótidos mutados en rearrreglos de genes IGHV (36).

Finalmente, los plasmablastos son LB en su etapa final de diferenciación, ya sea por vía folicular o extrafolicular. Estas células se pueden detectar en la circulación

y se identifican por la alta expresión de CD38, la ausencia de IgM y la conservación de su capacidad proliferativa. Los plasmablastos “de corta vida”, secreta anticuerpos de alta afinidad después de haber realizado el cambio de isotipo e SHM, denominándose LB productores de anticuerpos profesionales, pues poseen la capacidad de secretar todos los isotipos de inmunoglobulinas dependiendo del estímulo. Además, se les ha atribuido la capacidad de producir citoquinas inmunoregulatoras como la IL-10, por ejemplo en ratones infectados por *Salmonella*, en los cuales se observaron altos niveles de RNAm para IL-10 en las poblaciones de LB identificadas como CD138^{hi}CD22⁺. Estos plasmablastos son capaces de migrar a médula ósea, en donde permanecen y se diferencian a células plasmáticas de larga vida, aptas para secretar anticuerpos de alta afinidad pero pierden su habilidad de proliferar. Estas células plasmáticas de larga vida, también pueden generarse directamente a partir de LB de CG, apoyados por la expresión de CD40L y la producción de IL-21 por parte del LT ayudador, lo que induce la expresión de receptores de quemoquinas para su migración a médula ósea (37).

Aún no se han determinado los factores que determinan la longevidad de las células plasmáticas pero se cree que la capacidad de formar nichos en asociación con otras diversas poblaciones celulares, proporciona un microambiente en donde se secreta APRIL (del inglés, A proliferation-inducing ligand) e IL-6, moléculas que inducen señales de supervivencia en estas células. Adicionalmente, la entrada al compartimento de células plasmáticas en la médula ósea, requiere de mecanismos que limitan la producción de IgG polireactivas. En humanos por ejemplo, se ha establecido que aproximadamente 9.3% de las células plasmáticas de médula ósea reaccionan al menos a dos antígenos estructuralmente diferentes, por lo tanto son polireactivas. Esta frecuencia es significativamente menor que la observada para los LB de memoria IgG⁺ (23%). De igual manera, al evaluar la

autorreactividad de las células plasmáticas de médula ósea humana, se ha identificado que aproximadamente el 13% de estas expresan IgG autoreactivos, frente a un 36% en los LB de memoria. De esta forma se concluye que la poli y autoreactividad son eventos regulados en las células plasmáticas de médula ósea (38).

Con base en las características específicas previamente mencionadas, se han desarrollado metodologías experimentalmente para el estudio *in vitro* de la capacidad de proliferación y producción de anticuerpos de las diferentes subpoblaciones de LB.

Se ha comprobado que cultivos primarios de LB humanos de CG al ser cultivados en presencia de IL-2, IL10 y células murinas L transfectadas con un constructo para CD40L, adquieren un fenotipo CD20⁺CD38⁻ (memoria), mientras que aquellos LB de CG cultivados con IL-2, IL-10, células L CD40⁻ y anticuerpos anti-CD40L, regulan negativamente la expresión de CD20, generando LB CD38⁺CD20⁻ (células plasmáticas). Para comprobar la capacidad de proliferación de estas células diferenciadas, se cultivaron nuevamente en presencia de IL-2, IL-10 y células L CD40⁻ o anti-Ig, determinando que bajo cualquiera de estos estímulos, los LB CD38⁺CD20⁻ pierden su capacidad de proliferación, al contrario de los LB CD20⁺CD38⁻. Esta modulación de la diferenciación a través de CD40L, se confirma al evaluar la producción de Ig totales en los sobrenadantes de estos cultivos, en los cuales la mayor concentración de Ig se encuentra bajo las condiciones de ausencia del estímulo de CD40L en comparación con el cultivo celular que posee células L CD40⁺(39). De esta manera se confirma que la presencia o ausencia de CD40L modula la diferenciación de los LB ya sea a LB de memoria o plasmablastos. También se ha evaluado el efecto del cultivo de LB periféricos en presencia de IL-21 en combinación con anti-CD40, anti-CD40+IL-2R, anti-IgM, anti-IgM+IL-4, anti-IgM+IL-4+IL-2R. Aunque IL-21 no induce por si

sola proliferación, en combinación con anti-CD40 actúa como co-estimulador y genera una potente respuesta proliferativa en los LB, mientras que en el cultivo con anti-IgM e IL-4, la IL-21 tiene un efecto regulador de la proliferación que se revierte al adicionar un anticuerpo anti-IL-21 (39). Adicionalmente, se ha observado que el cultivo de LB humanos con anti-CD40+IL-21 en conjunto con anti-IgM induce la diferenciación tanto de LB vírgenes de cordón umbilical y LB CD27⁺ de SP en plasmablastos (LB IgD⁻CD38⁺⁺⁺) y la producción de IgG (40). Por otra parte, estímulos basados en la estimulación T-independiente también se han evaluado. En ratones, se ha demostrado que la estimulación con agonistas de TLR 9, 4, 7 y 1/2 (CpG1668, LPS, R848 y Pam3CSK4, respectivamente), inducen la proliferación de LB foliculares y LB ZM provenientes del bazo. Sin embargo, estos estímulos y especialmente CpG1668 solamente inducen la diferenciación a células productoras de Ig en los LB ZM más no de aquellos LB foliculares, independiente de la cinética de secreción de Ig y de expresión del marcador CD138. La principal Ig producida por los LB ZM cultivados en presencia de agonistas de TLR es IgM, seguida por IgG y en una menor proporción IgA (41). Por otra parte, se ha identificado que en cultivos de CMSP humanas, en presencia de R848 e IL-2, se incrementan especialmente el número LB CD27⁺ (memoria) de manera independiente de CD40L (42).

Estos hallazgos demuestran que es posible plantear metodologías específicas para el cultivo de LB en presencia de diferentes estímulos, para realizar estudios detallados de la respuesta inmune de las subpoblaciones de LB.

7.3. PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Como se mencionó anteriormente, existe una fase de maduración de los LB dependiente de antígeno en la periferia, proceso que depende de las características de los antígenos reconocidos: los antígenos polisacáridos son

expuestos por las células dendríticas foliculares, lo que conduce a la formación de LB de CG, que se diferencian después en LB de zona marginal, localizándose en la interfase de la pulpa roja y blanca del bazo y en los cordones medulares. Estos LB siendo extrafoliculares pueden morir por apoptosis o también pueden diferenciarse en plasmocitos de larga vida. Sin embargo, los LB también reconocen antígenos polisacáridos que inducen el entrecruzamiento del BCR, generando así LB secretores de anticuerpos, de forma independiente a la formación de los LB de CG, resultando en una respuesta de baja afinidad (43). Por su parte, tras su exposición ante antígenos proteicos, presentados también por las células dendríticas foliculares, se inducen la generación de LB de centro germinal (CG); en secuencia, estos LB de CG pueden luego diferenciarse bien a células plasmáticas de larga vida, o bien, a células de memoria de larga vida. La diferenciación hacia células plasmáticas depende de la señalización por medio de los receptores de tipo-Toll (TLR), los cuales envían señales que logran activar una cascada de quinasas, las cuales finalizan en la degradación de BCL-6 y la expresión de Blimp-1, factor que al incrementar, define este estadio de diferenciación (44).

Los LB en proliferación que ocupan las zonas oscuras de los CG se designan como centroblastos. En ellos se regula negativamente la Ig de superficie y en humanos, adoptan el fenotipo $CD44^{high}CD77^{high}$. Durante esta fase de proliferación es que ocurre la SHM. Cuando un centroblasto sale de ciclo celular, se diferencia a centrocito, que se localiza en la zona clara del CG cerca de la red de células dendríticas foliculares (FDC). Los centrocitos re-expresan la Ig de superficie y regulan negativamente CD77.

Para la generación de LB de CG de manera eficiente, se requiere de señales presentes en otras células del CG ya que la exposición de LB de CG ante antígenos solubles conduce a la apoptosis de estas células. Las FDC, ($CD23^+$)

son células estromales especializadas del folículo, encargadas de acumular antígenos para su posterior presentación; su proceso de maduración depende del grupo linfotoxina- α , TNF- α , NF- κ B y BAFF. Existen FDC primarias en los folículos, que se especializan hasta convertirse en FDC secundarias, para ejercer su efecto en los centros germinales (CG). Se conocen cuatro vías de interacción de las FDC con los LB que inducen a la formación y persistencia de los CG. La primera vía se refiere al reconocimiento que hace la molécula CD40 del LB de los complejos inmunes de antígeno unidos a C3b, C4b y C4BP en la superficie de la FDC. De igual forma, las moléculas CD21 y CD35 expresadas por el LB también reconocen antígenos opsonizados por moléculas del complemento, expuestos en la superficie de la FDC. Los ratones deficientes de los receptores CD21/CD35, reconocedores de los fragmentos C3/C4 en las FDC, presentan un rápido decaimiento en los títulos de anticuerpos después de la inmunización, además de números reducidos plasmablastos en médula ósea en comparación con ratones normales (45). Esta respuesta no se recupera después de la reconstitución de médula ósea de ratones silvestres (46). Por microscopia de excitación de dos fotones, se ha evidenciado, que los antígenos opsonizado por las moléculas del complemento, pueden ser capturados desde la membrana de las CD y pasar al LB por medio de mecanismos de trogocitosis (47). La segunda vía de formación y persistencia de CG está dada por la acción de las integrinas presentes en las FDC, las cuales son requeridas para la estabilidad del centro germinal, la maduración de afinidad y producción de anticuerpos. Por otra parte, las moléculas Dock8 hacen parte de los factores intercambiadores de guanina no-clásicos y participan en la señalización “de adentro a afuera” mediada por integrinas. Las mutaciones en Dock8 se asocian a una deficiencia en el reclutamiento de la integrina ICAM-1 esencial para la formación de la sinapsis inmunológica en los LB, impidiendo la formación y persistencia de los CG (48). Adicionalmente, las FDC foliculares, poseen una alta expresión del receptor Fc (Fc γ RIIB), el cual se une a la Ig de

complejos inmunes circulantes, estos se endocitan y se transportan a través de compartimentos sin actividad proteolítica y finalmente se exponen en la superficie de la CD para luego, ser reconocidos por el LB a través de su BCR y CD21, generando una respuesta humoral específica en los LB, contra antígenos T independientes. La cuarta vía involucra a los receptores Notch: se ha demostrado que los LB de CG expresan los receptores Notch 1 y Notch 2 mientras que las FDC expresan los ligandos de Notch, Delta-like 1 y Jagged 1. Cuando se bloquea la señalización mediada por Notch, se disminuye la supervivencia de los LB en los CG. Las FDC son además una fuente importante de quemoquinas, que generan el reclutamiento de LT, los cuales después de ser activados por las FDC, ayudan a los LB y a la respuesta humoral. De estos linfocitos denominados ayudadores (LTh) se han descrito 4 tipos principales según los factores de transcripción que expresan y las citoquinas que producen: Th1, Th2, Th17 y Tfh. Los linfocitos Th1 expresan T-bet y tienen la capacidad de migrar hasta los LB en la zona folicular en donde producen IL-12 e IFN- γ principalmente, de esta manera inducen la expansión clonal de los LB, la producción de anticuerpos y específicamente por la acción del IFN- γ , el cambio de isotipo a IgG2a. Gracias a esto, se genera una respuesta antigénica específica, contra patógenos intracelulares como virus, bacterias y protozoos. Los LTh2, expresan Gata3 y modulan la respuesta humoral a partir de la expresión de IL-5, IL-4 e IL-13. Estas citoquinas inducen la secreción de anticuerpos particularmente, del tipo IgE. Su actividad provee resistencia a parásitos grandes extracelulares como los helmintos (49, 50). Para aquellos Th17, el factor de transcripción principal es ROR γ τ y producen IL-21, IL-22 y como su nombre lo especifica, IL-17A e IL-17F. Estos linfocitos no solo activan la proliferación de los LB a través de IL-21, sino que también promueven la formación de CG y el cambio de isotipo hacia IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (51). Por su parte, el factor de transcripción Bcl6 ha sido identificado como específico para los LTfh,

los cuales además de la producir citoquinas estimuladoras, son capaces de establecer un contacto directo con los LB para promover el mantenimiento de los CG, la diferenciación de LB CG en LB de memoria o células plasmáticas y asegurar la memoria inmunológica. Aunque se ha definido un claro fenotipo de los LTfh, *in vitro* se ha probado la plasticidad de estos linfocitos. Son capaces adquirir las funciones características de los otros tipos de LTh, como ocurre con la producción de IL-17. Adicionalmente, los LTh1, Th2, Lth17 pueden adquirir el fenotipo y función de los LTfh. Como un ejemplo la expresión de Bcl6 en LTh1, para diferenciarse finalmente en LTfh (52, 53).

Sin la cooperación de los LTfh, los LB de CG son incapaces de expandirse más allá de la primera etapa donde se forman centroblastos y se generan los primeros centrocitos. Cinco días después de esta primera ronda de proliferación y diferenciación independiente de LTfh, los LB de CG sufren una apoptosis masiva. Entonces, la cooperación de LTfh es necesaria para ayudar a los centrocitos que han salido de ciclo celular a que entren a ciclo nuevamente y de esta manera, renueven el pool de centroblastos. Debido a que los centrocitos son los que re-expresan la Ig, se ha asumido que la selección de los LB que han sufrido SHM se lleva a cabo predominantemente en centrocitos. La re-expresión del BCR mutado permite la interacción de estos centrocitos con FDC que expresan antígenos para su presentación a los LTfh y posterior selección. Sin embargo, algunos datos sugieren que la selección también puede ocurrir en centroblastos. Los LB que se seleccionan positivamente pueden tomar tres rutas: diferenciarse a LB de memoria de larga vida, a células plasmáticas o entrar a ciclo celular nuevamente adoptando nuevamente el fenotipo de centroblastos.

Los LTfh presentan el fenotipo CXCR5⁺, PD-1⁺, iCOS⁺, GL7⁺, Bcl-6⁺ en los folículos y se ha sugerido que recirculan en la periferia, en donde se han

identificado LT CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ que expresan marcadores de migración a tejido linfoide como CCR7 y CD62L y migran en respuesta a sus respectivos ligandos, CXCL13 y CCL19, además, conservan la capacidad ayudadora de los LB, pues aún en co-cultivos LT:LB *in vitro*, son capaces de inducir en los LB la expresión de CD38 y una respuesta antígeno-específica con la producción de IgM, IgG e IgA (54). Sin embargo, la cooperación entre los LT y LB en los CG ocurren en dos fases: la primera involucra el contacto entre LB:LTfh que induce la formación del CG seguida de una segunda fase que garantiza el mantenimiento de CG. Existen moléculas consideradas esenciales para la primera fase como: CD40L, ICOS, Bcl6, IRF-4. Por ejemplo, el bloqueo de la señalización mediante CD40L en CG ya establecidos ocasiona su disolución rápida y el tratamiento con un agonista de CD40, restaura las estructuras de CG (55). Adicionalmente, el co-cultivo *in vitro* de LB con LT de memoria humanos, los cuales al activarse son CD40L^{high}, disminuye la expresión de CD77 en los LB, por lo que se postula que la señalización mediante CD40L le permite a los LB entrar a ciclo celular y renovar el pool de LB en proliferación como centrocitocitos (56). Otro hallazgo interesante, es que cuando los LB humanos se cultivan con LT provenientes de amígdalas humanas los cuales también son CD40L^{high} se induce en los LB, más un fenotipo de memoria que de células plasmáticas (56). En humanos, la deficiencia de CD40L se manifiesta inmunológicamente con la ausencia de IgG, IgA, IgE sérica con IgM normal o aumentada, lo que confiere susceptibilidad a infecciones oportunistas y gérmenes extracelulares (57).

Adicionalmente otras moléculas presentes en estas células son requeridas para el mantenimiento de los centros germinales (CG) como CXCR5, SAP, IL-21, IL-4, miembros de la familia SLAM e IL-27 (58). Con respecto a SAP, se ha observado que para la interacción y cooperación entre los LT:LB en CG se requiere la interacción homotípica de moléculas de la familia SLAM acompañado de la

expresión intracelular de SAP en los LTfh y tanto los LT como los LB deben presentar a su vez una alta expresión de Bcl6 (59). Esta interacción mediante SAP, promueve la formación de complejos LT:LB estables. De manera interesante, se ha observado que en ratones deficientes en SAP se genera un reclutamiento y retención ineficiente de los LTfh en CG, se reduce drásticamente el tiempo de contacto entre LT:LB y la expansión clonal de LB antígeno-específicos, sin embargo la expresión de CD40L, ICOS y CXCR5 es comparable con la encontrada en ratones silvestres (60). Entonces, aunque ambas fases del desarrollo de los CG dependen de interacciones mediadas por integrinas como CXCR5 además de CD40L y ICOS, solo la segunda fase es dependiente de SAP (59).

Además de las moléculas que participan en la interacción LB-LTfh para la formación y el mantenimiento de los CG, otras moléculas solubles y de membrana son esenciales para el cambio de isotipo en los LB. Por ejemplo, se ha establecido en cultivos *in vitro* de LB humanos, que la presencia conjunta de IL-21+CD40L modula la producción de Ig. En los LB vírgenes de SP, bazo y de cordón umbilical, elicitán la secreción de IgG3 y si conjuntamente se incluye a la IL-4 como estímulo, se genera un cambio de isotipo hacia IgG1. Sin embargo, si los LB esplénicos estimulados son aquellos de memoria, IL-21+CD40L inducen la producción de LB IgG1⁺ y al adicionarse IL-4, se genera un cambio hacia la secreción de IgG2 (61). Adicionalmente, moléculas como APRIL y BAFF han demostrado activar el cambio de isotipo en cultivos *in vitro* de LB esplénicos de ratones CD40^{-/-}, principalmente hacia la producción de IgG1 e IgA. Sin embargo, la adición de IL-4 en conjunto con APRIL o BAFF promueve adicionalmente la síntesis de IgE. Para la inducción de cambio de isotipo mediada por APRIL, es necesaria la expresión de su ligando TACI mientras que su otro ligando, BCMA (del inglés, B cell maturation antigen) es dispensable. Por otra parte, para inducir cambio de isotipo, BAFF requiere la expresión de TACI y de BAFF-R en la membrana de los LB (62). En ratones

deficientes del receptor de TGF- β (T β R, del inglés transforming growth factor receptor), se ha observado una profunda disminución de plasmablastos IgA⁺ en fosas nasales, pulmones y con mayor profundidad, en el epitelio intestinal.

7.4. MECANISMOS DE COOPERACIÓN DE LOS LNKTi A LOS LB

Se ha establecido, que adicionalmente a la ayuda proporcionada por los LTfh, los LNKTi, son capaces de inducir la proliferación de los LB y promover la producción de inmunoglobulinas ya sea por contacto indirecto o directo.

7.4.1. Ayuda de contacto indirecto de los LNKTi a los LB

Las primeras investigaciones sobre la relación de los LNKTi con otras células del sistema inmune se desarrollaron en ratones silvestres y CD1d^{-/-} tratados con α GalCer. En estos experimentos se encontró que la inmunización con α GalCer induce la expresión de CD69 en los LT, LB y células NK además de CD80 y CD86 en los LB, demostrando que la activación de los LNKTi influye en la función de otras células de respuesta inmune adaptativa (63). Adicionalmente, se ha demostrado la capacidad inmunomoduladora de los LNKTi para los LTh2 específicos inoculando ratones con ovoalbúmina(OVA) y α GalCer, lo que induce una mayor proliferación de los LT esplénicos específicos para OVA y una mayor producción de IL-4 en estas células con una elevada secreción de IgE en suero, una respuesta dependiente de CD1d (64). Sin embargo, estos experimentos no establecen cuáles son los mecanismos que facilitan la interacción entre los LNKTi y las otras poblaciones de linfocitos.

Posteriormente se propuso que los LNKTi podían establecer contacto con las APC como macrófagos y células dendríticas, gracias a que estas expresan CD1d en su superficie. En un trabajo realizado por Hermans y colaboradores, se determinó que los LNKTi activados puede inducir la maduración de las CD derivadas de médula ósea. Por otra parte, se encontró, que sólo cuando las CD se pulsan simultáneamente con un antígeno proteico y α GalCer, se incrementan los LT CD8⁺ péptido-específicos. De manera interesante, la interacción LNKTi:CD es dependiente de CD40L pero independiente del receptor de IFN- γ y no es necesaria cuando se induce la maduración de las CD por otros mecanismos. Esto confirma que se requieren CD CD40⁺ para la activación de los LT CD8⁺ inducida por los LNKTi, describiéndose entonces la ayuda “indirecta” dependiente de contacto de estas células a otros linfocitos de la inmunidad adaptativa (65). En un trabajo similar, se demuestra que las CD esplénicas son capaces de estimular selectivamente la respuesta proliferativa de LT vírgenes CD4⁺ y CD8⁺ siempre y cuando las CD inyectadas expresen al mismo tiempo OVA y α GalCer(66).

Interesantemente, se ha propuesto que este tipo de ayuda indirecta mediada por CD se realiza en la zona marginal del bazo en donde se encuentran gran parte de los LNKTi en estado basal dispersos en la pulpa roja y blanca, en presencia de una alta concentración de APC (67). Después de la inmunización con α GalCer, los LNKTi no incrementan en número, sin embargo se acumulan en la ZM y en los canales de unión del bazo. Experimentos análogos en ratones silvestres inmunizados con glicoesfingolípido-1 mostraron los mismos resultados (68).

Con la intención de investigar la identidad de las APC que participan en la activación de los LNKTi en el bazo, Barral y col, analizaron primero la capacidad de retención de antígenos lipídicos en las CD y en los macrófagos del bazo. Ratones silvestres fueron inyectados con fracciones de glicolípidos particulados fluorescentes, y posteriormente, se les extrajo el bazo para identificar por

microscopia confocal las CD o los macrófagos fluorescentes. Después de su inoculación *in vivo*, los lípidos particulados fueron retenidos por el 50% de las CD y los macrófagos de ZM, los cuales a su vez mostraron altos niveles de CD1d. Adicionalmente se encontró que las CD poseen una mayor capacidad de presentación antigénica de lípidos particulados que los macrófagos, lo que se evidencia por una mayor producción de IL-2 por parte de un hibridoma de LNKTi (67).

Sin embargo, al realizar la depleción de CD y macrófagos de pulpa roja y ZM de ratones, se observa que cerca del 20% de LNKTi se activaron y secretaron IFN- γ , lo que sugiere que otras células que expresan CD1d en su superficie como los LB pueden también interactuar con los LNKTi en el bazo (67). De manera interesante, los LB esplénicos murinos incrementan la fosforilación de STAT6 y STAT1 después de la inyección de α GalCer de forma dependiente de la expresión de CD1d. Estos hallazgos, sugieren que los LNKTi influyen la función de los LB (68).

En 2009, Tonti E y colaboradores reconstituyeron la médula ósea de ratones inmunodeficientes RAG^{-/-} letalmente irradiados, en un 80% con células de médula ósea (CMO) de ratones carentes de LB y en un 20% con CMO de ratones ya sea CD1d^{+/+} o CD1d^{-/-}. Para determinar la producción de anticuerpos específicos contra el virus de la influenza A subtipo H3N2 (H3N2) o toxoide tetánico (TT), en presencia o no de α GalCer. Tanto en los ratones con LB carentes de CD1d como aquellos CD1d^{+/+}, los títulos de los anticuerpos inducidos con cualquiera de los antígenos mas α GalCer, fueron significativamente mayores a aquellos inducidos solo por el antígeno. Estos hallazgos sugieren que no es necesaria la expresión de CD1d en los LB para inducir la producción de anticuerpos a antígenos presentados por CMH clase I o clase II, mediada por la activación de los LNKTi.

Alternativamente las CD presentando simultáneamente antígenos lipídicos y proteicos en el contexto de CD1d y CMH podrían ejercer esta función de enlace entre los LNKTi y los LB. Para generar APC que no expresaran en su superficie ya sea CD1d o CMH clase II, ratones CD1d^{-/-} letalmente irradiados, fueron reconstituidos con CMO provenientes de ratones CMH clase II^{-/-} o de ratones CD1d^{-/-}. Posteriormente, los ratones fueron inoculados con TT con o sin α GalCer, observándose que los títulos de los anticuerpos específicos inducidos por la adición del antígeno + α GalCer, fueron menores en aquellos ratones en los cuales las APC expresan CMH clase II y CD1d por separado que en los ratones silvestres, los cuales expresan estas dos moléculas simultáneamente. Estos hallazgos, demuestran que los LNKTi inducen una respuesta por parte de los LB mediada por APC que expresan simultáneamente CMH clase II y CD1d. De manera interesante, esta activación de los LB mediada por LTNKi y dependiente de la presencia de CD CD1d⁺ CMH clase II⁺ es dependiente de CD40, sugiriendo que los LT convencionales son también requeridos para la activación de la inmunidad humoral a antígenos T-dependientes en este modelo (69).

Todos estos hallazgos indican que cuando la presentación de antígenos proteicos ocurre simultáneamente con la presentación de los antígenos glicolipídicos por medio de la expresión de CD1d en la CD a los LNKTi, la respuesta de los LT ayudadores se incrementa, induciéndose de manera indirecta la producción de inmunoglobulinas en los LB.

7.4.2. Ayuda de contacto directo de los LNKTi a los LB

Bajo la premisa de que los LNKTi proporcionan una ayuda de no-contacto a los LB, surge la pregunta sobre si esta interacción LNKTi:LB puede darse de forma directa. Para resolver esta cuestión, en 2003 Galli G. y colaboradores, obtuvieron

LNKTI a partir de CMSP de DS, que fueron cultivados con LB purificados autólogos para analizar *in vitro* la capacidad proliferativa de los LB y su producción de inmunoglobulinas. A partir de SP, se purificaron y cultivaron LB CD27⁺ y LB CD27⁻ junto con LNKTi CD4⁺ autólogos, con o sin α GalCer. Se observó que los LNKTi *in vitro*, son capaces de inducir la proliferación de LB tanto vírgenes como de memoria tanto en presencia como en ausencia de α GalCer. Adicionalmente, se purificaron LB a partir de CMSP y se cultivaron junto con clones de LNKTi CD4⁺ que fueron irradiados adicionando ya sea anti-CD3 o α GalCer. Después de 10 días de cultivo, se encontró que los LB producían IgM e IgG1 cuando eran expuestos a LNKTi CD4⁺ activados ya sea con anti-CD3 o con α GalCer. Por el contrario, cuando los LNKTi se activaban solamente con α GalCer, se observaba la producción únicamente de IgM. De manera paralela, para confirmar el contacto directo entre células LNKTi:LB, a estos co-cultivos también se les añadió un anticuerpo contra CD1d, y se observó que tanto la proliferación como la producción de anticuerpos se inhiben (70). De estos resultados se deduce que la sola activación de los LNKTi induce una producción de IgM e IgG1 por parte de los LB, independiente del mecanismo de activación y lo que es más sobresaliente, es que para la producción de Ig es indispensable la presencia de CD1d, es decir se necesita el contacto entre LNKTi:LB.

Por otra parte, una de las aproximaciones para conocer el mecanismo de la interacción LNKTi:LB surgen a partir de la síntesis química de un glicolípido unido a un hapteno, nitrofenil (NP- α GalCer). Los ratones silvestres inoculados con esta molécula mostraron una producción de IgG e IgM séricas específicas para el hapteno y la proliferación *in vitro* de LB esplénicos. De forma complementaria, un análisis inmunohistológico corroboró la expansión de LB esplénicos antígeno-específicos en respuesta a la estimulación con NP- α GalCer. Sin embargo, al cultivar LB CD1d^{-/-} en presencia de LT transgénicos para el TCR de los LNKT, no

se observó la proliferación de LB. Adicionalmente, en el modelo *in vivo*, ratones CD1d^{-/-}, CD40L^{-/-} y CD80/CD86^{-/-} inoculados con NP- α GalCer no exhibieron producción de Igs séricas. Esto demuestra que el contacto directo entre los LNKTi:LB es dependiente de las moléculas coestimuladoras como CD40L y la presentación glicolipídica de CD1d (33).

Por otra parte, se ha descrito que los LNKTi tienen la capacidad de desarrollar un fenotipo ayudador folicular y localizarse en centros germinales. En ratones CMH clase II^{-/-}, la inyección de α GalCer en conjunto con diferentes antígenos proteicos NP-CGG induce la regulación positiva de PD-1, CXCR5, ICOS, y Bcl-6 en los LNKTi esplénicos de estos ratones, en conjunto con un incremento en el porcentaje de estos LNKT ayudadores foliculares. Aquí demuestra que los LNKTi pueden adquirir el fenotipo ayudador independientemente de la presencia de los LT CD4⁺. Tinciones inmunohistológicas del bazo después de 7 días de la inoculación con α GalCer + Ag proteicos, evidenciaron que aún en ausencia de LT CD4⁺, ocurre la formación de CG en donde se presenta una retención de LNKTi. Un hallazgo importante es que el bloqueo de CD40L a los ratones CMH clase II^{-/-} (sin LT CD4⁺), previo a la inmunización con α GalCer+Ag proteicos, genera una drástica reducción en los títulos de Ig específicos. Sin embargo, la presencia de LT CD4⁺ si es esencial para la respuesta a la generación de respuesta inmune secundaria. Esto sugiere que los LNKTi tienen un fenotipo fh, participan en reacciones de CG e inician la ayuda a los LB, pero en ausencia de los LT CD4⁺, los LNKTi no pueden mantener una respuesta de anticuerpos de larga duración (71).

Para identificar las moléculas requeridas en esta interacción de contacto entre los LNKTifh:LB, Detre C. y colaboradores analizaron la función de SAP dada su importancia para la formación de CG en la interacción LT:LB. En un principio se

establecieron dos modelos de ratones deficientes para SAP; SAP^{-/-}.B6 y SAP^{-/-}.BALB/c y de manera interesante, se encontró que los ratones SAP^{-/-}.BALB/c contienen niveles detectables de LNKTi en el timo, bazo e hígado a diferencia de la profunda disminución de estos linfocitos en los mismos órganos obtenidos a partir de los ratones SAP^{-/-}.B6. Adicional a este hallazgo, se determinó que la inmunización con NP-KLH+αGalCer genera un incremento en los niveles séricos de IgG NP-específica en los ratones SAP^{-/-}.BALB/c, sin embargo, no se detectaron diferencias en el número de LB de CG después de la inmunización de estos ratones. Esta evidencia establece que la activación de los LNKTi deficientes de SAP, genera un incremento de la respuesta antígeno-específica en los LB, sin embargo, no son capaces de elicitar respuestas de CG. Adicionalmente, se generó un modelo de ratones con una deficiencia de SAP inducible por el tratamiento con tamoxifen y se inmunizaron con el lípido haptenido, NP-αGalCer, para evaluar la respuesta temprana y tardía antígeno-específica en la interacción de contacto LNKTi:LB en comparación a aquellas en ratones silvestres. Cinco días después de la inmunización, se determinó una disminución en los niveles séricos de IgM e IgG específicos para NP-αGalCer que permanecieron bajos incluso 13 días después de la inoculación en los ratones deficientes en SAP, frente a ratones silvestres. De forma paralela, se realizó una esplenectomía para identificar los LB de centro germinal específicos para NP, los cuales se encontraron reducidos en los ratones deficientes en SAP. Estos resultados confirman que la ayuda de contacto entre los LNKTi:LB requiere la expresión de SAP en los LNKTi para la formación de CG y la producción de Ig (72).

En resumen, la ayuda de contacto de los LNKTifh a los LB, requiere la expresión de CD40L y SAP para inducir la formación de CG, sin embargo estos son de corta duración y por lo tanto no producen una respuesta de Ig sostenida en el tiempo.

7.5. LNKTi EN PACIENTES CON ICV

En adición a la distribución anormal en SP de las subpoblaciones de LB en los pacientes con ICV, se han reportado anomalías en el número y función de los LNKTi en estos pacientes. En un primer estudio, se evaluaron los porcentajes de LNKTi en SP de una cohorte de 47 pacientes con ICV, en los cuales se evidenció una disminución de los porcentajes de células iNKT en SP constante en el tiempo, principalmente en los pacientes con baja frecuencia de LB con cambio de isotipo en SP, en comparación con los DS y pacientes con XLA. Esta disminución, no se encontró asociada a ninguna de las características clínicas de los pacientes (73). Posteriormente, Carvalho K. y colaboradores, a partir de muestras de CMSP criopreservadas, reportan que no se observan diferencias en los porcentajes de LNKTi circulantes en pacientes con ICV y DS pero sí una disminución en los números absolutos de estos linfocitos. Adicionalmente, el análisis de las subpoblaciones de LNKTi en SP de estos pacientes, no muestra alteraciones numéricas en los LNKTi CD4⁺ sin embargo, sí se observa una disminución en los LNKTi CD8 α ⁺. La caracterización de la expresión de receptores de quemoquinas en los LNKTi, muestra que estos linfocitos presentan un fenotipo de activación CCR5⁺/CD69⁺/CXCR6⁻ en mayor porcentaje y una expresión variable del marcador CD161 en SP de los pacientes con ICV (74). Por otra parte, Paquin-Proulx D y colaboradores, evaluaron el impacto de la terapia de reemplazo de inmunoglobulina en los LNKTi de SP de los pacientes con ICV. En un estado pretratamiento se describe un alto porcentaje de LNKTi CD161⁺ en SP de los pacientes, como un estado de sobreactivación de estas células, sin embargo, después de la terapia con gammaglobulina los porcentajes de LNKTi CD161⁺ en SP son regulados y no presentan diferencias al compararse con aquellos de los DS. Adicionalmente, se demuestra que el defecto numérico de LNKTi periféricos

de los pacientes con ICV, no se recuperan por el tratamiento (75). Aunque previamente no se había descrito que los pacientes con ICV tengan ausencia total de LNKTi, Gao Y. y colaboradores reportaron que en una cohorte de 36 pacientes con ICV, 42% de ellos presentan una ausencia total de LNKTi en SP y en los pacientes restantes, una disminución de estos linfocitos en comparación a los DS. Al evaluar la función de los LNKTi de pacientes con ICV, se observa que en cultivos de CMSP enriquecidos en LNKTi, la capacidad proliferativa de estos linfocitos es variable entre pacientes y adicionalmente, la producción de citoquinas después del cultivo, muestra una alta producción de IFN- γ y una baja secreción de IL-17, concluyendo que esta subpoblación de LT no es sólo numéricamente, sino también funcionalmente afectada en ICV (76).

Todos estos hallazgos, proveen herramientas para la caracterización de los defectos de los LNKTi en los pacientes con ICV, sin embargo, aspectos más profundos de la interacción de los LNKTi con otras células del sistema inmune y su incidencia en el fenotipo clínico de este síndrome aún no se han evaluado.

8. CAPITULO III

Sometido a publicación en Journal of Innate Immunology

Impaired invariant NKT:B cell help and decreased SAP expression in blood lymphocytes from patients with Common Variable Immunodeficiency

Erazo-Borrás LV, Álvarez-Álvarez JA, Perez-Romero CA, Orrego-Arango JC, Franco-Restrepo JL, Trujillo-Vargas CM

Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Corresponding Author: Claudia M. Trujillo-Vargas, CI 62 #52-59, Lab 530, Sede de Investigaciones Universitarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Summary

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is classified as a syndrome with predominantly defective B cell function. However, abnormalities in number and function of other lymphocyte subpopulations in peripheral blood (PB) have been described in most patients. We have analyzed the distribution of iNKT cell subpopulations in PB and their ability to provide *in vitro* cognate B cell help in patients with CVID. Reduced total, CD4⁺ and remarkably, double negative (DN) together with those CCR5⁺/CXCR3⁺iNKT cells were observed in PB from CVID patients. Only steady-state PBMC from our patients were enriched in CD40L⁺ iNKT cells whereas those stimulated with PMA/Ionomycine were reduced in IFN- γ - and TNF- α producing iNKT cells. A defective B cell proliferation was observed in CVID after exposure to α GalCer-pulsed iNKT cells although they were able to secrete

immunoglobulins at the same extent that those cells from healthy donors. Also, intracellular SAP expression was reduced in iNKT cells and other lymphocytes from PB in CVID. Our study demonstrates a impairment in the cognate iNKT:B cell help in CVID, a finding that may be related to a decreased expression of the intracellular SAP protein in the lymphocytes from these patients. These results provide further insights into the immunological mechanisms underlying the iNKT cell defect and the potential targets to improve B cell help in CVID.

Key Words: Invariant Natural Killer T cells (iNKT), B cells, Common Variable Immunodeficiency (CVID), Cognate B cell help, SLAM-associated protein (SAP).

INTRODUCTION

Invariant Natural Killer T (iNKT) cells are a subset of T lymphocytes expressing an invariant TCR (iTCR) that recognize glycolipids presented in the context of CD1d on antigen-presenting cells (2, 3). CD1d also plays a role in the positive selection of iNKT cells in the thymus, a process dependent on SAP (SLAM-associated protein) (4, 5). In addition, SAP also modulates cytotoxic iNKT cell function promoting the formation of immunological synapses (6) as well as cognate iNKT:B cell help in the periphery (7). Unlike other T cell subpopulations, most iNKT cells in steady state express homing receptors for extralymphoid tissues (CCR2, CCR5, and CXCR3), and produce different immunoregulatory cytokines such as IL-4, IFN- γ and TNF- α , a hallmark of effector T cells (8-10).

Cognate and non-cognate iNKT:B cell cross-talk are important for the proper development of humoral immune responses and occur in a conventional T-cell independent manner, resulting in an extrafollicular response with immunoglobulin class switching but no B cell memory (11-13). On the other hand, non-cognate iNKT:B cell stimulation enhances T cell-dependent responses, inducing germinal center maintenance, sustained B cell memory and immunoglobulin class

switching(7, 14). The key role of iNKT cells in B cell function is also supported by the iNKT cells abnormalities described in autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (15) rheumatoid arthritis (RA) (16) and multiple sclerosis (17, 18). Moreover, iNKT cells are also decreased in peripheral blood (PB) of patients with several primary immunodeficiencies including Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) (19), X-linked lymphoproliferative disease (XLP) (5, 20) and Common Variable Immunodeficiency (CVID) (21-26).

CVID is a heterogeneous primary antibody syndrome characterized by hypogammaglobulinemia, poor response to vaccination and susceptibility to gastrointestinal and respiratory infections (25). Mutations in several genes associated with B cell terminal differentiation have been described in these patients leading mainly to low numbers of switched-memory (smB) and increased transitional (TrB) B cells (27).

Studying a cohort of 47 CVID patients, Fulcher et al reported a consistent decrease in the percentages of iNKT cells in PB, particularly in CVID patients with low frequency of smB cells as compared with healthy donors (HD) and individuals with X-linked agammaglobulinemia (XLA)(21), a finding that is not affected by the immunoglobulin replacement therapy(26). et al, also demonstrated high frequencies of activated CCR5⁺/CD69⁺/CXCR6⁻ as well as skewed percentages of CD4⁺ and CD8⁺ iNKT cells in cryopreserved PBMC from CVID patient(22). Finally, Gao et al. described a low production of cytokines such as IL-13, IL-17 and proliferative capacity in enriched iNKT cell cultures from CVID patients PBMC (24).Therefore, these finding suggests that iNKT cells are impaired both in number and function in CVID.

Although these investigations provide an insight into iNKT cell abnormalities in CVID, questions remain about how this affects B cell development and function.

Therefore, we have evaluated the number, phenotype and function of iNKT cells from freshly isolated PBMC and the *in vitro* capacity of these cells to provide cognate B cell help in patients with CVID.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Twenty-two individuals diagnosed with CVID according to the European Society for Immunodeficiencies (ESID) criteria (<http://esid.org/Resources/Diagnostic-Criteria-PID>) were included in this study. They were further classified taking into account the Euroclass B-cell subpopulation profiles in PB (Wehr C, Blood, 2008). In addition, four X-linked Btk agammaglobulinemia (XLA) patients and 22 age- and sex-matched HD were voluntarily recruited. This study was reviewed and approved by the Institutional Review Board from the University of Antioquia and written informed consents were obtained from the childrens' parents and adults.

Blood sampling and lymphocyte subpopulation staining

EDTA blood samples were collected from all the individuals and the frequency and phenotype of the different lymphocyte subpopulations were determined by multiparametric flow cytometry. Briefly, PB cells were incubated with the corresponding mAbs for 20 min/RT in the dark. Erythrocytes were lysed by incubation with FACS lysing solution (Becton Dickinson, BD, San Jose, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Flow cytometry was performed using the BD FACScan and analyzed using the FlowJo V8-2 software (Tree Star, Inc. Ashland, OR USA).

CD19⁺ B cells (anti-CD19 clone SJ25C1) subsets were defined as follows: Anti-IgD (clone IA6-2) and anti-CD27 (clone M-T271) monoclonal antibodies (MAbs) were used to classified naïve, switched-memory and marginal zone-like B cells. Transitional B cells and plasmablasts were recognized as CD38⁺⁺/IgD⁺⁺ and

CD38⁺⁺/IgD⁻ respectively, using MAbs (anti-CD38 clone HIT2, anti-IgD clone IA6-2). Also, the expression of CD1d (anti-CD1, clone CD1d42) was analyzed in total B cells. iNKT cells were identified as CD3 (anti-CD3, clone SK7) and iTCR (clone 6B11) double positive cells, and their subsets were studied using the MAbs against different surface molecules as follows: CD4 (clone UCHL1), CD8 α (clone OKT8) and β (clone 2ST8.5H7), CD45RO (clone UCHL1), CXCR5 (clone RF8B2), CD62L (clone DRE656), CCR7 (clone 150503), CXCR3 (clone 1C6/CXCR3), CCR5 (clone 2D7/CCR5). All antibodies were purchased from BD.

In addition, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinised blood, washed with phosphate-buffered saline and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. Cell activation and intracellular cytokine production were determined in PBMC cultures (one million cells/ml in six well plates) using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/mL, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) and ionomycin (1 μ g/ml, SIGMA-ALDRICH) for 4 hours. Thereafter, cells were evaluated for the expression of the activation markers CD40L (clone TRAP1) and CD69 (clone FN50). To assess cytokine production, Brefeldin A (10 μ g/m, SIGMA-ALDRICH) was added two hours after PMA/ionomycin stimulation and cells were incubated for additional 4 hours. Intracellular staining was performed using the BD Cytofix/CytopermTM Fixation/Permeabilization Kit. The intracellular cytokines evaluated included IFN- γ (clone 4S.B3), TNF- α (clone 6401.1111) and IL-4 (clone 8D4-8). Intracellular SAP expression was measured by indirect staining with the anti-SH2D1A (clone 1C9) and a secondary anti-IgG2 antibody (clone M2A-15F8) and the SAP expression index was established as the Median Fluorescence Intensity (MFI) of SAP positive cells minus MFI of the secondary antibody divided in the MFI of the secondary antibody.

iNKT cells enrichment, Purification and cloning ex vivo

To expand iNKT polyclonal cells *in vitro*, 1×10^6 freshly isolated PBMCs were stimulated with α -GalactosylCeramide (α GalCer, 50ng/ml, KRN7000 Funakoshi, Tokyo, Japan) and 24 hours later, recombinant human Interleukin-2 (rhIL-2, 20U/ml, BD) was added to the cell cultures. Cells were maintained under rhIL-2 (40 U/ml) supplementation every 48 h for the following 15 to 20 days. Thereafter, CD3⁺ iTCR⁺CD4⁺ iNKT cells were sorted using a MoFlo™ XDP (Beckman-Coulter, Miami, FL). These polyclonal iNKT cells were used as helper cells for the first set of B:iNKT co-cultures. To obtain monoclonal iNKT cells, CD3⁺ iTCR⁺ CD4⁺ iNKT cells were sorted at 1 cell/well in U-shaped 96-well plates containing 200 ul RPMI-complete medium, 0.5 ug/ml Phytohemagglutinin (SIGMA), 50U/mL of rhIL-2 (BD) and 1×10^6 /ml pooled PBMCs obtained from three different donors and irradiated at 8.000 rad. iNKT cells clones were grown at 37°C and 5% CO₂ for 15 days and then used for the monoclonal set of B:iNKT co-cultures.

B cell stimulation and B:iNKT cell co-culture

B cells were isolated from PB by negative selection using the Human B Cell Enrichment Cocktail RosetteSep™ (StemCell, Vancouver, British Columbia, Canada) and then seeded alone or stimulated with Goat F(ab')₂ anti-human IgM (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) plus C-class CpG ODN 2395 (Integrated DNA technologies, IDT, Coralville, IA) or CD40L trimers plus IL-21 (generously provided from Hermann Eibel, Center for Chronic Immunodeficiency, Freiburg, Germany). B cells were also stimulated with polyclonal or monoclonal CD4⁺ iNKT cells (1:10 ratio) w/o α GalCer. After 5 days of incubation, B cell proliferation (in either CD19⁺ or CD20⁺ cells) was determined by staining with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen, Carlsbad, CA). Cell culture supernatants were collected at day 10 and stored at -70°C to measure IgM, IgG and IgA levels

by ELISA, using the Ready-SET-Go kits following the manufacturer's instructions (affymetrix-eBioscience, Santa Clara, CA).

Results

Description of study population

This study included twenty-two CVID patients diagnosed according to the ESID criteria. In addition, all patients were classified according to the EUROclass B-cell subpopulation profiles in PB (27). All our patients exhibited >1% of B cells from total lymphocytes in PB. Among them, fifteen showed $\leq 2\%$ of switched memory (smB) cells and seven presented with >2% of smB cells (named smB- and smB+, respectively). Within the first group, we included 4 patients with ≥ 9 . All CVID patients and HD exhibited expression of CD1d in more than 88% of PB B cells (Data not shown) with the exception of three smB- patients who exhibited CD1d expression in 72, 70, 31% of the PB B cells, respectively. Homogeneous demographic and clinical characteristics were observed in both CVID groups as summarized in Tables 1 and 2. Early CVID onset (Age at first symptom <10 years) was observed in 10 (66.6%) and 2 (28.6%) patients from the smB- and smB+ groups, respectively. Sinopulmonary infections were the most common clinical manifestations in both CVID groups followed by those in skin and soft tissues. Autoimmunity was observed at similar frequencies in both groups as well as bronchiectasis, the last considered the main disease sequel. Only two patients from the smB- group manifested each either meningitis or neoplasia (A duodenal diffuse large B-cell lymphoma). Most of the patients were asymptomatic at the time of the evaluation, with the exception of four that presented with mild respiratory symptoms and one with diarrheal disease.

Skewed iNKT cell subpopulations in PB from CVID patients

As different studies have reported quantitative decrease in the percentages and absolute numbers of iNKT cells in PB from CVID, we decided first to evaluate these parameters in fresh PB from our study groups.

The HD group showed variable distribution of iNKT cell percentages in PB (calculated from total T cells), however, only four of them exhibited outlier values (<0.025 or >0.57). We observed significantly reduced frequencies and absolute numbers of total iNKT cells in both smB⁻ and smB⁺ groups (median percentages 0.077 and 0.037; median of absolute numbers 1482 and 808 cells/ml blood, respectively, in comparison with median percentages 0.178 and absolute numbers 3957 cells/ml in HD) (Figure 1A). Interestingly, all our XLA patients also exhibited a significantly decrease in the percentages and absolute numbers of iNKT cells in PB (median percentages 0.018 and absolute numbers 154 cells/ml) as compared with the HD group (Figure 1A). A representative example of the differences in the total PB iNKT cell percentages for a smB⁺ patient and the age and sex-matched HD is shown in Figure 1B. No differences were observed in the iNKT cell percentages and absolute numbers in PB as patients with early or late-onset disease were compared (Data not shown).

To analyze if iNKT cell reduction in CVID was subset-specific, the different iNKT cells subpopulations were evaluated in PB. CD4⁺ iNKT cells have been reported to induce activation of conventional CD4⁺ T, B and NK cells, producing more IL-4 and IL-2 than their counterparts (28). On the other hand, CD8 α/β ⁺ and DN (CD4⁻/CD8 α) iNKT cells show a Th1 phenotype and cytotoxic activity, however DN iNKT cells are additionally able to produce IL-17(28). We found similar distribution of CD4⁺ iNKT cell percentages in all the study groups (Figure 2A). However, a marked decrease in the frequency of DN iNKT cells in PB was observed in CVID with significant differences obtained for the smB⁺ group (Figure 2A).

We also analyze the percentages of double positive ($CD4^+/CD8\alpha^+$, DP) iNKT cells in our study groups. Zloza et al have described DP iNKT cells in PB from HD, however, functional analysis of this cell subset had not been further investigated (29). Conventional DP T cells are increased in the elderly and in pathological conditions such as systemic sclerosis (18), melanoma (30) and Hodgkin Lymphoma (31). An increase in the percentages of DP iNKT cells only in PB for smB+ CVID group was observed as compared with HD (median percentages: 23.30 and 4.44, respectively; $p = 0.0045$).

Importantly, the reduction of DN iNKT cells in PB from smB+ CVID patients was concomitant to an increase in the $CD8\alpha^+$ iNKT cells percentages (median percentages: 54.20 compared with 30.76 of total iNKT cells for the HD group; $p=0.0064$). Although $CD8^+$ iNKT cells subpopulation have mostly been identified for the expression of the $CD8\alpha$ chain (32), only $CD8\alpha/\beta^+$ T cells, have the capacity to bind MHC class I complexes inducing cytokine production and cytotoxicity (33). Therefore, we analyze the percentages of $CD8\alpha/\beta^+$ iNKT cells in PB from our study groups. We found that not only smB+ but also smB- CVID patients exhibited increased percentages of this cell subpopulation in PB (median percentages: 28.20 and 48.60 for the smB- and smB+ groups as compared with 7.94 of total iNKT cells for the HD group; $p=0.030$ and $p=0.0008$, respectively)

Subsequently, we analyze the absolute numbers of these iNKT cells subpopulations in PB (Figure 2B). A reduction in the $CD4^+$ iNKT cell numbers in both groups of CVID patients was observed in comparison to HD. DN iNKT cells also showed a reduction in total cell numbers in PB in all the study groups in comparison to HD (Figure 2B), a difference that was more pronounced in the SmB+ group.

To ascertain if the skewed iNKT cell distribution in PB from CVID patients is due to a differential migratory response, we evaluated *ex vivo* the homing receptor expression in the surface of these lymphocytes. In humans, the double expression of CD62L and CCR7 have been described as a hallmark for central memory iNKT cells (34), whereas CCR5⁺/CXCR3⁺ double positive iNKT cells have been identified as effector cells in the mouse model (35). Interestingly, increased percentages of iNKT cells expressing lymphoid tissue homing receptors (CD62L⁺/CCR7⁺) was observed in PB from smB⁻ as well as smB⁺ CVID patients (Figure 2C). This was associated with a reduction in the percentages of effector CCR5⁺/CXCR3⁺ iNKT cells in all groups of CVID patients (median percentages: 33.90 and 38.50 for the smB⁻ and smB⁺ groups as compared with 52.30 of total iNKT cells for the HD group, Figure 2C), however, this data does not reach statistical significance ($p=0.0532$ and $p=0.1936$, respectively). On the other hand, absolute numbers of CD62L⁺/CCR7⁺ iNKT cells were not increased in PB from CVID patients and only profoundly reduced numbers of CCR5⁺/CXCR3⁺ iNKT cells were observed in these groups of individuals (Figure 2D).

Interestingly, the percentages of all these iNKT cell subpopulations in XLA patients were similar to those obtained in HD (Data not shown) although absolute numbers were always reduced (Figure 2A-D).

A representative example of our findings with regard to the iNKT cell subpopulation percentages in PB for a smB⁺ patient and the age and sex-matched HD is shown in Figure 2E and F.

Taking together, this data indicate that selective iNKT cell subsets, specifically, pro-inflammatory DN cells, are altered in PB from CVID patients, an effect more pronounced in smB⁺ individuals. On the contrary, our findings about PB iNKT cells from XLA patients suggest a more generalized defect that does not alter iNKT cell percentages in PB.

***In vitro* activation of iNKT cells from CVID patients PBMC upon unspecific stimulation.**

To further investigate iNKT cells in CVID not only quantitatively but also qualitatively, we assessed the activation and cytokine production capacity of these cells upon stimulation of PBMC with PMA/Ionomycin. Beside their role in conventional T cells, CD69 and CD40L have been identified as markers of iNKT cell activation after lipid presentation. These cells also release mainly pro-inflammatory cytokines, as a primary outcome after antigen recognition (reviewed by (36, 37)). No differences were observed in the expression percentages of CD69 between HD and CVID patient's iNKT cells from PBMC before and after stimulation (Data not shown). With regard to the CD40L expression, we found significant increased PBMC CD40L⁺ iNKT cell percentages in the smB⁻ CVID patients as compared with those from HD, previous to stimulation (median percentages: 6.670 and 4.190, respectively; $p=0.0052$). However, this difference was not observed upon exposure to PMA/Ionomycin (Data not shown). As shown in figure 3A, a mild reduction in the *in vitro* IFN- γ -producing iNKT cells upon stimulation was found in smB⁺ CVID patients. This was also observed for the intracellular production of TNF- α by stimulated-PBMC iNKT cells, with statistical significance among smB⁺ CVID patients and HD. No differences were found for the IL-4 producing iNKT cells from PBMC among groups. A representative example of these findings for a smB⁺ individual and its age- and sex-matched HD is shown in Figure 3B. This data demonstrate that iNKT cells are functionally able to become activated after PMA/Ionomycin exposure however they exhibited an overactivated phenotype with high CD40L steady-state expression.

***In vitro* B:iNKT cell co-cultures.**

The iNKT:B cells cognate help has been investigated in mice and humans. In these models, mainly CD4⁺ iNKT cells induce B cell proliferation and immunoglobulin

secretion (11, 38, 39). In order to establish the helper capacity of iNKT cells obtained from CVID patients, we perform B cell proliferation assays when exposed to autologous or heterologous CD4⁺ iNKT cells isolated from PBMC of our patients and HD, by the CFSE dilution assay (Heterologous source of iNKT cells: the age and sex-matched HD in the case of CVID patient B cells or viceversa). The proliferative response was compared with that obtained in cultures w/o exposure to either anti-IgM+CpG or CD40L trimer+IL-21. Autologous co-cultures were performed in eight smB⁻ and three smB⁺ CVID patients whereas heterologous co-cultures in six smB⁻ and two smB⁺ individuals with their corresponding age- and sex-matched HD. As HD B cells proliferation was evaluated, we observed a marked response to anti-IgM+CpG or CD40L trimer+IL-21. Also, autologous HD B:iNKT cell co-cultures in the presence of c induced a milder but considerable proliferation of B cells (Figure 4A, panels for HD1, 2 and 3). Interestingly, as CVID iNKT cells were used in the HD iNKT:B cell co-cultures, we detected B cell proliferative responses comparable to those obtained from autologous co-cultures (see column for heterologous in comparison with that for autologous iNKT cells in panels for HD1 and 2, Figure 4A). Irrespective of the CVID groups, either a proper or a strongly impaired response to anti-IgM+CpG was observed among patients as compared with matched HD (Figure 4A, column IgM+CpG, panels for P1, 2 and 3 respective to panels for HD1, 2 and 3). Interestingly, all the CVID patient's B cells exhibited a variable but considerable response to CD40L trimer+IL-21 stimulation (Figure 4A, column CD40L+IL-21). With regard to the B:iNKT cell co-cultures, despite of the unaltered capacity of patient's iNKT cells to stimulate HD B cells, they were not able to induce proliferation of B cells in autologous co-cultures (see column for autologous iNKT cells in comparison with unstimulated in panels for P1, 2, and 3; Figure 4A). This impaired response was not retrieved as patient B cells were co-cultured with CD4⁺ iNKT cells from HD (see column for heterologous iNKT cells in panels for P1, and 2; Figure 4A). Similar results were

observed using monoclonal iNKT cells for the autologous and heterologous co-cultures (Figure 4B).

To investigate the immunoglobulin production by B cells after exposure to iNKT cells, we measured by ELISA the concentration levels of IgM, IgG and IgA in the supernatants of these co-cultures (Figure 4C). Stimulation with anti-IgM+CpG or CD40L trimers+IL-21 induced IgM and IgA responses in B cells from CVID patients comparable to those observed in B cells from HD. On the contrary, IgG secretion was significantly lower in B cells from CVID patients, when stimulated *in vitro* with CD40L trimers+IL-21 as compared with that from HD B cells. Also, *in vitro* stimulation with anti-IgM+CpG induced lower IgG secretion in CVID patient's B cells although the statistical analysis does not reach significance ($p=0.0649$). More interestingly, either autologous or heterologous α GalCer-pulsed iNKT cells are able to induce comparable immunoglobulin secretion in B cells from both, CVID patients or HD. This data demonstrate that, independent on the source, iNKT cells are able to induce immunoglobulin secretion in B cells even in the absence of overt proliferation.

Altered mechanisms of iNKT:B cell cognate help in CVID patients

Since iNKT:B cells from CVID patients are not able to induce B cell proliferation in polyclonal as well as monoclonal co-cultures, we wanted to investigate the amount of follicular helper iNKT cells (iNKTfh) in PB from HD and CVID patients. CD45RO⁺ CXCR5⁺ iNKTfh would be the cells in these co-co-cultures with the ability to induce proliferation and antibody responses in B cells as shown in the mouse model (11). Interestingly, we observed an increased frequency of iNKTfh cells in PB from CVID patients (median percentages: 38 and 43.50 iNKTfh cells from 100 CD4⁺ iNKT cells for the smB⁻ and smB⁺ groups as compared with 13 for the HD group, $p=0.0175$ and $p=0.0442$, respectively; Figure 5A). Thus, iNKTfh cells were enriched in our *in vitro* iNKT:B cell co-cultures, an event that would favor B cell function however, this

not able to restore B cells proliferation in the presence of autologous iNKT cells in CVID. Thus, due to the importance SAP in the induction of iNKT cell-mediated B cell proliferation (7), we evaluated the intracellular expression of this molecule in iNKT cells obtained from PBMC of CVID and HD individuals in comparison with that expression in PB NK and T cells. The SAP expression index was significantly reduced in iNKT from PBMC as well as in NK and T cells from PB from CVID patients as compared with those in HD (Figure 5B). Due the importance of SAP in the iNKT cells ontogeny and function, its impaired expression in these lymphocytes may result in functional deficiencies in their ability to help B cells in the context of CVID.

Discussion

Previous work have been described about numerical, migratory and functional impairment in the PB iNKT cells from CVID patients (21, 22, 24), however, the mechanism underlying this deregulation is not well understood. In the present study, we have investigated the phenotype of PB iNKT cell subsets and their capacity to support cognate B cell help in CVID patients. Initially, we confirmed the reduction in the number and frequency of total iNKT cells in PB from CVID patients, however, a more detailed analysis, demonstrated a profound decreased in the percentages and absolute numbers of PB DN iNKT cells. Also, absolute numbers but not percentages of CD4⁺ iNKT cells were reduced with an increase in the percentages of CD8 α ⁺ and CD8 α / β ⁺iNKT cells as a compensatory effect. These results differs for those published by Carvalho et al, who reported low absolute number of total and CD4⁺ iNKT cells but with reduction also in the CD8 α ⁺ subset in CVID patients (22). However, Carvalho et al use cryopreserved iNKT cells and overlook the measurement of DN and CD8 α / β ⁺iNKT cell subpopulation, two methodological details probably responsible for these discordant results. Taking into account the high frequency of infections and inflammatory conditions observed

in these patients, our data suggest that DN iNKT cells are leaving the PB to exert their function in extralymphoid tissues. This assumption is supported by the significant reduction in absolute number of the effector CCR5⁺/CXCR3⁺ iNKT cells in PB from these patients, probably due to their exaggerated recall to inflamed tissues. These assumptions are supported by the quantification of effector T cells in PB vs. inflamed tissues in other human inflammatory conditions. In patients with Juvenile Idiopathic Arthritis, a specific recall of CCR5⁺/CXCR3⁺T cells in synovial fluid from inflamed joints has been observed. This recruitment is related with the persistence of destructive inflammation in synovial joints (40). Additionally, higher percentages of CCR5⁺/CXCR3⁺ T cells in cerebrospinal fluid have also been reported in patients with Multiple Sclerosis (41), who presented reduced frequency of total and DN iNKT cells in PB (42). On the contrary, our findings about PB iNKT cells distribution in XLA patients, suggest a generalized defect in the development and ontogeny of these cells in central lymphoid tissues.

On the other hand, we wanted to evaluate the function of iNKT cells from PMA/Ionomycin-stimulated-PBMC. In CVID patients, we detected a greater CD40L surface expression in steady state iNKT cells and also a reduction in the frequency of IFN- γ and TNF- α iNKT producing-cells upon stimulation. An increased expression of CD40L in human CD8⁺ T cells has been associated with a memory phenotype. CD40L-expressing cells have also reduced inflammatory-homing capability (43). This data agreed with our previous results suggesting that PB from CVID patients are depleted in iNKT cells with ability to migrate to inflamed tissues. Interestingly, steady state CD40L^{high}-expressing T cells in PB has been associated with unfavorable prognosis in RA patients (44), and also favors the production of autoantibodies in SLE-derived B cells (45), a finding that might also be associated with CVID progression. On the other hand, our data are in disagreement with those published by Gao et al, who reported a bias towards IFN- γ -producing cells after PBMC α GalCer stimulation in three CVID patients. However, we also showed that

the IFN- γ production in stimulated-PBMC from CVID patients is highly variable and thus, an analysis of higher amount of patients is always necessary to drive consistent results.

Additionally, we wanted to assess if the ability of CD4⁺ iNKT cell to provide B cell help was preserved in CVID patients. In fact, B cells from these patients were unable to proliferate either after stimulation with α GalCer-pulsed CD4⁺ autologous or HD-obtained iNKT cells. On the contrary, B cells from HD proliferated in the presence of either autologous or heterologous α GalCer-pulsed CD4⁺ iNKT cells. These results demonstrated the preserved capacity of CD4⁺ iNKT cells from CVID patients to provide cognate B cell help and highlight the proliferative defect of CVID B cells after iNKT cell stimulation. Interestingly, despite the defective B cells proliferation in CVID after iNKT cell cognate help, these cells are still able to secrete comparable amounts of immunoglobulins in the presence of autologous and heterologous α GalCer-pulsed iNKT cells. Detre et al, showed that immunization with NP- α GalCer induces reduced albeit detectable levels of anti-NP IgM and IgG antibodies in adult mice with an inducible SAP deficiency even in the total absence of GC B cells (7). Although proper molecular interactions occurs between SAP-deficient T and B cells, a marked reduction in the contact time is observed, a finding that correlates with the impairment of antigen-specific B cell clonal expansion (46). These findings suggest that SAP-deficient T cells exhibit a failure in the long-term interaction with B cells, which induces defective B-cell expansion and GC development. Since a reduction of intracellular SAP protein was observed in lymphocytes from our CVID patients, we propose that the diminished expression of SAP, reduces the contact time in the iNKT:B cell cognate help leading an impaired B cell proliferation, but allowing a first-cycle of antibody responses.

Taking together, our results demonstrated a specific diminution in the DN and in a lesser extent, in the CD4⁺ iNKT cells in PB from CVID patients with a concomitant decrease in those expressing both CCR5 and CXCR3. Moreover, iNKT cells expressing high levels of CD40L, which suggested a memory phenotype, seems to be enriched in PBMC from these patients. Also, we show compelling evidence that the iNKT:B cell cognate help is impaired in CVID, a finding that may be related to a decreased expression of the intracellular SAP protein in the lymphocytes from these patients. Further studies are necessary to elucidate the mechanism responsible for the diminution of intracellular SAP in CVID-derived lymphocytes. This knowledge will provide new insights about alternative therapeutic approaches to restore the B cell-dysfunction in CVID.

References

1. Darmoise A, Teneberg S, Bouzonville L, Brady RO, Beck M, Kaufmann SH, et al. Lysosomal alpha-galactosidase controls the generation of self-lipid antigens for natural killer T cells. *Immunity*. 2010 Aug;33(2):216-28. PubMed PMID: 20727792. eng.
2. Skold M, Xiong X, Illarionov PA, Besra GS, Behar SM. Interplay of cytokines and microbial signals in regulation of CD1d expression and NKT cell activation. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3584-93. PubMed PMID: 16148102. Epub 09/09. eng.
3. Ito S, Iwaki S, Kondo R, Satoh M, Iwabuchi K, Ohkawa R, et al. TNF-alpha production in NKT cell hybridoma is regulated by sphingosine-1-phosphate: implications for inflammation in atherosclerosis. *Coron Artery Dis*. 2014 Jun;25(4):311-20. PubMed PMID: 24448174. Epub 2014/01/23. eng.
4. Engel I, Zhao M, Kappes D, Taniuchi I, Kronenberg M. The transcription factor Th-POK negatively regulates Th17 differentiation in Valpha14i NKT cells. *Blood*. 2012 Nov 29;120(23):4524-32. PubMed PMID: 23034280. PMCID: Pmc3512232. Epub 2012/10/05. eng.
5. Pasquier B, Yin L, Fondaneche MC, Relouzat F, Bloch-Queyrat C, Lambert N, et al. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):695-701. PubMed PMID: 15738056. PMCID: Pmc2212840. Epub 2005/03/02. eng.
6. Das R, Bassiri H, Guan P, Wiener S, Banerjee PP, Zhong MC, et al. The adaptor molecule SAP plays essential roles during invariant NKT cell cytotoxicity and lytic synapse formation. *Blood*. 2013 Apr 25;121(17):3386-95. PubMed PMID: 23430111. PMCID: Pmc3637014. Epub 2013/02/23. eng.

7. Detre C, Keszei M, Garrido-Mesa N, Kis-Toth K, Castro W, Agyemang AF, et al. SAP expression in invariant NKT cells is required for cognate help to support B-cell responses. *Blood*. 2012 Jul 5;120(1):122-9. PubMed PMID: 22613797. PMCID: Pmc3390951. Epub 2012/05/23. eng.
8. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708-12. PubMed PMID: 10537110. Epub 1999/10/28. eng.
9. Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2003 May;9(5):582-8. PubMed PMID: 12669034. Epub 2003/04/02. eng.
10. Oki S, Chiba A, Yamamura T, Miyake S. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J Clin Invest*. 2004 Jun;113(11):1631-40. PubMed PMID: 15173890. PMCID: Pmc419488. Epub 2004/06/03. eng.
11. Tonti E, Fedeli M, Napolitano A, Iannacone M, von Andrian UH, Guidotti LG, et al. Follicular helper NKT cells induce limited B cell responses and germinal center formation in the absence of CD4(+) T cell help. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3217-22. PubMed PMID: 22379027. PMCID: Pmc3559029. Epub 2012/03/02. eng.
12. King IL, Amiel E, Tighe M, Mohrs K, Veerapen N, Besra G, et al. The mechanism of splenic invariant NKT cell activation dictates localization in vivo. *J Immunol*. 2013 Jul 15;191(2):572-82. PubMed PMID: 23785119. PMCID: Pmc3710125. Epub 2013/06/21. eng.
13. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant

natural killer T cells. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):477-90. PubMed PMID: 22406267. PMCID: Pmc3391684. Epub 2012/03/13. eng.

14. Tonti E, Galli G, Malzone C, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction. *Blood*. 2009 Jan;113(2):370-6. PubMed PMID: 18832653. eng.

15. Cho YN, Kee SJ, Lee SJ, Seo SR, Kim TJ, Lee SS, et al. Numerical and functional deficiencies of natural killer T cells in systemic lupus erythematosus: their deficiency related to disease activity. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Jun;50(6):1054-63. PubMed PMID: 21278064. Epub 2011/02/01. eng.

16. Tudhope SJ, von Delwig A, Falconer J, Pratt A, Woolridge T, Wilson G, et al. Profound invariant natural killer T-cell deficiency in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Oct;69(10):1873-9. PubMed PMID: 20444757. Epub 2010/05/07. eng.

17. Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ*. 2010;51:127-47. PubMed PMID: 19582416. Epub 2009/07/08. eng.

18. Demoulin T, Gachelin G, Bequet D, Dormont D. A biased Valpha24+ T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol Lett*. 2003 Dec 15;90(2-3):223-8. PubMed PMID: 14687729. Epub 2003/12/23. eng.

19. Astrakhan A, Ochs HD, Rawlings DJ. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for homeostasis and function of invariant NKT cells. *J Immunol*. 2009 Jun;182(12):7370-80. PubMed PMID: 19494259. PMCID: PMC2830893. eng.

20. Gutierrez-Hincapie S, Muskus-Lopez CE, Montoya CJ, Trujillo-Vargas CM. Quantitative defects in invariant NKT cells and TLR responses in patients with hyper-IgE syndrome. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015 Mar 19. PubMed PMID: 25796310. Epub 2015/03/23. Eng.

21. Fulcher DA, Avery DT, Fewings NL, Berglund LJ, Wong S, Riminton DS, et al. Invariant natural killer (iNK) T cell deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2009 Sep;157(3):365-9. PubMed PMID: 19664144. PMCID: PMC2745030. eng.
22. Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT, et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS One*. 2010;5(9). PubMed PMID: 20844745. PMCID: PMC2936579. eng.
23. Trujillo CM, Muskus C, Arango J, Patiño PJ, Montoya CJ. Quantitative and functional evaluation of innate immune responses in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(3):207-15. PubMed PMID: 21548449. eng.
24. Gao Y, Workman S, Gadola S, Elliott T, Grimbacher B, Williams AP. Common variable immunodeficiency is associated with a functional deficiency of invariant natural killer T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1420-8, 8.e1. PubMed PMID: 24582167. Epub 2014/03/04. eng.
25. Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency: an update. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):223. PubMed PMID: 23043756. PMCID: Pmc3580506. Epub 2012/10/10. eng.
26. Paquin-Proulx D, Santos BA, Carvalho KI, Toledo-Barros M, Barreto de Oliveira AK, Kokron CM, et al. IVIg immune reconstitution treatment alleviates the state of persistent immune activation and suppressed CD4 T cell counts in CVID. *PLoS One*. 2013;8(10):e75199. PubMed PMID: 24130688. PMCID: Pmc3793979. Epub 2013/10/17. eng.
27. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):77-85. PubMed PMID: 17898316. Epub 2007/09/28. eng.

28. O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4⁺, CD8 α ⁺ and CD4⁻CD8 α ⁻ invariant natural killer T cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e28648. PubMed PMID: 22174854. PMCID: PMC3236218. eng.
29. Zloza A, Al-Harhi L. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. *J Leukoc Biol*. 79. United States 2006. p. 4-6.
30. Desfrancois J, Moreau-Aubry A, Vignard V, Godet Y, Khammari A, Dréno B, et al. Double Positive CD4⁺CD8⁺ $\alpha\beta$ T Cells: A New Tumor-Reactive Population in Human Melanomas. *PLoS One* [Internet]. 2010; 5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008437>.
31. Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hasserjian RP. A double-positive CD4⁺CD8⁺ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2006 Nov;126(5):805-14. PubMed PMID: 17050078. Epub 2006/10/20. eng.
32. Kim CH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V α 24(+)V β 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):11-6. PubMed PMID: 12070001. Epub 2002/06/19. eng.
33. Lischke T, Schumacher V, Wesolowski J, Hurwitz R, Haag F, Koch-Nolte F, et al. CD8-beta ADP-ribosylation affects CD8(+) T-cell function. *Eur J Immunol*. 2013 Jul;43(7):1828-38. PubMed PMID: 23575529. Epub 2013/04/12. eng.
34. Beziat V, Nguyen S, Exley M, Achour A, Simon T, Chevallier P, et al. Shaping of iNKT cell repertoire after unrelated cord blood transplantation. *Clin Immunol*. 2010 Jun;135(3):364-73. PubMed PMID: 20153980. Epub 2010/02/16. eng.
35. Matsuda JL, Zhang Q, Ndonge R, Richardson SK, Howell AR, Gapin L. T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the

development of Valpha14i NKT cells. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2797-805. PubMed PMID: 16357323. PMCID: Pmc1895373. Epub 2005/12/17. eng.

36. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):101-17. PubMed PMID: 23334244. Epub 2013/01/22. eng.

37. Zeissig S, Blumberg RS. Commensal microbiota and NKT cells in the control of inflammatory diseases at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol*. 2013 Dec;25(6):690-6. PubMed PMID: 24210255. PMCID: Pmc3867259. Epub 2013/11/12. eng.

38. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, et al. CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med*. 2003 Apr 21;197(8):1051-7. PubMed PMID: 12695492. PMCID: Pmc2193881. Epub 2003/04/16. eng.

39. King IL, Fortier A, Tighe M, Dibble J, Watts GF, Veerapen N, et al. Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat Immunol*. 2012 Jan;13(1):44-50. PubMed PMID: 22120118. PMCID: Pmc3833037. Epub 2011/11/29. eng.

40. Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 Apr;43(4):765-74. PubMed PMID: 10765921. Epub 2000/04/15. eng.

41. Teleshova N, Pashenkov M, Huang YM, Soderstrom M, Kivisakk P, Kostulas V, et al. Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. *J Neurol*. 2002 Jun;249(6):723-9. PubMed PMID: 12111306. Epub 2002/07/12. eng.

42. Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol*. 2003 Feb;15(2):279-88. PubMed PMID: 12578858. Epub 2003/02/13. eng.

43. Frentsch M, Stark R, Matzmohr N, Meier S, Durlanik S, Schulz AR, et al. CD40L expression permits CD8⁺ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood*. 2013 Jul 18;122(3):405-12. PubMed PMID: 23719298. PMCID: Pmc4548794. Epub 2013/05/31. eng.
44. Berner B, Wolf G, Hummel KM, Muller GA, Reuss-Borst MA. Increased expression of CD40 ligand (CD154) on CD4⁺ T cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2000 Mar;59(3):190-5. PubMed PMID: 10700427. PMCID: Pmc1753086. Epub 2000/03/04. eng.
45. Zhou Y, Yuan J, Pan Y, Fei Y, Qiu X, Hu N, et al. T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2009 Sep;132(3):362-70. PubMed PMID: 19520616. PMCID: Pmc2810511. Epub 2009/06/13. eng.
46. Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):764-9. PubMed PMID: 18843362. PMCID: Pmc2652134. Epub 2008/10/10. eng.

Table I. Demographic description of the study population

Demographic Data	CVI Patients groups		XLA patients	HD
	smB-	smB+		
N	15	7	4	22
Sex (% females)	53.3	42.8	0	45.5
Current Age ^a	37 (13-63)	33 (17-58)	20 (12-22)	37 (12-62)
Age at Diagnosis ^a	26 (6-49)	16 (7-45)	1 (1-5)	-
Age at first Symptom ^a	5 (0.5-42)	11 (0.4-38)	0.5 (0.5-0.83)	-
Age at last follow up ^a	39 (15-60)	32 (12-56)	18 (10-21)	-
Delay in the Diagnosis ^a	10 (1-44)	5 (3 -12)	0.5 (0.5-4.5)	-
IgG ^b	231.5 (0-823)	612 (0-741)	-	-
IgA ^b	18.7 (12-129)	39.5 (2-394)	-	-
IgM ^b	27.3 (12-81.1)	92.5 (6-351)	-	-

^aMedian ((min- max) in years, ^bMedian ((min- max) of the immunoglobulin levels at diagnosis (mg/dl).

Table II. Clinical parameters of CVID patients included in this study.

Clinical Features	# CVID Patients (%)	
	smB-	smB+
Pneumonia	11 (73.3)	5 (71.4)
Sinusitis	9 (60)	2 (28.6)
Otitis	8 (53.3)	2 (28.6)
Tonsillopharyngitis	5 (33.3)	2 (28.6)
Skin and soft tissue infections	5 (33.3)	3 (42.9)
Urinary Tract Infections	0	2 (28.6)
Gastroenteritis	5 (33.3)	2 (28.6)
Bronchiectasis	3 (20)	2 (28.6)
Autoimmunity	4 (26.6)	2 (28.6)

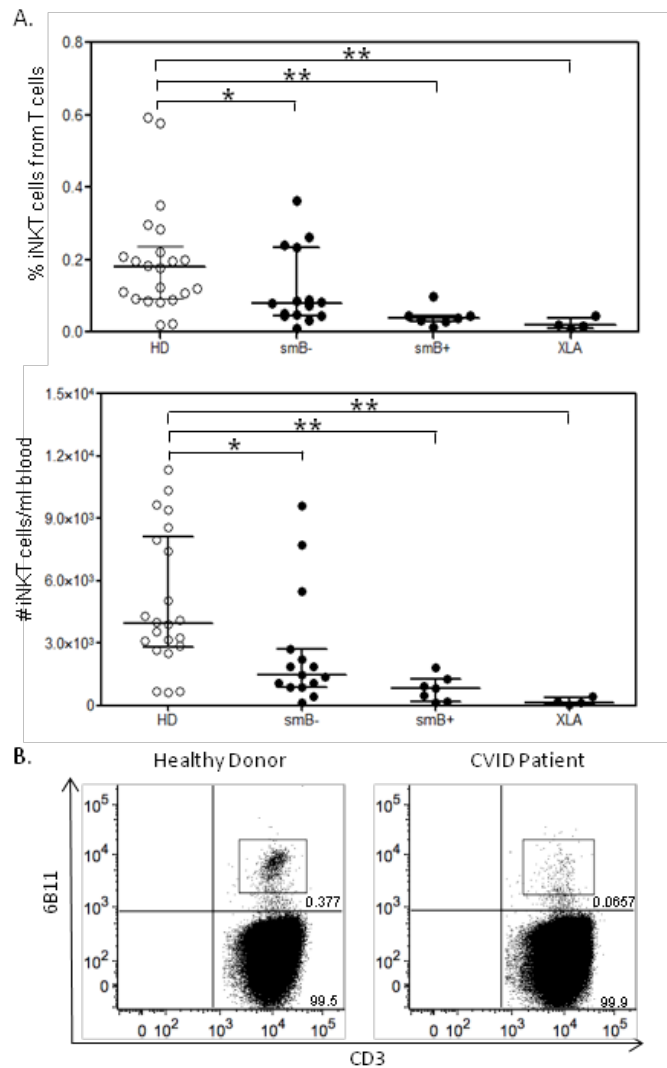


Figure 1. iNKT cells in PB from CVID and XLA patients. PB from the individuals included in this study was collected and stained with anti-CD3 and -iTCR (clone 6B11) and then, analyzed by flow cytometry (HD, n=22; CVID patients smB-, n=15, smB+, n=7 and XLA patients, n=4). (A) The frequency and absolute numbers of PB iNKT cells from all the study groups are shown. Open and filled circles represent data from HD and patients, respectively. (B) Representative example for the iNKT cell percentages in a smB+ CVID patient and its age and sex-matched HD. Small squares inside the right upper quadrant enclose iNKT cells and percentages are indicated below. P-values were calculated using two-way analysis of variance together with the Duns test for multiple comparisons was used to establish differences between three or more groups * P < 0.05; ** P < 0.001.

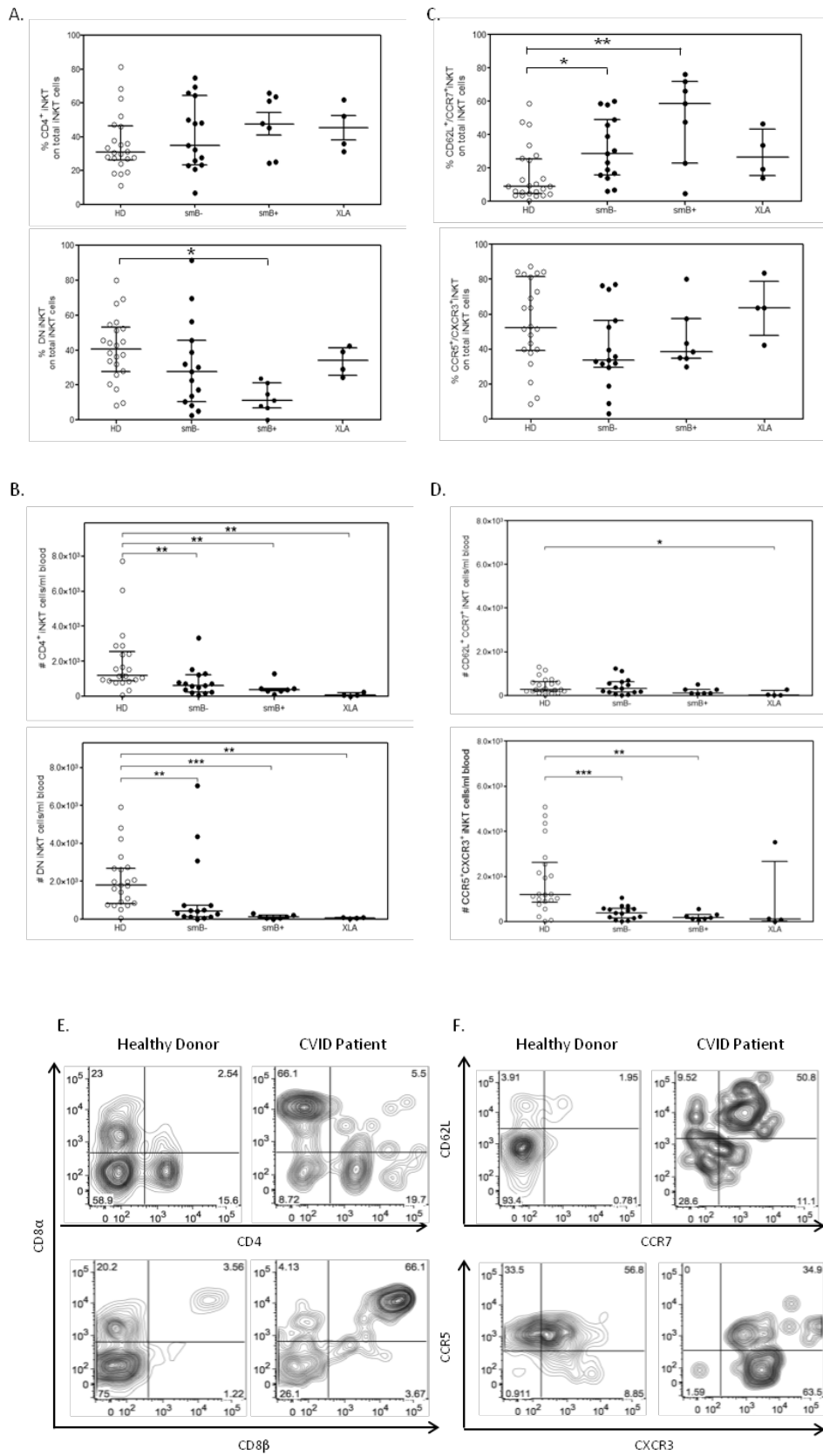


Figure 2. iNKT cells subpopulations in PB from CVID and XLA patients.

PB iNKT cell subpopulations were further identified using different monoclonal antibodies and subsequently analyzed by flow cytometry (HD, n=22; CVID patients smB-, n=15, smB+, n=7 and XLA patients, n=4). (A and B) Frequencies and absolute numbers from either CD4⁺ and DN or (C and D) CD62L⁺/CCR7⁺ CCR5⁺/CXCR3⁺ iNKT in PB from all the study groups. Open/filled circles represent data from HD and patients, respectively. (E) Representative plots for the percentages of the CD4⁺, DN, DP, CD8 α / β ⁺ and (F), CD62L⁺/CCR7⁺ or CCR5⁺/CXCR3⁺ iNKT cells in PB from a smB+ CVID patient in comparison to its age and sex-matched HD. P-values were calculated using two-way analysis of variance together with the Duns test for multiple comparisons was used to establish differences between three or more groups. * P < 0.05; ** P < 0.001; *** P < 0.0001.

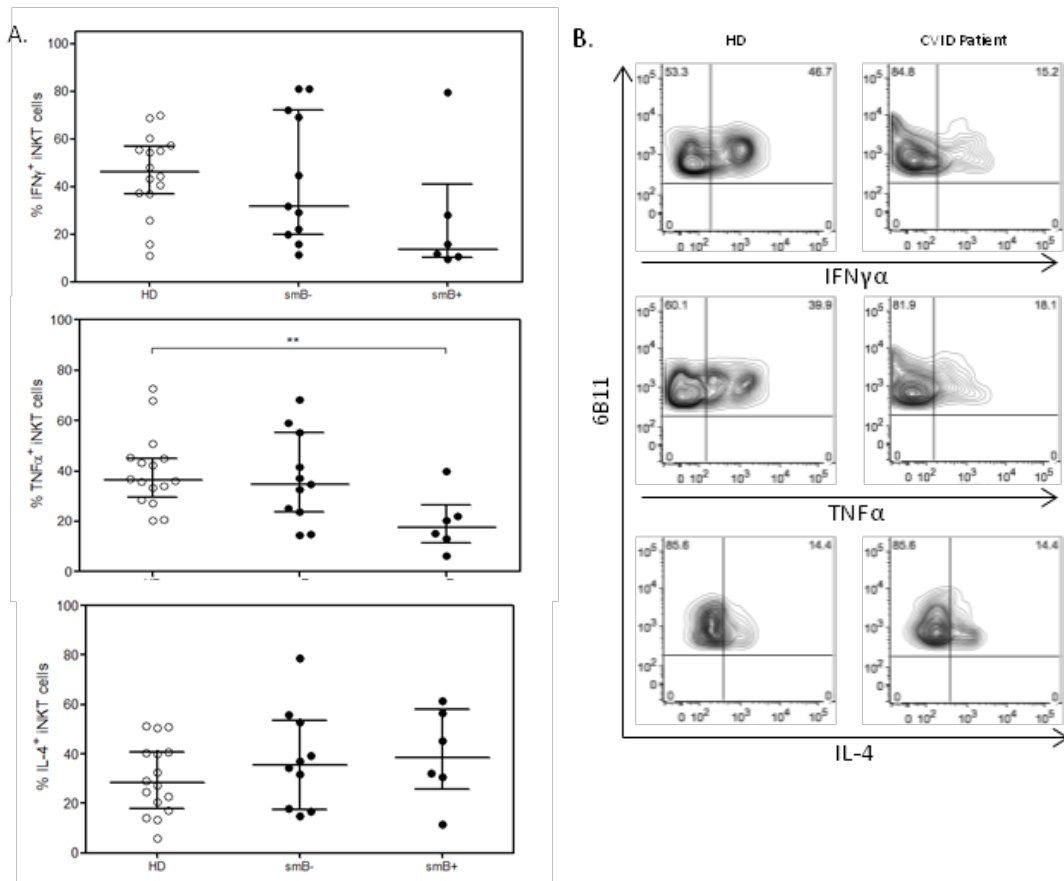


Figure 3. Intracellular cytokine production in iNKT cells from CVID patients PBMC.

PBMC from HD and CVID patients were stimulated w/o PMA/Ionomycin and subsequent stained extracellularly to detect surface CD3 and iTCR. Intracellular detection of IFN- γ , TNF- α and IL-4 was also performed. (HD, n=17; CVID patients, smB-, n=11 and smB+, n=6). (A) Cumulative percentages of cytokine-producing iNKT cells from PBMC in all the study groups. (B) Representative plots of the IFN- γ -, TNF- α - or IL-4-producing iNKT cells in PBMC from smB+ CVID patients and its age and sex-matched HD. Open and filled circles represent data from HD and patients, respectively. P-values were calculated using either Mann Whitney test or Student's t test. **, P < 0.001.

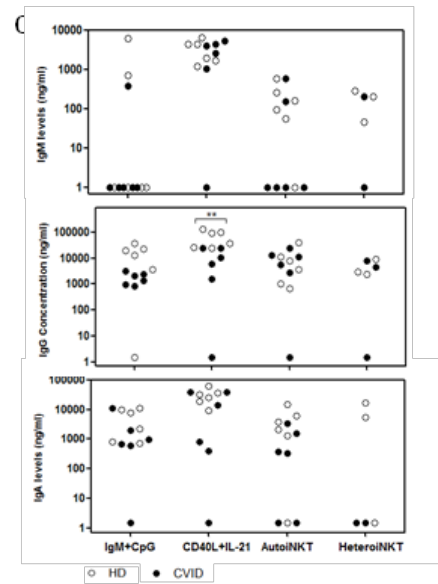
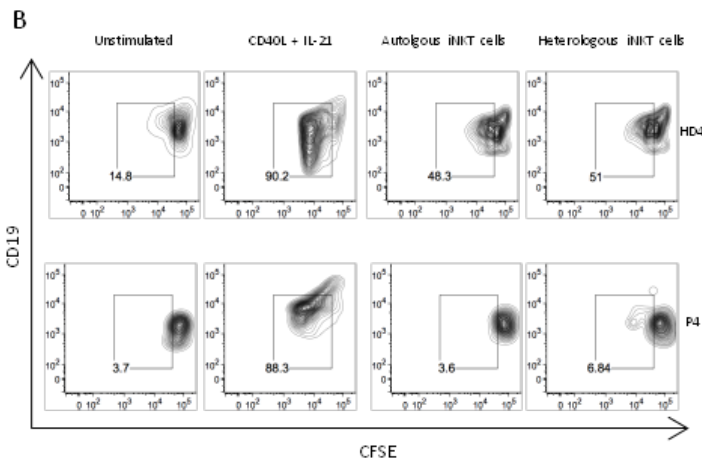
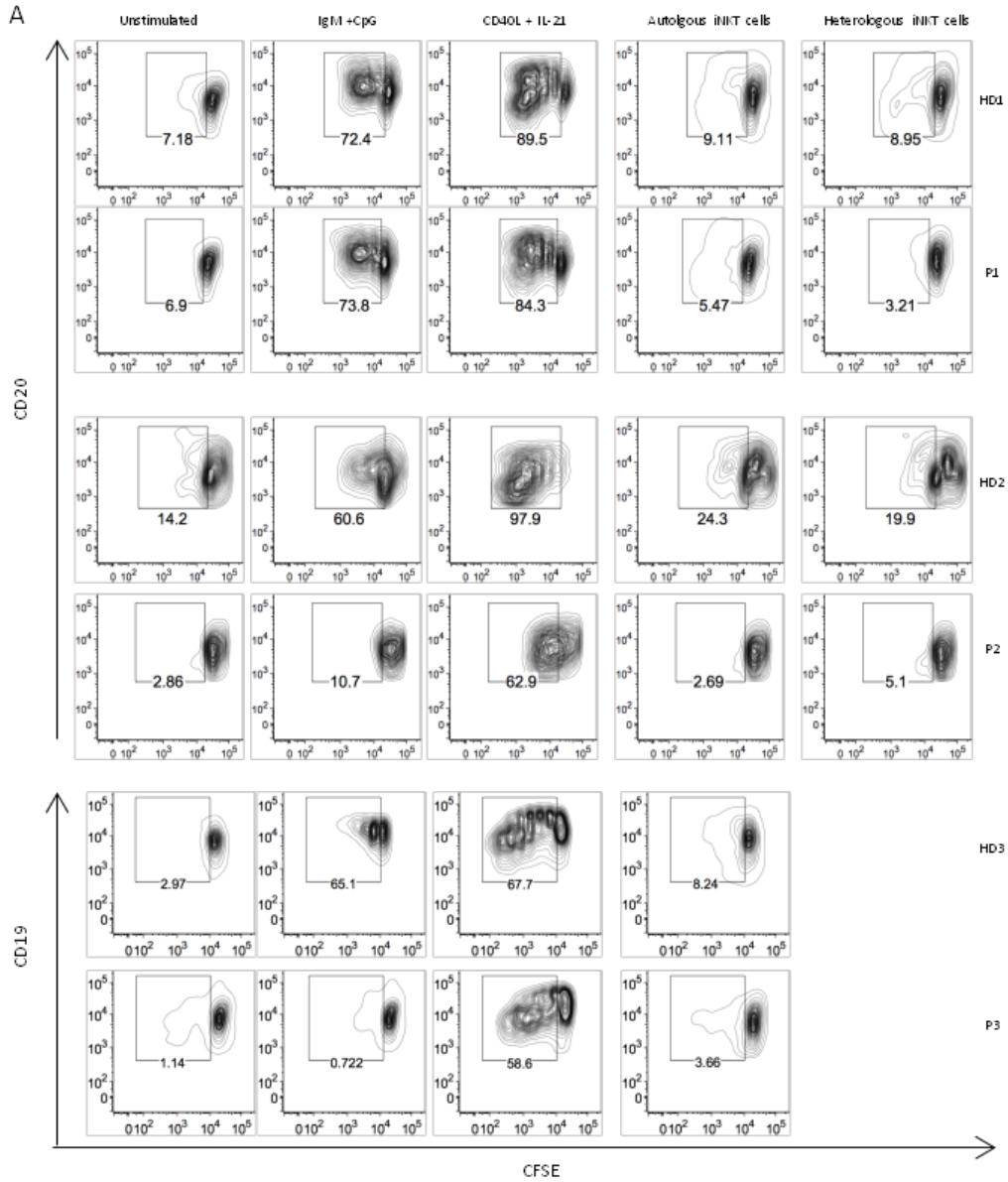


Figure 4. *In vitro* iNKT:B cell cognate help in CVID.

Purified B cells from CVID patients and HD were cultured either w/o anti-IgM+CpG, CD40L trimers+IL-21 and autologous or heterologous CD4⁺ iNKT cells using the CFSE dilution assay. Thereafter, cells were stained with either anti-CD20 or anti-CD19 and proliferation was evaluated by flow cytometry. The Ig secretion in the culture supernatants was measured by ELISA. (A) Representative B cell proliferation plots after the different stimuli in polyclonal iNKT:B cell co-cultures. (In autologous co-cultures, HD, n=11; CVID patients smB⁻, n=8 and smB⁺, n=3), (In heterologous co-cultures, HD, n=8; CVID patients, smB⁻, n=6 and smB⁺, n=2). P1 and P2 belong to the smB⁻ CVID group whereas P3 is a smB⁺ CVID patient. Every age and sex-matched HD is also shown above every set of plots. (B) A representative example of these co-cultures using monoclonal iNKT cells from a smB⁺ CVID patient (P4). The percentages of proliferating CD20⁺ or CD19⁺ B cells are enclosed in squares and the proliferation percentage indicated below. (C) Ig secretion in all the co-culture supernatants after *in vitro*-B cell stimulation. (HD, n=6; CVID patients, n= 6 and HD, n=3; CVID patients, n=2, for autologous and heterologous co-cultures, respectively). P-values were calculated using regular two-way ANOVA. **, P < 0.001.

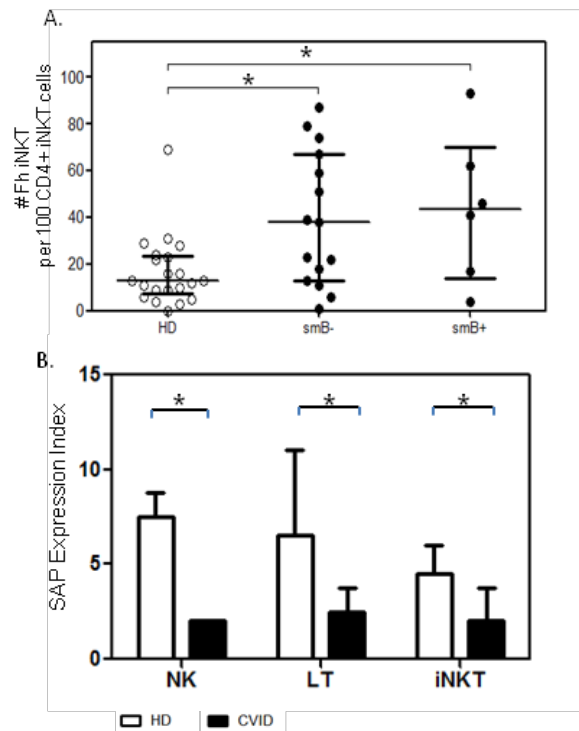


Figure 5. PB iNKT_{fh} cells and lymphocyte intracellular SAP expression in CVID.

PB from HD and CVID were stained with anti-CD3, anti-iTCR (clone 6B11), anti-CD4 anti-CD45RO and anti-CXCR5 and analyzed by flow cytometry (HD, n=21; CVID patients, smB-, n=15 and smB+, n=6). Additionally, PBMC were stained to detect intracellular SAP molecule in CD56⁺CD16⁺, CD3⁺ and iTCR⁺ cells. (HD, n=10; CVID patients, n=8).(A) Cumulative percentages of PB iNKT_{fh} cells in all study groups. (B)Cumulative data of the SAP expression index in NK, T and iNKT in our study groups. Open and filled circles and bars represent data from HD and patients, respectively. P-values were calculated using Student's t test. *, P < 0.05.

9. DISCUSIÓN GENERAL

Las IDPs constituyen un grupo heterogéneo de desórdenes causados por alteraciones genéticas que tienen como consecuencia, anomalías en el desarrollo y función del sistema inmune. Los pacientes que presentan IDPs tienen una predisposición a las infecciones recurrentes con características especiales como la severidad, complicaciones, múltiples focos de infección, resistencia al tratamiento y microorganismos causales inusuales y pueden variar desde infecciones leves hasta aquellas que ponen en riesgo la vida de la persona. Adicionalmente, estos pacientes presentan susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes, linfoproliferación y malignidades. (77). Hasta el momento, más de 220 IDPs han sido descritas en la literatura (78), y se consideran como enfermedades de baja prevalencia, sin embargo, esta afirmación es cuestionable ya que se ha establecido que las IDPs son ampliamente subdiagnosticadas (79). Dentro de las IDPs más frecuentes, la ICV es el desorden de mayor frecuencia, sin embargo, aunque fue reportada hace más de 60 años (80), aún no existe claridad sobre su patogénesis. Los pacientes con ICV presentan características clínicas muy heterogéneas entre las cuáles se han definido las infecciones de tracto respiratorio e intestinal, como las más comunes. Esta diversidad en la presentación de la enfermedad, sugiere que la ICV no es solo una enfermedad, sino un conjunto de enfermedades asociadas (81). Se han descrito diferentes genes afectados en ICV que confieren un fenotipo inmune similar pero a su vez muy heterogéneo, entre lo que se incluye: bajos títulos séricos de IgG e IgM o IgA, escasa respuesta a la vacunación, especialmente a antígenos polisacáridos, y un déficit en la maduración y función de las subpoblaciones de LB, especialmente,

de los LB de memoria CD27⁺(82). Sin embargo, no solo se han reportado alteraciones en los compartimentos de LB, trabajos previos han descrito alteraciones numéricas, migratorias y funcionales en los LNKTi de pacientes con ICV (83 80); no obstante, el mecanismo de esta desregulación no ha sido dilucidado. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue la caracterización y evaluación funcional de los LNKTi de SP en estos pacientes y principalmente, la capacidad de estas células de proveer ayuda de contacto directo a los LB de pacientes con ICV.

Como una primera aproximación, establecimos un panel de tinción celular, para evaluar por citometría de flujo la frecuencia y distribución de los LNKTi periféricos totales y sus subpoblaciones en pacientes con ICV. Inicialmente, se identificaron los LNKTi con anticuerpos anti-CD3 anti-TCR invariante (TCRi), basados en el hecho de que este anticuerpo reconoce la unión entre las regiones V α 24-J α 18 del TCRi. Como primer resultado, confirmamos la reducción en el número y la frecuencia de los LNKTi en SP de pacientes con ICV, y de una manera más detallada, la tinción con anti-CD4, -CD8 α y -CD8 β nos permitió observar, la reducción en el número de los LNKTi CD4⁺ y una profunda reducción en el porcentaje y número absoluto de la subpoblación DN acompañada de un aumento en el porcentaje estos linfocitos CD8 α ⁺ y CD8 α/β ⁺. Este incremento puede entenderse como un efecto compensatorio a la ausencia de los LNKTi DN. En contraste, Carvalho K. y colaboradores, reportaron un incremento en el porcentaje de LNKT CD4⁺ en conjunto con una disminución de aquellos linfocitos CD8 α ⁺(74). Estas discrepancias entre resultados, pueden ser atribuidas a las distintas aproximaciones metodológicas con el grupo de Carvalho K, como la utilización de CMSP criopreservadas y un análisis de subpoblaciones de LNKTi que sólo tiene

en cuenta la subpoblación CD8 α ⁺ como el total de LNKTi CD4⁺, sin tener en cuenta aquellos CD8 α / β ⁺ y DN (74).

A partir de estos hallazgos, se postula que los LNKTi DN, reportadas como células Th1 (84), pueden migrar y actuar como células efectoras en tejidos periféricos para el control de infecciones recurrentes de los pacientes con ICV, con su consiguiente disminución en SP.

Con la finalidad de identificar si el defecto numérico se origina por el comportamiento migratorio de los LNKTi en SP de los pacientes con ICV, evaluamos su expresión de receptores de migración a tejido linfóide y a tejido inflamado como CD62L⁺/CCR7⁺ y CCR5⁺/CXCR3⁺ respectivamente. En el contexto de ICV, se observó un alto porcentaje de LNKTi con un fenotipo definido como de memoria, CD62L⁺/CCR7⁺(85) acompañado de una reducción significativa en SP del número absoluto de los LNKTi denominados efectoras, CCR5⁺/CXCR3⁺(86), resultados opuestos al comportamiento migratorio en periferia reportado para los LNKTi de DS (87) y observado también en nuestros individuos control, como la expresión preferencial de receptores de quemoquinas involucradas en el proceso de inflamación. Previamente, se ha reportado que en SP de los pacientes con ICV, hay un mayor porcentaje de LNKTi CCR5⁺/CD69⁺(74), sin embargo, el análisis de la expresión conjunta de CCR5⁺/CXCR3⁺ proporciona una visión más precisa de su función (88). Adicionalmente, la expresión de CD69 en los LNKTi en estado basal, se ha relacionado con un estado de maduración de estos linfocitos más que de activación (89). Estos resultados, apoyan la hipótesis del reclutamiento de los LNKTi DN en tejidos inflamados, pues en conjunto con el bajo número de células efectoras en la circulación, puede ser propuesto como la salida de estas células de SP para controlar las infecciones recurrentes que presentan los pacientes con ICV. Esta caracterización también se realizó para los pacientes con XLA como

control dentro de las enfermedades con deficiencias de anticuerpos. Los resultados de la distribución celular de los LNKTi en estos pacientes en comparación con los obtenidos para ICV, demuestran que para XLA, esta deficiencia celular es un defecto en la ontogenia de los LNKTi, pues la reducción en el número de células es global y no difiere entre subpoblaciones, por lo tanto es menos probable que sea un efecto periférico.

Por otra parte, se buscó establecer la función celular de los LNKTi después de una estimulación inespecífica de CMSP con PMA/ionomicina. Por citometría de flujo detectamos una mayor expresión de CD40L en los LNKTi en estado basal, pero con una expresión normal de CD69. Después del estímulo, se observó una disminución en la frecuencia de los LNKTi productores de IFN- γ y TNF- α entre las CMSP de los pacientes con ICV. Se ha encontrado que la capacidad de los LNKTi de secretar IFN- γ en grandes cantidades, no solo es importante en la citotoxicidad celular, si no también es importante en la ayuda de contacto LNKTi:LB. Cuando los LNKTi se localizan en el borde T:B dentro de los CG, la secreción de IFN- γ ayuda a la inducción de cambio de isotipo. La ausencia de IFN- γ , lleva a la ausencia de la producción de IgG2 e IgG3(90). Otro trabajo, también evalúa la producción de citoquinas por la técnica de ELISPOT en cultivos de CMSP enriquecidos en LNKTi después de su exposición a α GalCer, y se observa una tendencia al incremento en la producción de IFN- γ (80). Estas diferencias pueden ser producto de diferentes aproximaciones metodológicas pero también debido a la presencia de otras células productoras de IFN- γ como las células T y NK que podrían ser detectadas por ELISPOT. En nuestro trabajo, la producción de IFN- γ fue evaluada intracelularmente y específicamente en LNKTi, sin embargo, dada la variabilidad de los resultados, es necesario incluir un mayor número de pacientes para este análisis.

Por otra parte, el ambiente inflamatorio podría inducir un perfil de activación mayor en los LNKTi de pacientes con ICV en cómo se evidencia por el aumento de la expresión de CD40L en su estado basal, aunque desde otro punto de vista, la expresión de CD40L se da principalmente en los LT con un fenotipo de memoria (91), lo que podría reflejar una acumulación de los LNKTi de memoria CD40⁺ en las CMSP de los pacientes con ICV. De manera interesante, el aumento en los LT CD40^{high} en SP se relaciona con un pronóstico desfavorable en los pacientes de RA y además, favorecen la producción de autoanticuerpos en LB derivados de pacientes con SLE (92). Entonces, este hallazgo podría relacionarse con la progresión de ICV o con la susceptibilidad de estos pacientes a desarrollar manifestaciones autoinmunes. Por otra parte, el bajo número de los LNKTi productores de IFN- γ es congruente con la ausencia de estas células iNKT DN pro-inflamatorias.

Estos resultados se observaron en todos los pacientes con ICV pero con un mayor énfasis en aquellos pacientes con > 2% de los LB con cambio de isotipo, lo que sugiere un vínculo entre los niveles bajos de células iNKT y la distribución en PB de las diferentes subpoblaciones de LB.

Como un aspecto importante, se evaluó si la capacidad de los LNKTi de establecer ayuda directa los LB. A partir de LB y iNKT purificados se establecieron co-cultivos de LNKTi:LB en presencia o ausencia de α GalCer, en comparación con los estímulos convencionales para los LB, anti-IgM+CpG o un trímero de CD40L+IL-21. Acorde con hallazgos de diferentes investigadores (93), se encontró que en nuestra cohorte de pacientes, la respuesta al estímulo con IgM+CpG está disminuida en ICV, lo que respalda la metodología empleada para evaluar la proliferación de los LB. Es importante resaltar, que los LB de los pacientes con ICV no fueron capaces de proliferar después de la estimulación con LNKTi CD4⁺ autólogos pulsados con α GalCer, y que este defecto no fue recuperable con la

presencia de LNKTi CD4⁺+ α GalCer provenientes de DS. Sin embargo, los LB de DS proliferaron en presencia de LNKTi CD4⁺pulsados con α GalCer tanto autólogos como heterólogos. De esta manera, es posible establecer que los LNKTi de los pacientes con ICV conservan su capacidad de establecer una ayuda de contacto con los LB, sin embargo, se evidencia el defecto en los LB para responder ante el estímulo de los LNKTi, aun cuando los LNKTi_{fh} se encontraron enriquecidos en SP de los pacientes con ICV. De manera interesante, al evaluar la producción de Ig en los co-cultivos autólogos y heterólogos de los pacientes, se observó que la producción de Igs no está afectada en ICV. Detre y colaboradores, demostraron que la inmunización con un glicolípido haptenado (NP- α GalCer), induce bajos niveles de IgM e IgG específicas para NP en ratones con una deficiencia inducible de SAP, incluso en la ausencia total de CG (72). A pesar que las interacciones moleculares entre LT deficientes en SAP y los LB se dan de manera adecuada, el tiempo de interacción celular se disminuye profundamente, eventos que se correlacionan con la desregulación de la expansión clonal de los LB. Adicionalmente, el reclutamiento de los LT en los CG también se ve afectado, generando la salida constante de los LT_{fh} de los folículos del bazo (60). Estos hallazgos sugieren que la deficiencia en SAP, induce una falla en la interacción de larga duración entre LT:LB que se traduce en una deficiencia en la expansión de los LB y en la formación de CG. En relación con estas observaciones, nuestros resultados muestran una reducción a nivel intracelular de la proteína SAP en los linfocitos de los pacientes con ICV, argumento que nos permite proponer, que la deficiencia en la ayuda de contacto LNKTi:LB es consecuencia del reducido tiempo de contacto celular que no permite la inducción de la proliferación en los LB pero si permite una respuesta primaria de anticuerpos y una acumulación de LNKTi_{fh} en SP de los pacientes con ICV.

SAP es una proteína adaptadora intracelular que se expresa predominantemente en las células T y NK cuya ausencia da lugar a la activación defectuosa y la defectos en la citotoxicidad en células T y NK (101). La molécula SAP también juega un papel importante en la ontogenia de células iNKT y se requiere su expresión para la función de los LNKTi citotóxicos (94, 95). Este hallazgo además puede estar relacionado con la disminución de los LNKTi e incluso más importante, podría estar asociado con una respuesta citotóxica deteriorada en las células NK T y LNKTi a infecciones recurrentes en el contexto de las manifestaciones clínicas de la ICV.

En general, nuestros resultados demuestran que existe una disminución específica en los LNKTi DN y en menor instancia en aquellos CD4⁺ en SP de los pacientes con ICV y estos eventos son concomitantes con el bajo número de aquellos linfocitos doble positivos para CCR5 and CXCR3. Además, los LNKTi expresan altos niveles de CD40L, lo cual sugiere un fenotipo de memoria y que se encuentran enriquecidos en CMSP de los pacientes con ICV. También, mostramos evidencia convincente de que la ayuda directa LNKTi:LB se encuentra afectada en ICV, un hallazgo que puede estar relacionado con la baja expresión intracelular de la molécula SAP en los linfocitos de estos pacientes. Estudios adicionales son necesarios para dilucidar los mecanismos responsables de esta disminución de SAP. A partir de este conocimiento se pueden proponer terapias alternativas al tratamiento con GGHIV para restaurar la disfunción de los LB en ICV, como la terapia génica para recuperar la expresión de SAP.

Fenotipo y función de los LNKTi en el contexto de ICV

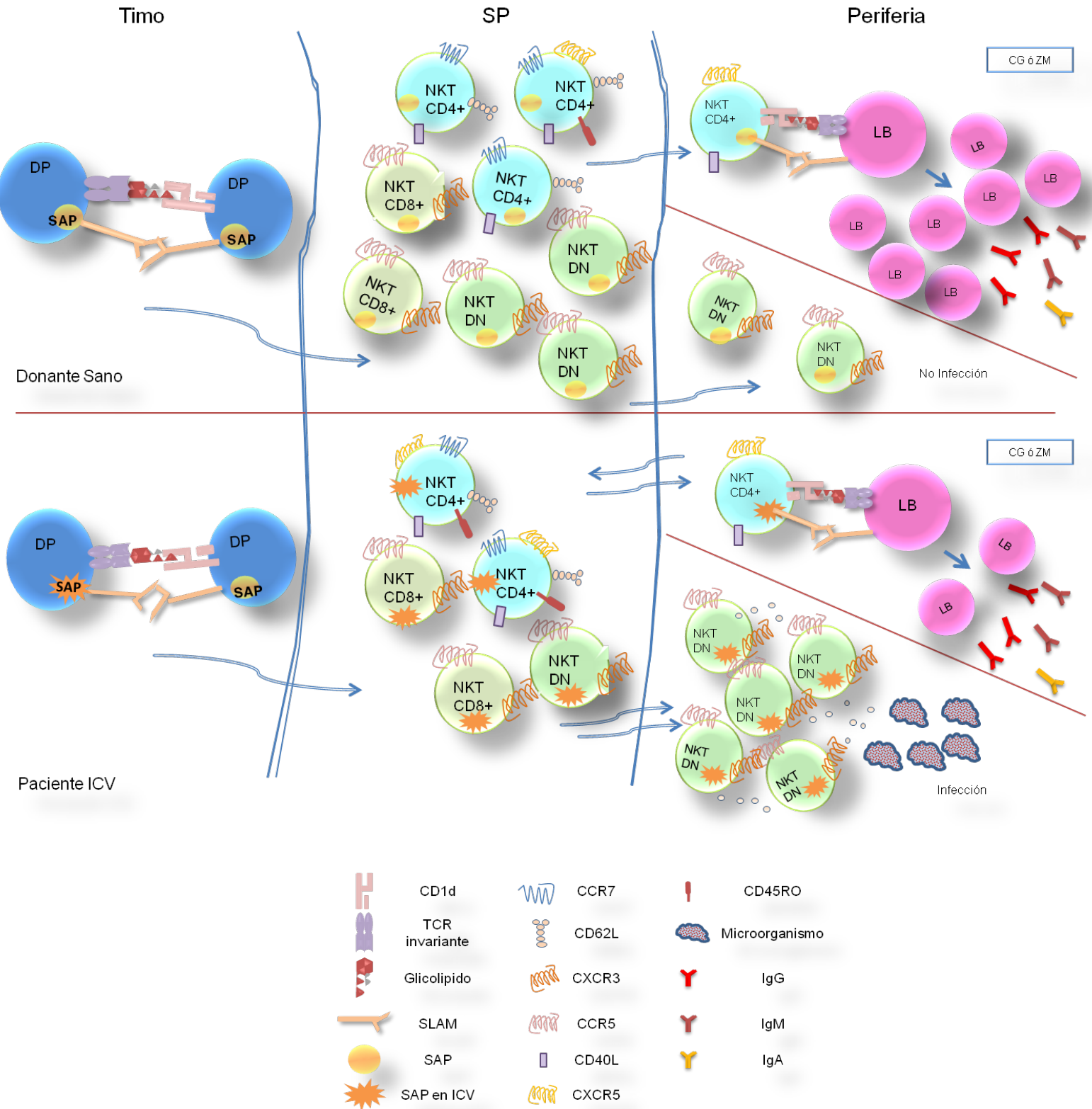


Figura 6. Defectos en el fenotipo y función de los LNKTi en los pacientes con ICV. Convencionalmente, en los donantes sanos (DS) (Panel superior) la selección tímica de LNKTi es regulada por la interacción homotípica de las moléculas SLAM junto con aquella del TCRi con un glicolípido específico presentado por CD1d en los timocitos DP, activando la señalización por medio de SAP intracelular, para la diferenciación, proliferación y salida de los LNKTi a SP. Ya en SP, las subpoblaciones de los LNKTi se distribuyen en una proporción CD4⁻>CD4⁺ y adicionalmente, expresan en su mayoría marcadores de migración a tejido inflamado. En este tránsito, los LNKTi llegan hasta los tejidos periféricos para cumplir sus funciones. Los LNKTi CD4⁺ pueden viajar a los CG o a la ZM del bazo en donde establecen la ayuda de contacto a los LB. Esta interacción LNKTi:LB genera una respuesta proliferativa y de producción de Igs en los LB. Sin embargo, nuestros resultados demostraron (Panel inferior) que existen alteraciones en la distribución de las subpoblaciones de LNKTi en SP y en su función de ayuda de contacto a los LB en los pacientes con ICV, eventos relacionados con la disminución en la expresión de SAP intracelular en los linfocitos de estos pacientes. Esta alteración en la molécula SAP puede originar defectos en la selección tímica de los LNKTi, disminuyendo su número en SP. Ya en periferia, las infecciones frecuentes de los pacientes con ICV, generan una acumulación de LNKTi DN en los tejidos inflamados que probablemente son los linfocitos que expresan los marcadores de migración CCR5/CXCR3 y por lo tanto se observan disminuidos en SP. Por su parte los LNKTi CD4⁺, posiblemente aquellos con un fenotipo ayudador folicular, migran a los CG o a la ZM del bazo. En estos sitios, la deficiencia de SAP intracelular, disminuye el tiempo de interacción celular alterando la ayuda de contacto entre los LNKTi:LB lo que se refleja en una mínima proliferación del LB pero una adecuada producción de anticuerpos. Adicionalmente, la brevedad del contacto LNKTi:LB genera la salida

constante de los LNKTifh, lo que está relacionado con la acumulación de LNKTi
CD40L^{high} en SP.

10. PRINCIPALES APORTES DE LA INVESTIGACION

Con este trabajo investigación se contribuye al conocimiento de los defectos inmunológicos en la ICV centrándose en las deficiencias numéricas y funcionales de los LNKTi así como también, en los defectos en la ayuda de contacto entre LNKTi:LB y la respuesta proliferativa de estos últimos, en concomitancia con la identificación de la expresión deficiente de la molécula SAP. Estos resultados pueden aportar a la caracterización de los pacientes con ICV.

Parte de los productos de esta investigación incluyen:

1. Revisión de tema: **Erazo-Borrás LV, et al. Linfocitos NKT invariantes: ontogenia, fenotipo y función. Immunologic. 2014.**

2. Articular original: **“Impaired invariant NKT:B cell help and decrease SAP expression in blood lymphocytes from patients with Common Variable Immunodeficiency”** Sometido a Journal of Innate Immunology

3. **POSTER: Caracterización de los linfocitos NKT invariantes en sangre periférica de pacientes con inmunodeficiencia común variable.**

IX Congreso Colombiano de Alergia, Asma e Inmunología. Clínica e Investigación:

Un arte en Medicina. Mayo 2-4 de 2013, Bogotá, Colombia.

Premiado con el Primer lugar en modalidad poster.

4. **POSTER: Characterization of invariant NKT cells in peripheral blood of patients with common variable immunodeficiency.**

III Congress Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID), October 17-

19 of 2013, Santiago de Chile, Chile.

5. POSTER: Characterization of invariant NKT cells in peripheral blood of patients with common variable immunodeficiency.

16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, October 29- November 1, Prague, Czech Republic.

6. Pasantía en el **Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico. San Raffaele Scientific Institute. Milano, Italy.** Con la supervisión de Claudia De Liala MSci, Ph.D en la Unidad de Inmunología Experimental dirigida por Paolo Dellabona, M.D, Ph.D.