

## Papel de las células NKT invariantes en la respuesta inmune anti-viral

ALEJANDRO ROMÁN<sup>1</sup>, MARÍA TERESA RUGELES, BACT., D.SCI.<sup>2</sup>,  
CARLOS JULIO MONTOYA, M.D., D.SCI.<sup>3</sup>

### RESUMEN

Las células T asesinas naturales con receptor de células T invariante y restringidas por la molécula CD1d (iNKT) son un subgrupo de linfocitos con potente actividad inmunorreguladora; su respuesta casi inmediata y la capacidad de producir citoquinas tanto Th1 como Th2 son factores determinantes en el desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa. El papel fisiológico de las células iNKT se ha documentado ampliamente en la respuesta anti-tumoral, el desarrollo de la tolerancia en los órganos inmunoprivilegiados y el control de las reacciones autoinmunes. A pesar de la demostrada potencia inmunomoduladora de las células iNKT, hasta el momento se conoce poco de su acción en la respuesta inmune anti-infecciosa, en particular en el ser humano y contra los virus patógenos. Este artículo sintetiza los resultados de una búsqueda en las principales bases de datos biomédicas (Pubmed, Medline y OVID), e incluye los estudios realizados para caracterizar estas células y evaluar su papel en la interacción del hospedero con los virus. Las células iNKT participan en la respuesta inmune antiviral, aunque de una manera diferente según el tipo de virus; incluso, podrían estar comprometidas en los daños mediados por mecanismos inmunes. En el ser humano, las células iNKT son aparentemente esenciales en la respuesta inmune contra el virus Varicela Zoster, mientras que todavía hay controversia sobre su función en el control de otros virus. Los modelos animales han aportado las primeras evidencias sobre el potencial de la manipulación terapéutica específica de este subgrupo de linfocitos.

*Palabras clave:* Células iNKT; Infección viral; VIH; Alfa-Galactosilceramida.

### *Role of invariant NKT cells in the anti-viral immune response*

### SUMMARY

Natural killer T cells with an invariant T-cell receptor and restricted by CD1d (iNKT) are a subgroup of lymphocytes with a very strong immunoregulatory potential; their quick response and their ability to produce Th1 and Th2 cytokines are determinant factors that influence the development of innate and adaptive immune responses. The physiological role of iNKT cells has been well documented in anti-tumor immune responses, the development of tolerance in immune-privileged organs and the control of autoimmune diseases. Despite the fact that the immunoregulatory potential of these cells has been well documented, less is known regarding their role in the immune response against infectious agents, in particular to human pathogenic viruses. This paper synthesizes the search in the most important biomedical data bases (Pubmed, Medline, OVID), including studies on the phenotypic characterization of these cells and functional studies that evaluated their role in the interaction between hosts and viruses. iNKT cells have a heterogeneous participation during the anti-viral immune responses, depending on the type of virus; indeed, in some instances the iNKT-cell responses can be involved in the tissue damage associated to the anti-viral responses. In humans, iNKT cells are apparently essential for an effective immune response against Varicella Zoster virus, while it is still controversial their role in the control of other viral infections. Studies in animal models have shown the first evidences on the therapeutic potential of this lymphocyte subpopulation.

*Key words:* iNKT cells; viral infection; HIV; Alpha-GalactosylCeramide

1. Estudiante Décimo semestre de Medicina, Joven Investigador Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Corporación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. e-mail: alejoroman@gmail.com
  2. Coordinadora Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Corporación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. e-mail: mtrugel@udea.edu.co
  3. Profesor Asociado, Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Corporación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. e-mail: cjmonto@epm.net.co
- Recibido para publicación abril 2, 2005    Aceptado para publicación marzo 15, 2006

Por definición, los linfocitos T incluyen todas las células que expresan en la superficie un receptor antigénico (TCR) asociado con las moléculas del complejo CD3. Estos linfocitos son muy heterogéneos en la especificidad del reconocimiento antigénico, la expresión de marcadores fenotípicos y la respuesta funcional. No obstante, entre las células T se encuentra una subpoblación particular caracterizada por expresar moléculas clásicamente asociadas con el fenotipo de las células asesinas naturales (NK), lo que llevó a denominarlas «células T asesinas naturales» o «células NKT». Esta subpoblación de linfocitos<sup>1</sup> se describió en 1987 en ratones C57BL6, de acuerdo con la coexpresión del TCR y la molécula NK1.1 (conocida actualmente como CD161).

Investigaciones posteriores realizadas en otras cepas de ratones y en seres humanos determinaron que la expresión de CD161, así como de otros marcadores de las células NK, era muy variable entre los linfocitos T y poco útil a la hora de definir las células NKT<sup>2</sup>; sin embargo, estos estudios también permitieron establecer que el subgrupo más importante de las células NKT reconocía antígenos de naturaleza glicolipídica en una presentación restringida por la molécula CD1d, glicoproteína no polimórfica similar a las moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este subgrupo de células

NKT se conoce desde entonces como “células T restringidas por CD1d”, y la mayoría de ellas se caracteriza por un TCR conformado por una cadena alfa que tiene siempre el mismo rearrreglo V $\alpha$ J $\alpha$  (V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 en ratones y V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 en los humanos); con base en esta estructura constante se les ha dado el nombre de “células T invariantes restringidas por CD1d” o simplemente “células NKT invariantes” (iNKT)<sup>2,3</sup>.

Las células iNKT tienen características particulares que permiten diferenciarlas de los linfocitos T clásicos y de las células NK, y que resaltan su importancia desde el punto de vista evolutivo e inmunológico (Cuadro 1). Como ya se mencionó, el TCR de las células iNKT es altamente conservado, con una cadena alfa invariante cuya región hipervariable tiene una secuencia de aminoácidos muy constante en el sitio de unión a los epítopes antigénicos (región determinante de la complementariedad o asa CDR3); esta cadena alfa invariante se aparea con un grupo restringido de cadenas beta, en el hombre casi de manera exclusiva con la cadena V $\beta$ 11 y en el ratón con las cadenas V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 2 y V $\beta$ 7. Lo anterior lleva a que las células iNKT expresen un TCR altamente homólogo con una variación estructural significativa sólo en el asa CDR3 de la cadena beta<sup>4</sup>.

De otro lado, aunque existen algunos linfocitos con un

**Cuadro 1**  
**Principales características de las células iNKT humanas**

Característica	Descripción	Comentario
<b>Frecuencia</b>	0.01% a 1% de los linfocitos de sangre periférica Menor de 1% de los linfocitos del hígado	Aparentemente es muy variable en los diferentes tejidos
<b>Repertorio del TCR</b>	Cadena $\alpha$ : V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 Cadena $\beta$ : V $\beta$ 11	Invariante Semi-invariante
<b>Elemento de restricción</b>	Molécula CD1d, no polimórfica	Del tipo de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad Ib (no clásicas)
<b>Antígenos cognados</b>	Glicolípidos exógenos Glicolípidos endógenos Pared de micobacterias	$\alpha$ -Galactosil-ceramida Isoglobotrihexosilceramida Manósido de fosfatidilinositol
<b>Subgrupos</b>	CD4+/CD8- CD8+/CD4- CD4-/CD8-	Secreción de citoquinas Th1 y Th2 Secreción de citoquinas Th1 Secreción de citoquinas Th1
<b>Receptores de quimoquinas</b>	CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 CXCR3, CXCR4, CXCR6	Fenotipo de memoria efectora y patrón de migración hacia tejidos inflamados y mucosas
<b>Producción de citoquinas</b>		
<b>IL-4</b>	Rápida, alta cantidad	Activación mediada por el TCR
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Rápida, alta cantidad	Activación mediada por el TCR
<b>Otras: GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, RANTES, TGF-<math>\beta</math>1, MIP1-<math>\alpha</math>, TNF-<math>\alpha</math></b>	++	Dependiente del subgrupo de células iNKT activado

TCR variable que están restringidos por la molécula CD1d, todas las células iNKT están restringidas por esta molécula. Hasta el momento se desconoce el ligando natural para CD1d y existe controversia acerca de su capacidad de presentación de glicolípidos derivados de microorganismos; sin embargo, recientemente se describió que el manósido de fosfatidilinositol, un compuesto de la pared de las micobacterias, es presentado por la molécula CD1d y estimula las células iNKT<sup>5</sup>. También se informó que esta molécula puede presentar esfingolípidos endógenos como el gangliósido GD3 y la isoglobotrihexosilceramida (iGb3, de origen lisosomal); en el modelo murino, mutaciones en los genes de las enzimas beta-hexosaminidasa A y B llevan a una deficiencia de iGb3, y alteran el desarrollo de las células iNKT<sup>6,7</sup>. La evaluación funcional *in vitro* e *in vivo* de las células iNKT ha sido posible gracias al descubrimiento del glicolípidos  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer), una glucosilceramida derivada de la esponja marina *Agelashphins mauritanus* y presentada por la molécula CD1d; aunque un homólogo de la  $\alpha$ -GalCer no se ha encontrado en los mamíferos ni en los microorganismos, el efecto que produce sobre las células iNKT, al administrarlo *in vivo*, ha hecho evidente el potencial terapéutico en enfermedades autoinmunes y oncológicas<sup>8,9</sup>.

Por último, la mayor importancia de las células iNKT radica en su potente acción inmunorreguladora debida a la liberación rápida y masiva de citoquinas tipo Th1 y Th2, especialmente el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y la interleuquina 4 (IL-4), luego de la activación a través de su TCR invariante<sup>10</sup>. Se ha demostrado que la activación de las células iNKT conduce a la estimulación de las células NK, monocitos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T ayudadores y citotóxicos, estableciendo un puente entre el desarrollo de las respuestas inmunes innata y adaptativa<sup>11</sup>. Las células iNKT se han segregado en tres subgrupos según la expresión de las moléculas CD4 y CD8 (CD4+, CD8+ y doblemente negativas). Con tetrámeros de CD1d cargados con  $\alpha$ -GalCer se logró definir que las células iNKT CD4+ producen tanto citoquinas Th1 como Th2, aunque son responsables de casi toda la secreción de citoquinas Th2, mientras que las células iNKT CD8+ y doblemente negativas producen selectivamente citoquinas Th1 y sintetizan perforina en respuesta al estímulo con IL-2 e IL-12<sup>12</sup>. Estos resultados indican que la actividad inmunorreguladora de las células iNKT, algunas veces contrastante, puede ser el resultado de la activación

selectiva de alguno de sus subgrupos; esta acción moduladora de las células iNKT se ha demostrado en el desarrollo de la respuesta inmune necesaria para el control de los tumores, las infecciones, las reacciones autoinmunes y el establecimiento de la tolerancia en los órganos inmuno-privilegiados<sup>11</sup>.

La frecuencia de las células iNKT en los diferentes tejidos es muy variable, y parece depender de su estado de activación. En los seres humanos, la frecuencia de las células iNKT en la sangre periférica es muy heterogénea (desde 0.01% a 1% de los linfocitos), y su fenotipo es claramente de células T de memoria efectoras (CD45RO+, CCR7-, CD62L<sup>bajo</sup>), lo que explica su capacidad de respuesta casi inmediata ante las señales de activación mediadas por el TCR. Sin embargo, en condiciones basales expresan pocos marcadores de activación en su superficie (CD25, CD38, CD69, CD95, CD154, HLA-DR) (Cuadro 2)<sup>13,14</sup>.

Este artículo sintetiza los resultados de una búsqueda en las principales bases de datos biomédicas (Pubmed, Medline y OVID) sobre la participación de las células iNKT en la respuesta inmune contra las principales infecciones virales, y resalta la importancia que podría tener el uso terapéutico de estas células en el control de las enfermedades más importantes de etiología viral.

## LAS CÉLULAS iNKT Y LA RESPUESTA ANTIVIRAL

La alta incidencia de las infecciones virales en la especie humana hace que la respuesta inmune que se genere contra el agente viral sea un determinante básico en el desenlace clínico; en esta respuesta, el sistema inmune innato cumple un papel primordial por ser la primera barrera biológica que enfrentan los microorganismos patógenos. De este sistema innato hacen parte células que controlan las células infectadas o directamente las partículas virales, como las células NK, células dendríticas plasmacitoides y los macrófagos, mientras que otras células tienen un papel fundamental en el control de la infección viral a través de la inducción de la respuesta inmune adaptativa de larga vida y con memoria inmunológica, como las células dendríticas mieloides y las células iNKT. Dado que las células iNKT luego de su activación liberan rápida y masivamente citoquinas tanto Th1 como Th2, y por la capacidad que tienen para modular la función de las otras células de la inmunidad innata y

**Cuadro 2**  
**Marcadores fenotípicos de las células iNKT humanas de sangre periférica (n=10 individuos adultos sanos)**

Marcador	Células iNKT totales (%)	Células iNKT CD4+ (%)	Células iNKT CD8+ (%)	Células iNKT DN (%)
CD4	38	NA	NA	NA
CD8	22	NA	NA	NA
CD16	3	ND	ND	ND
CD56	14	13	18	11
CD161	85	69	89	93
CD27	82	75	89	82
CD28	89	94	80	89
CD45RA	16	19	28	14
CD45RO	88	91	87	88
CD62L	32	37	29	32
HLA-DR	0.2	ND	ND	ND
CD25	4	7	2	2
CD38	3	ND	ND	ND
CD69	10	16	6	11
CD95	4	8	8	0.5
CD154	0.3	1	0	0.1

DN: doblemente negativas (CD4- CD8-); NA: no aplica; ND: no determinada. La expresión de cada marcador se expresa como el porcentaje de células iNKT positivas para cada molécula en la superficie celular, determinada por citometría de flujo.

adaptativa, existe en la actualidad un gran interés por conocer su papel en el control de las infecciones virales y determinar su posible uso terapéutico a fin de evitar el desarrollo de estados crónicos o de latencia.

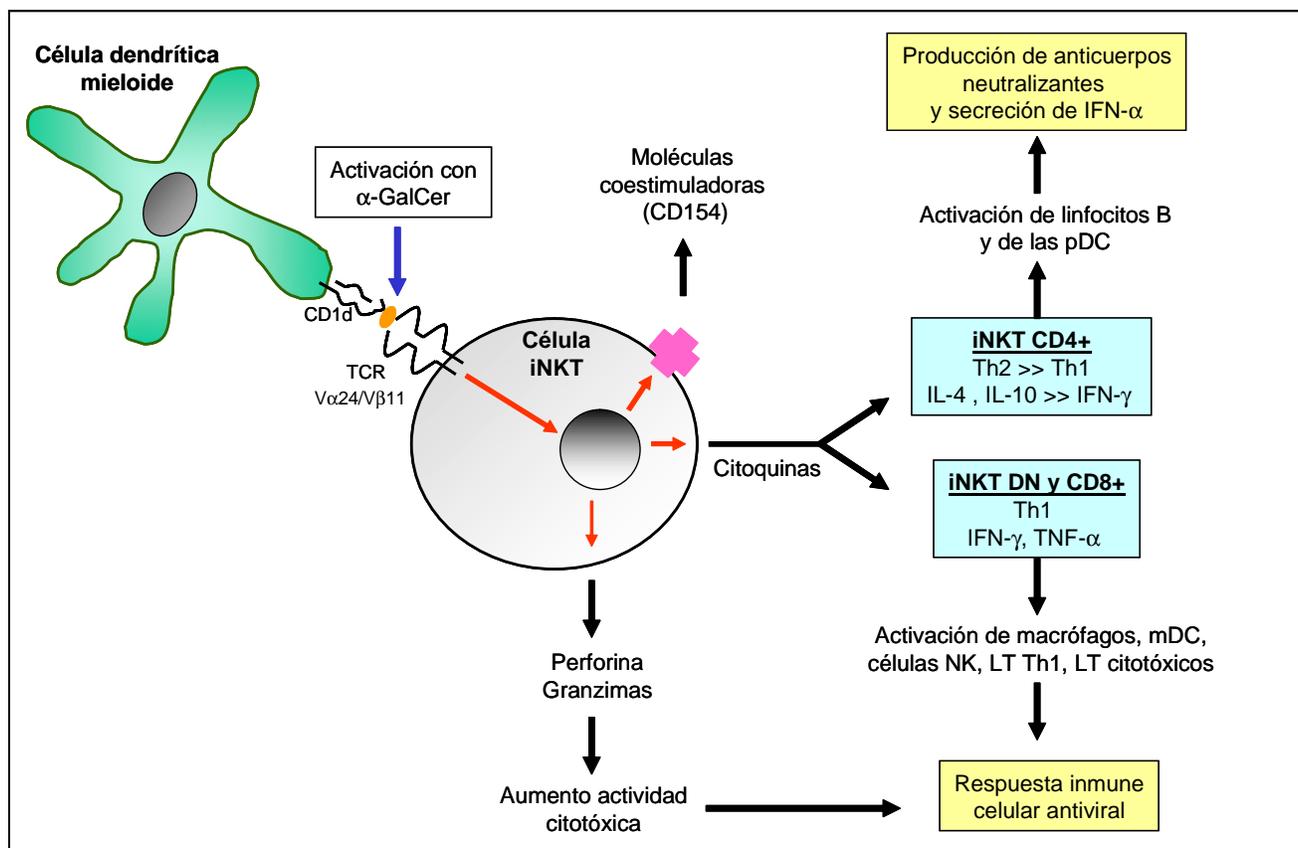
## VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es actualmente el elemento infeccioso más investigado<sup>15</sup>; ha producido más de 20 millones de muertes desde cuando comenzó la pandemia en 1981 y sólo en el año 2004 más de 4 millones de personas se infectaron con este virus, para un promedio aproximado de 15,000 nuevos infectados por día<sup>16</sup>.

El ingreso del VIH a las células blanco depende de la expresión en la membrana del receptor CD4 y de uno de los correceptores, CCR5 o CXCR4. Las células iNKT humanas son muy susceptibles a la infección por el VIH<sup>17,18</sup>: entre 30% y 50% de ellas expresan la molécula CD4 y más de 80% expresan el correceptor CCR5 (de 1800 a 2000 moléculas por célula, densidad mayor que en el resto de linfocitos T CD4+), mientras que sólo entre 5% y 15% expresan el correceptor CXCR4<sup>17,18</sup>. Estudios recientes demostraron que las células iNKT humanas tienen la capacidad de producir viriones infecciosos<sup>19</sup>, y se ha comprobado que en la sangre periférica los individuos infectados por el VIH presentan una disminución signifi-

cativa en el número de células iNKT, pues hasta en 44% de ellos estas células están en niveles prácticamente indetectables (menos de 0.003%)<sup>17</sup>. En los adultos infectados por el VIH no existe una correlación clara entre el número de células iNKT circulantes y el recuento de los linfocitos T CD4+ o la carga viral<sup>19</sup>, mientras que en pacientes pediátricos la carga viral tiene una correlación inversa con el porcentaje de células iNKT CD4+<sup>17</sup>.

Al parecer, la mayor disminución de células iNKT circulantes tiene lugar durante el primer año de la infección<sup>19</sup>, tiempo durante el cual predominan las cepas virales que utilizan el correceptor CCR5 (cepas M trópicas o R5). Todavía no se conoce la causa de esta disminución de las células iNKT, pues aunque se podría originar en un efecto citopático directo, también podría obedecer a que estas células se activan ante el estímulo con el VIH y cambian su patrón de recirculación, para ubicarse en los órganos linfoides secundarios que representan los sitios de mayor replicación viral. Esta alteración cuantitativa en las células iNKT se asocia con una mayor frecuencia y severidad de otras infecciones en los infectados por el VIH, en particular con la aparición de tuberculosis y neoplasias en individuos que aún no tienen inmunosupresión severa. En el modelo murino, las células iNKT son indispensables para formar los granulomas y limitar el progreso de la tuberculosis<sup>20</sup>, dato que extrapolado al ser humano podría ayudar a comprender la frecuencia y severidad de esta infección en los infectados por el VIH que tienen deficiencia en las células iNKT.



**Figura 1. Activación de las células iNKT: papel potencial de la  $\alpha$ -GalCer en el desarrollo de la respuesta inmune antiviral.** La  $\alpha$ -GalCer es un antígeno glicolípido presentado a las células iNKT por la molécula CD1d, proceso que genera potentes señales activadoras. Las células iNKT de pacientes con infecciones virales se pueden activar *ex vivo* o *in vivo* por células dendríticas mieloideas autólogas incubadas con  $\alpha$ -GalCer. En respuesta a este estímulo, las células iNKT producen rápidamente una amplia gama de citoquinas con capacidad inmunomoduladora: las citoquinas tipo Th2 (IL-4 e IL-10) secretadas por las células iNKT CD4+ estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes por los linfocitos B, y la secreción de IFN- $\alpha$  por las células dendríticas plasmacitoides; de otro lado, las citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) secretadas preferencialmente por las células iNKT CD8+ y doblemente negativas activan la respuesta inmune antiviral mediada por los macrófagos, las células dendríticas mieloideas y los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Además, las células iNKT activadas pueden destruir células infectadas por virus mediante la secreción de perforinas y granzimas. DN: célula iNKT doblemente negativa (CD4-/CD8-); pDC: célula dendrítica plasmacitoide; mDC: célula dendrítica mieloide; LT: linfocitos T.

La capacidad de las células iNKT para inducir la respuesta inmune adaptativa humoral y celular ha despertado el interés por buscar alternativas de expansión y activación de estas células en los infectados por el VIH, como una estrategia para lograr una recuperación inmunológica más completa y rápida, así como para fortalecer la respuesta inmune específica contra el VIH. Ensayos preliminares *in vitro* han mostrado que la estimulación de las células iNKT con  $\alpha$ -GalCer las podría hacer más susceptibles a la infección por el

VIH pues aumenta la expresión del correceptor CCR5; por tanto, se podrían utilizar otros glicolípidos que estimulen las células iNKT CD4 negativas, resistentes a la infección, y no las iNKT CD4+. Además, también sería muy importante explorar otras alternativas para estimular las respuestas fisiológicas mediadas por las células iNKT, como el empleo de agonistas de los receptores tipo Toll o citoquinas necesarias para la expansión y activación de las células iNKT, como la IL-12 y la IL-15.

## VIRUS DE LA HEPATITIS B

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) tiene un espectro clínico muy amplio, que contempla la hepatitis aguda asintomática o sintomática, la hepatitis crónica asintomática o activa, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Se estima que más de 400 millones de personas en el mundo son portadores crónicos de este virus<sup>21</sup>. Aunque la respuesta inmune contra el VHB no se ha definido totalmente, si se sabe que juega un papel primordial en el daño hepatocelular y en el origen de las manifestaciones clínicas observadas en esta enfermedad; en particular, se sabe que existe una asociación entre el daño hepático y la actividad de las células T citotóxicas específicas para antígenos del virus<sup>21</sup>.

En los seres humanos, se ha demostrado que la frecuencia de las células iNKT en la sangre periférica aumenta más de dos veces luego de la inmunización vía oral con una vacuna compuesta por antígeno de superficie de VHB y las proteínas de envoltura preS1 y preS2<sup>22</sup>; además, se aumentan los niveles séricos de IFN- $\gamma$ , hallazgos que en conjunto sugieren que las células iNKT regulan la respuesta contra el VHB. Asimismo se ha visto que en los pacientes con cirrosis o carcinoma hepatocelular, asociado con el VHB o con el virus de la hepatitis C (VHC), las células iNKT son más frecuentes en el hígado que en la sangre periférica, y que en el primer órgano estas células producen mayores niveles de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 que los controles sanos<sup>23</sup>. Estas dos últimas citoquinas, además del TGF- $\beta$ <sup>2</sup>, favorecen la generación de fibrosis en respuesta al daño tisular.

En el modelo murino transgénico de VHB, al estimular las células iNKT con  $\alpha$ -GalCer se suprime la replicación viral, inhibición mediada por la secreción de IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , y por la posterior activación de las células NK<sup>24,25</sup>. La IL-18 también inhibe la replicación del VHB por un mecanismo no citopático, efecto que es mediado por la secreción de IFN- $\gamma$  por las células iNKT y NK<sup>26</sup>. Sin embargo, no es factible extrapolar estos resultados al ser humano pues, a pesar de la gran similitud entre las células iNKT murinas y humanas, estas células corresponden a 30%-50% de los linfocitos del hígado murino, mientras que en el hígado humano sólo corresponden a 1% de los linfocitos totales<sup>10</sup>. En consecuencia, se necesitan más estudios en humanos para evaluar el papel que cumplen las células iNKT en las distintas formas clínicas de la infección por el VHB, para determinar claramente la actividad anti-VHB de estas células y definir el beneficio terapéutico de la  $\alpha$ -GalCer.

## VIRUS DE LA HEPATITIS C

El VHC ha infectado a más de 170 millones de personas en todo el mundo, y constituye la indicación más frecuente de trasplante hepático en el hemisferio occidental<sup>27</sup>. Desde el descubrimiento en 1989 del VHC como el agente causal de la hepatitis no A no B de transmisión parenteral, se han hecho múltiples estudios que han contribuido al entendimiento de su estructura molecular y genética, del espectro clínico que produce su infección y de la respuesta inmune que se genera contra él. La infección aguda por el VHC sólo tiene manifestaciones clínicas en 25% de los infectados, mientras que la resolución espontánea de esta infección se presenta apenas en 10% a 25% de los pacientes adultos, contrario a lo observado en la infección por el VHB donde la cifra de resolución puede ser tan alta como 95%<sup>27</sup>.

Más de 50% de los pacientes infectados por el VHC progresan a una hepatitis crónica<sup>27</sup>; aunque son muchos los factores implicados en la resolución de la infección aguda y la progresión al estadio crónico, se acepta que la naturaleza de la respuesta inmune que se induce es uno de los factores determinantes<sup>28</sup>. Hasta el momento, pocos estudios han podido evaluar el comportamiento de las células iNKT durante la infección por el VHC y existen controversias entre los resultados; se ha informado tanto un número normal<sup>29</sup> como disminuido<sup>14</sup> de células iNKT en la sangre periférica (sobre todo de pacientes con viremia positiva) cuando se compara con los controles sanos. También se observó que, a diferencia de las células iNKT de sangre periférica, las que había en el hígado expresaban marcadores de activación reciente (como la molécula CD69); esto sugiere que las células iNKT hepáticas se activaron durante la infección por el VHC. Además, se ha visto asociación entre un número circulante bajo de células iNKT y el progreso de la infección por VHC hacia cirrosis y carcinoma hepatocelular, lo que indica que estas células podrían participar en el control de la infección crónica y su evolución al cáncer<sup>30,31</sup>.

Se ha propuesto que los cambios en la frecuencia de las células iNKT en la sangre periférica de los infectados por el VHC se deben a un fenómeno de compartimentalización, pues se ha observado que 95% de los linfocitos intrahepáticos en la infección por VHC son de origen extrahepático, aunque la mayoría se encuentra en proceso de apoptosis; por ejemplo, las células iNKT aisladas de hígados infectados mueren rápidamente aunque se tengan en condiciones idóneas de cultivo<sup>32</sup>.

## VIRUS DE LA FAMILIA HERPESVIRIDAE

*Herpes simplex 1 y 2, citomegalovirus (CMV), y Varicela Zoster.* La importancia que tienen las células iNKT en el control de las infecciones por el virus varicela zoster se hizo evidente con el informe de un caso de infección diseminada, luego de aplicar la vacuna replicativa para varicela; en este individuo se demostraron deficiencias cuantitativas y funcionales de las células iNKT, siendo esta deficiencia la única alteración inmunológica que se encontró<sup>33,34</sup>.

Los ratones «*knock out*» para CD1d o para J $\alpha$ 28-1, que carecen de células iNKT, se utilizaron para evaluar el papel de estas células en la respuesta inmune contra el herpes simplex virus 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2)<sup>35</sup>. Cuando estos ratones se infectan con HSV-1, las manifestaciones de la enfermedad son mucho más severas y las lesiones son de mayor tamaño. Adicionalmente, la carga viral es mucho más elevada y persiste por mucho más tiempo, lo que sugiere una eliminación viral inadecuada. En esos ratones, estos virus se diseminan al sistema nervioso central de manera más rápida y amplia, y en este órgano se ha observado una mayor persistencia de los antígenos virales. Cuando a los ratones normales se les reta con estos virus, se ha observado que las células NK e iNKT son las responsables de la secreción de IFN- $\gamma$  luego de la infección.

La respuesta inmune contra el CMV murino (MCMV) depende en gran parte de la acción de las células NK, que controlan esta infección por medio de la producción de perforinas e IFN- $\gamma$ <sup>36</sup>; al parecer, en esta respuesta también serían importantes las células iNKT, si se considera el papel de estas células en la regulación de la actividad de las células NK<sup>37</sup>. Sin embargo, se ha encontrado que la carga viral de los ratones «*knock out*» para J $\alpha$ 28-1 es igual a la que presentan los ratones normales, lo que sugiere que en los ratones las células iNKT no tienen un papel directo en el control de la infección por MCMV<sup>38</sup>. A pesar de estas evidencias, que sugieren un papel poco significativo de las células iNKT en el control de la infección por el MCMV, se observó que al administrar a los ratones normales la  $\alpha$ -GalCer se disminuyó la carga viral luego del reto con MCMV, efecto que fue mediado por la activación de células NK dependiente de las células iNKT, con producción de perforinas e IFN- $\gamma$ <sup>38</sup>.

## VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL (RSV)

Durante el desarrollo de las manifestaciones de varias

infecciones virales, algunos de los daños están mediados por mecanismos inmunopatológicos; ese es el caso de la bronquiolitis derivada de la infección con el RSV, en la cual se ha demostrado la participación de linfocitos T, citoquinas proinflamatorias y la IgE<sup>39</sup>. Los estudios en ratones para evaluar el papel de las células iNKT en la respuesta inmune contra el RSV, han mostrado que están comprometidas en la activación, reclutamiento y expansión de linfocitos TCD8+<sup>40</sup>. Si se compara el resultado de la infección con RSV en ratones silvestres y en los «*knock out*» para CD1d, se observó que los animales «*knock out*» tenían manifestaciones más severas, menor producción de IFN- $\gamma$ , eliminación más lenta del virus y una activación limitada de los linfocitos T CD8+. Lo anterior es consistente con la hipótesis de que las manifestaciones clínicas de la enfermedad podrían ser, al menos en forma parcial, mediadas por un mecanismo inmune regulado por las células iNKT<sup>40</sup>. Además, la administración en los ratones silvestres de  $\alpha$ -GalCer aumentó la secreción de IFN- $\gamma$  y la presencia de células NK y linfocitos T CD8+ en el pulmón; esta respuesta se asoció también con un incremento en la producción de IL-4 por las células iNKT, citoquina que moduló la respuesta de los linfocitos T citotóxicos<sup>41</sup>.

## COXSACKIEVIRUS B (CVB)

En el modelo murino y con el CVB-3 (productor de miocarditis) y el CVB-4 (productor de pancreatitis), se evaluó el papel de las células iNKT en la respuesta inmune contra estos virus. En los ratones silvestres la mortalidad inducida por el CVB-3 fue 67%, en comparación con 50% observado en los ratones «*knock out*» para J $\alpha$ 28-1 y 25% en los ratones «*knock out*» para CD1d<sup>42</sup>. Estos resultados sugieren que las células restringidas por CD1d tienen un papel importante en la fisiopatología de la miocarditis producida por CVB-3. En los ratones infectados por CVB4 se encontró que en respuesta a la administración de IL-12, las células iNKT y NK secretaron IFN- $\gamma$ , fenómeno que se asoció con disminución de la mortalidad y la severidad de las manifestaciones clínicas; sin embargo, no se inhibió la replicación viral<sup>43</sup>.

## VIRUS DE LA CORIOMENINGITIS LINFOCÍTICA (LCMV)

La respuesta inmune contra este virus aparentemente no es dependiente del IFN- $\gamma$ , lo que concuerda con informes sobre la escasa actividad de las células iNKT contra el LCMV<sup>44</sup>. Cuando se infectaron con el LCMV ratones silvestres y ratones «*knock out*» para CD1d no

hubo diferencias significativas en los títulos virales, y se determinó que la respuesta inmune que controlaba esta infección dependía fundamentalmente de las células NK<sup>44</sup>. Sin embargo, otros estudios mostraron que durante la infección con este virus los ratones silvestres presentaban una disminución de las células iNKT en el hígado, que murieron por apoptosis independiente de FasL y quizá a consecuencia directa de la infección<sup>45,46</sup>.

### VIRUS DE LA ENCEFALOMIOCARDITIS DIABETOGÉNICA (ECMV-D)

El virus de la encefalomiocarditis diabética es un picornavirus que *in vivo* se caracteriza por infectar el sistema nervioso, los islotes pancreáticos y el corazón, causando parálisis aguda, diabetes y miocarditis. En el estudio de la evolución de la infección en los ratones silvestres y «*knock out*» para CD1d, se encontró que los animales «*knock out*» presentaban una enfermedad más severa con mayor parálisis, concentraciones séricas más altas de glucosa y concentraciones disminuidas de IL-12; además, la administración de  $\alpha$ -GalCer disminuyó la severidad de la infección en las cepas silvestres<sup>47</sup>. La baja producción de IL-12 pudo deberse a una inadecuada activación de las células dendríticas, activación que en condiciones normales también la pueden llevar a cabo las células iNKT<sup>48</sup>.

### AGONISTAS DE LA MOLÉCULA CD1d: POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS

En el modelo murino la  $\alpha$ -GalCer se utilizó con éxito en el tratamiento de tumores y enfermedades autoinmunes, resultados que generan expectativa sobre su potencial terapéutico en los seres humanos. Ya se han hecho los primeros estudios en pacientes con diversos tipos de malignidad o con infección crónica por el VHC<sup>9,29,49</sup>, no sólo para evaluar la actividad de esta molécula sino también su tolerancia. Se ha observado que el uso de células dendríticas pulsadas *ex vivo* con  $\alpha$ -GalCer estimula potentemente el sistema inmune innato, pues aumenta el número de células NK e iNKT en la sangre periférica 7 días después de la primera aplicación. Además, también se informó un incremento, aunque menor, en el número de linfocitos T y B; estos cambios cuantitativos se correlacionaron con un aumento en los niveles séricos de IFN- $\gamma$  e IL-12, y en la actividad citotóxica de las células NK<sup>49</sup>. Aunque esa investigación no se diseñó para determinar

desenlaces clínicos sino variables inmunológicas y tolerancia a la  $\alpha$ -GalCer, también se observó:

1. Una disminución importante en los marcadores enzimáticos séricos asociados con la evolución de las neoplasias.
2. Necrosis de los tumores.
3. Disminución de los niveles de enzimas hepatocelulares en pacientes con carcinoma hepatocelular.

Estas y otras evidencias sugieren que la terapia con  $\alpha$ -GalCer puede ser útil para activar el sistema inmune con el propósito de combatir varias infecciones virales crónicas que afectan al ser humano, como las causadas por los virus hepatotrópicos, y de potenciar la respuesta inmune contra los antígenos administrados en las vacunas.

### CONCLUSIONES

Los hallazgos sobre el papel que cumplen las células iNKT en la respuesta inmune antiviral parecen depender del modelo utilizado (tipo de virus y factores genéticos de los animales de experimentación), de la localización anatómica de la infección, e incluso del estado funcional de otros elementos de la respuesta inmune del hospedero. A pesar de que en los últimos años se ha intensificado la investigación sobre la fisiología de las células iNKT y su actividad antiviral, todavía persisten muchos otros tipos de virus por estudiar, así como también resta por definir qué relación existe entre la activación diferencial de los distintos subgrupos de células iNKT y las diversas formas clínicas que se observan como consecuencia de una misma infección viral. Una mejor comprensión de la interrelación de las células iNKT con los virus permitirá evaluar el potencial de una inmunoterapia con citoquinas y/o moléculas restringidas por CD1d (como  $\alpha$ -GalCer y otros glicolípidos) que modulen la respuesta inmune innata y adaptativa a través de la activación de las células iNKT.

### AGRADECIMIENTOS

El presente artículo contó con el apoyo del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad de Antioquia, Estrategia de Sostenibilidad de Grupos de Investigación 2005-2006.

### REFERENCIAS

1. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, *et al.* A novel population of T-cell receptor

- alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 1987;329: 251-254.
2. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: What's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 231-237.
  3. Exley MA, Koziel MJ. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 2004; 40: 1033-1040.
  4. Gumperz JE. Antigen specificity of semi-invariant CD1d-restricted T cell receptors: the best of both worlds? *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 285-294.
  5. Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Maillet S, et al. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10685-10690.
  6. Godfrey DI, Pellicci DG, Smyth MJ. The elusive NKT cell antigen - is the search over? *Science* 2004; 306: 1687-1689.
  7. Wu DY, Segal NH, Sidobre S, Kronenberg M, Chapman PB. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med* 2003; 198: 173-181.
  8. Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 1998; 188: 1529-1534.
  9. 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: 3702-3709.
  10. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; 21: 573-583.
  11. Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumor immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 211-222.
  12. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by tetramer staining. *J Exp Med* 2002; 195: 625-636.
  13. Sandberg JK, Bhardwaj N, Nixon DF. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol* 2003; 33: 588-596.
  14. Lucas M, Gadola S, Meier U, Young NT, Harcourt G, Karadimitris A, et al. Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J Virol* 2003; 77: 2251-2257.
  15. Henao JA, Rugeles MT. Patogénesis del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida. *Anuario de Enfermedades Infecciosas* 2003; 1: 13-43.
  16. UNAIDS and WHO. 2004 report on the global AIDS epidemic: 4th global report. XV International AIDS Conference Bangkok. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). [en línea]. [fecha de acceso julio 15 de 2005]. URL disponible en: <http://www.unaids.org/bangkok2004/report.html>
  17. Motsinger A, Haas DW, Stanic AK. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 2002; 195: 869-875.
  18. Fleuridor R, Wilson B, Hou R, Landay A, Kessler H, Al-Harthi L. CD1d-restricted natural killer T cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection. *Immunology* 2003; 108: 3-9.
  19. Van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, et al. Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol* 2002; 168: 1490-1495.
  20. Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. *Infect Immun* 2002; 70: 6302-6309.
  21. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection. Natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129.
  22. Safadi R, Israeli E, Papo O, Shibolet O, Melhem A, Bloch A, et al. Treatment of chronic hepatitis B virus infection via oral immune regulation toward hepatitis B virus proteins. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2505-2515.
  23. De Lalla C, Galli G, Aldighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, et al. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression on chronic viral hepatitis. *J Immunol* 2004; 173: 1417-1425.
  24. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 921-930.
  25. Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Cutting Edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001; 167: 6701-6705.
  26. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 10702-10707.
  27. Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004; 24 (Suppl): 3-8.
  28. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714.
  29. Van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Kolgen W, Stam AG, de Gruijl TD, et al. Circulating Valpha24(+)Vbeta11(+) NKT cell numbers and dendritic cell CD1d expression in hepatitis C virus infected patients. *Clin Immunol* 2005; 114: 183-189.
  30. Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, Ohkawa T, Koike Y, Aihara T, et al. Decrease of CD56+ T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 32: 962-967.
  31. Deignan T, Curry MP, Doherty DG, Golden-Mason L, Volkov Y, Norris S, et al. Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2002; 37: 101-108.
  32. Nuti S, Rosa D, Valiante NM, Saletti G, Caratuzzolo M, Dellabona P, et al. Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24 T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3448-3455.
  33. Kramer JM, LaRussa P, Tsai WC. Disseminated vaccine strain varicella as the acquired immunodeficiency syndrome-defining illness in a previously undiagnosed child. *Pediatrics* 2001; 108: E39.
  34. Levy O, Orange JS, Hibberd P, Steinberg S, LaRussa P, Weinberg

- A, *et al.* Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-Zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells. *J Infect Dis* 2003; 188: 948-953.
35. Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G, Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* 2003; 170: 1430-1434.
  36. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 1995; 182: 1045-1056.
  37. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, *et al.* Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999; 163: 4647-4650.
  38. Van Dommelen SLH, Tabarias HA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Activation of Natural Killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J Virol* 2003; 77: 1877-1884.
  39. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Pediatr Respir Rev* 2004; 5 (Suppl): 119-126.
  40. Johnson TR, Hong S, Van Kaer L, Koezuka Y, Graham BS. NK T cells contribute to expansion of CD8+ T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J Virol* 2002; 76: 4294-4303.
  41. Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, *et al.* Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol* 1999; 163: 2373-2377.
  42. Huber S, Sartini D, Exley M. Role of CD1d in coxsackievirus b3-induced myocarditis. *J Immunol* 2003; 170: 3147-3153.
  43. Potvin DM, Metzger DW, Lee WT, Collins DN, Ramsingh AI. Exogenous interleukin-12 protects against lethal infection with coxsackievirus B4. *J Virol* 2003; 77: 8272-8279.
  44. Spence PM, Sriram V, Van Kaer L, Hobbs JA, Brutkiewicz RR. Generation of cellular immunity to lymphocytic choriomeningitis virus is independent of CD1d1 expression. *Immunology* 2001; 104: 168-174.
  45. Roberts TJ, Lin Y, Spence PM, Van Kaer L, Brutkiewicz RR. CD1d1-dependent control of the magnitude of an acute antiviral immune response. *J Immunol* 2004; 172: 3454-3461.
  46. Skold M, Behar SM. Role of CD1d-restricted NKT cells in microbial immunity. *Infect Immun* 2003; 71: 5447-5455.
  47. Exley MA, Bigley NJ, Cheng O, Shaulov A, Tahir SM, Carter QL, *et al.* Innate immune response to encephalomyocarditis virus infection mediated by CD1d. *Immunology* 2003; 110: 519-526.
  48. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, *et al.* The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1121-1128.
  49. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, *et al.* Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 2004; 103: 383-389.