

# Las Células iNKT Invariantes: Una Vía Promisoria para la Terapia de la Infección por el VIH

Carlos Julio Montoya Guarín<sup>1</sup>, María Teresa Rugeles López<sup>2</sup>

Las células T asesinas naturales invariantes (iNKT) son un elemento crítico para la interacción entre las respuestas inmunes innata y adaptativa, y tienen una potente actividad inmunorreguladora debido a su capacidad para producir citocinas como el interferón gamma, la interleucina-4 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos. El potencial de las células iNKT para modular la respuesta inmune adaptativa se ha documentado en los modelos de cáncer y autoinmunidad. Sin embargo, el papel que estas células desempeñan en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) apenas está comenzando a ser evaluado. Los oligodeoxinucleótidos CpG son moléculas sintéticas de DNA no metilado reconocidas por el receptor tipo Toll-9. Se ha observado que la administración de oligodeoxinucleótidos CpG potencia las respuestas efectoras de la inmunidad innata gracias a que estimula las células dendríticas plasmacitoides para producir interferón alfa. También se ha evidenciado que este tipo de células dendríticas puede estimular indirectamente las células iNKT para inducir la secreción de citocinas que modulan la respuesta inmune adaptativa. La hipótesis que se analiza en esta revisión es que el número y función de las células iNKT está disminuido en los pacientes infectados por el VIH, fenómeno que podría ser revertido por la activación de las células dendríticas plasmacitoides con los oligodeoxinucleótidos CpG y la subsiguiente producción de interferón alfa. **Salud UIS 2003;35:80- 89**

**Palabras clave:** VIH, Células iNKT, Oligodeoxinucleótidos CpG, Células Dendríticas Plasmacitoides, Interferón-alfa

Invariant natural killer T cells (iNKT) are a critical element in bridging innate and adaptive immune responses; they have a potent immunomodulatory activity because their ability to secrete cytokines such as interferon-gamma, interleukin-4 and granulocyte-monocyte colony stimulating factor. The potential for iNKT to modulate adaptive immune responses has been well documented in autoimmune and cancer models. However, the role of iNKT cells in human immunodeficiency virus (HIV) infection is just currently being evaluated. CpG oligodeoxynucleotides are synthetic unmethylated DNA molecules that are recognized by Toll-like receptor 9. CpG oligodeoxynucleotides administration has been shown to enhance innate immune effector responses through stimulation of plasmacytoid dendritic cells to secrete interferon-alpha. Also, it have been demonstrated that these dendritic cells activate iNKT cells indirectly, inducing the secretion of cytokines that modulate adaptive immune responses. This review will examine the hypothesis that the number and function of iNKT cells are decreased in patients with HIV infection, and that these facts can be reversed by CpG oligodeoxynucleotides-mediated activation of plasmacytoid dendritic cells and subsequent production of interferon-alpha. **Salud UIS 2003;35:80-89**

**Key words:** HIV, iNKT Cells, CpG Oligodeoxynucleotides, Plasmacytoid Dendritic Cells, Interferon-alpha

## INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es una infección crónica, caracterizada fundamentalmente por la eliminación progresiva de las células T CD4+ y por anomalías funcionales en el resto de leucocitos que sobreviven.

Este fenómeno causa una disfunción inmunológica compleja que finalmente predispone a las infecciones por gérmenes oportunistas y a las neoplasias, enfermedades definitivas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Esta enfermedad se describió hace más de 20 años y el número de individuos infectados por el VIH y las muertes debidas a esta enfermedad han ido aumentando gradualmente en todo el mundo.<sup>1,2</sup>

Esta situación alarmante ha despertado interés por buscar alternativas efectivas de tratamiento, tanto para bloquear la replicación viral como para evitar el deterioro inmunológico gradual de los infectados.<sup>3</sup> El desarrollo de terapias basadas en la manipulación de la respuesta inmune puede ser la clave para alcanzar un control a

<sup>1</sup> MSc. Grupo de Inmunodeficiencias Primarias e Inmunovirología. Corporación Biogénesis. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.

<sup>2</sup> MSc., PhD. Grupo de Inmunodeficiencias Primarias e Inmunovirología. Corporación Biogénesis. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.

**Correspondencia:** E-mail: mtrugel@catios.udea.edu.co  
Resibido Enero 6 de 2003/ Marzo 15 de 2003

largo término de la infección por el VIH,<sup>4</sup> pero su progreso demanda el conocimiento del papel que los diferentes elementos de la respuesta inmune juegan en la evolución de esta infección.<sup>5</sup>

Un grupo particular de los linfocitos T expresa marcadores clásicamente encontrados en las células NK y se han denominando células T asesinas naturales (NKT). La mayor parte de estas células NKT tiene un receptor antigénico único no variable y se conocen como células NKT invariantes (iNKT), se consideran parte del sistema inmune innato y son un elemento crítico en la interrelación de las respuestas inmunes innata y adaptativa.<sup>6</sup> El papel que desempeñan las células iNKT en la infección por el VIH está apenas comenzando a ser estudiado<sup>7,8</sup> sin embargo, ha despertado interés porque estas células tienen una importante actividad inmunomoduladora debido a su capacidad para producir rápidamente citocinas como el interferón-gama, la interleucina-4 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, que estimulan o inhiben la función de la inmunidad celular adaptativa. El potencial de las células iNKT para modular la respuesta adaptativa ya se ha demostrado en los modelos de cáncer y auto-inmunidad.<sup>6</sup>

### LAS CÉLULAS iNKT

El origen de las células iNKT es todavía controversial y se propone la existencia de dos tipos, según sean o no derivadas del timo. Las células iNKT timo dependientes son principalmente CD4+, mientras que las timo independientes son en su mayoría CD8+. La generación de las células iNKT requiere de la interacción con otras células que expresen linfotoxinas en la membrana, además que depende de la señalización derivada del receptor antigénico de la célula iNKT y del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.<sup>9,10</sup> Las células iNKT se pueden localizar en la mayoría de los tejidos. Son más abundantes en el hígado (30 a 50% de los linfocitos de ese órgano), el timo (10 a 20% de las células T HAS+; 0.3 a 0.5% de los timocitos) y la médula ósea (20 a 30% de los linfocitos), mientras que su frecuencia es muy baja en los ganglios linfáticos y en la sangre venosa periférica (0.1 a 0.5% de los linfocitos).<sup>6,9</sup>

### Marcadores fenotípicos de las células iNKT

En el modelo murino y en los humanos se ha observado que las células iNKT comparten rasgos de los linfocitos T y de las células NK: pueden expresar en forma variable las moléculas CD4 y CD8 de las células T y algunos antígenos de superficie de las células NK (murinas:

NK1.1, DX5, Ly49a; humanas: CD161, CD56, CD57), pero expresan siempre el receptor antigénico de la células T y las moléculas del complejo CD3.<sup>10</sup>

Con base en la expresión de las moléculas CD4 y CD8 se pueden identificar cuatro subgrupos de células iNKT: las CD4+/CD8- (conocidas como CD4+, representan entre el 15% y 20% del total), las CD4-/CD8+ (denominadas CD8+, entre 20% y 25%), las CD4+/CD8+ (doblemente positivas, entre un 1% y 5%) y las CD4-/CD8- (doblemente negativas, entre 55% a 60%). Los porcentajes relativos de cada subpoblación varían considerablemente de una persona a otra y entre los diferentes órganos.<sup>6,10</sup>

Con respecto al receptor antigénico de las células iNKT, es característico que es invariante y la presentación antigénica está restringida a la molécula CD1d. Esto significa que estas células son activadas específicamente por la presentación de antígenos glicolipídicos en moléculas no polimórficas de la clase Ib (tabla 1).

**Tabla 1.** Características de las células iNKT

CARACTERÍSTICA	FENOTIPO	APRECIACIONES
Principales subgrupos	CD4 + / CD8 - CD4 - / CD8 + CD4 - / CD8 - CD4 + / CD8 +	Las proporciones son variables en los diferentes órganos y tejidos
Receptor antigénico (TCR)	Cadena a: Vα24JαQ Cadena b: Vβ11	Cadena a generalmente invariante
Elemento de restricción	Molécula CD1d	Expresada fundamentalmente por las células dendríticas mieloides
Antígenos cognados	Glicolípidos	Desconocidos. Las células iNKT también son activadas por glicolípidos sintéticos como la alfa-galactosil-ceramida
Moléculas accesorias	CD161 (NKR-P1) CD122	Ligandos desconocidos
Producción de citocinas	iNKT CD4+: IL-4 > IL-2 > IFN-γ = TNF-α iNKT doble negativas  y CD8+: IFN-γ = TNF-α > IL-2 > IL-4	Los patrones de secreción de citocinas tipo Th1 y Th2 depende del subgrupo de células iNKT activado
Frecuencia en sangre periférica	0.1% a 0.5% de los Linfocitos	Muy variable entre los humanos

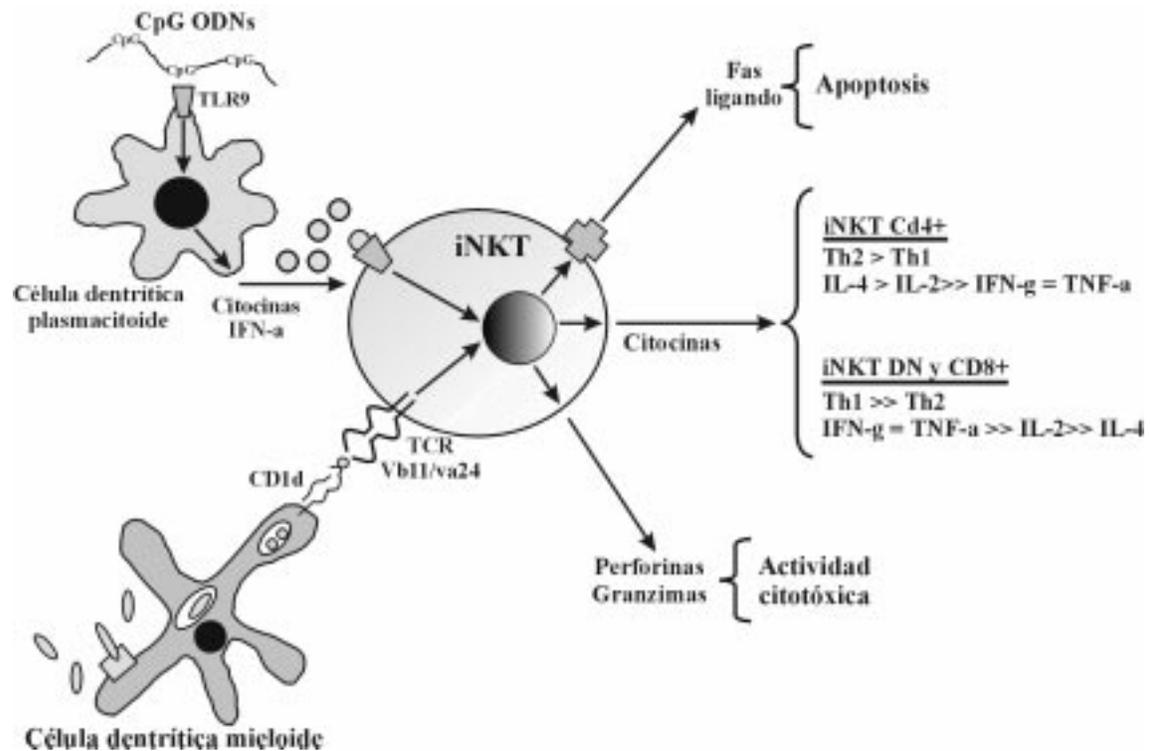
IL: interleucina; IFN-g: interferón gamma; TNF-a: factor de necrosis tumoral alfa.

Además, *in vitro* e *in vivo* estas células también son activadas por glicolípidos sintéticos, como la alfa-galactosil-ceramida, en el contexto de la molécula CD1d. En los humanos, ese receptor antigénico invariante consta de una cadena alfa del tipo Va24JaQ que se une preferencialmente con una cadena beta del tipo Vb11 (Va24/Vb11).<sup>10,11</sup> Sin embargo, una parte de las células iNKT CD8+ expresa un receptor antigénico ligeramente variable pues contiene dominios Va y Vb combinados al azar; estas células CD8+ no requieren de la molécula CD1d para su desarrollo y son seleccionadas por moléculas clásicas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I.<sup>12</sup>

El análisis fenotípico de las células iNKT humanas en sangre venosa periférica ha permitido caracterizar la expresión de diferentes marcadores de superficie. Con respecto a las moléculas que definen linajes específicos, las células iNKT son negativas para CD14, CD16, CD19 y CD20. Una vez activadas adquieren un fenotipo

caracterizado por el patrón CD38+, CD69+, CD45RO+ y CD45RA-. Finalmente, la expresión de otras moléculas funcionales las define como CD14-, CD95+ y CD161+; un 50% son CD56+ y tienen una expresión baja de CD25 y CD62L.<sup>13</sup>

De otro lado, las células iNKT tienen un patrón muy particular en la expresión de los receptores para las quimioquinas, lo que indica un comportamiento especial en su migración. En cuanto a los receptores para las quimioquinas alfa, expresan principalmente CXCR4 (96%, pero baja intensidad), CXCR6 (69%) y CXCR3 (68%). De los receptores para las quimioquinas beta, las células iNKT son positivas para CCR2 (91%), CCR5 (87%), CCR6 (74%) y CCR1 (64%).<sup>14</sup> La expresión de estos receptores de quimioquinas en los diferentes subgrupos de células iNKT varía en forma importante. Las iNKT CD4+ tienen una expresión mayor de CXCR4 y muy baja de CCR1; las iNKT CD8+ y las doblemente negativas tienen una elevada expresión de CCR1, CCR6 y CXCR6, mientras que muy baja de CCR4.<sup>14</sup>



**Figura 1.** Formas de activación de las células iNKT y consecuencias funcionales. La activación directa de las células iNKT es dependiente del receptor antigénico invariante, restringida por la molécula CD1d y es realizada fundamentalmente por las células dendríticas mieloides que expresan CD1d. La activación indirecta es independiente del receptor antigénico, no restringida por CD1d y depende de la acción de citocinas, como las producidas por las células dendríticas plasmacitoides activadas por los oligodeoxinucleótidos CpG. Dependiendo del fenotipo de las células iNKT activadas (CD4+, CD8+, doblemente negativas), se obtendrá una respuesta funcional tipo Th1 o Th2. Además, la activación de las células iNKT también les permite desplegar acciones de citotoxicidad y apoptosis. CpG ODNs: oligodeoxinucleótidos con motivos CpG; DN: células doblemente negativas para CD4 y CD8; TLR9: receptor tipo Toll-9; TCR: receptor antigénico de la célula iNKT; IL: interleucina; IFN-?: interferón alfa; IFN-?: interferón gamma; TNF-?: factor de necrosis tumoral alfa.

### Activación de las células iNKT

La activación *in vivo* de las células iNKT lleva rápidamente a la activación subsiguiente de las células NK y de los linfocitos T y B. La principal vía de activación es la estimulación antigénica, cuando el receptor antigénico invariante interactúa con una molécula CD1d cargada con un antígeno glicolipídico (figura 1). La molécula CD1d es expresada principalmente por las células dendríticas mieloides localizadas en la zona paracortical de los ganglios linfáticos, sitio al que llegan las células iNKT que migran desde la periferia para activarse y secretar citocinas.<sup>15,16</sup> Las células iNKT también se relacionan funcionalmente con las células dendríticas plasmacitoides, aunque por un mecanismo diferente a la presentación antigénica en la molécula CD1d.<sup>17</sup> Este diálogo cruzado entre las células dendríticas y las células iNKT es importante en la regulación del tipo y la magnitud de la respuesta inmune (figura 1).

Se ha demostrado que clones de células iNKT también pueden ser activadas con anticuerpos monoclonales contra el complejo CD3; la mayor actividad transcripcional durante esta activación se presentó en los genes que codifican para las moléculas: proteína inflamatoria de los macrófagos-1 alfa, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina-4, interleucina-13, interferón gamma, factor estimulante de granulocitos y monocitos, perforinas, granzimas tipo B y 4-1BB.<sup>18</sup> De otro lado, las células iNKT también se pueden activar y expandir hasta 75 veces *in vitro* si se cultivan con células dendríticas derivadas de monocitos incubadas con alfa-galactosil-ceramida.<sup>19</sup>

### Interacción de las células iNKT con las células dendríticas

Las células dendríticas inmaduras tienen una notable capacidad de diferenciarse hacia subtipos funcionales específicos y, dependiendo del linaje (mieloide o plasmacitoide) y el estímulo para la maduración, las células dendríticas controlan el patrón de citocinas y las funciones efectoras de todas las células T, incluyendo las iNKT.<sup>20,21</sup>

En sangre periférica, las células dendríticas mieloides se caracterizan por un fenotipo negativo para marcadores de otros linajes (CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD56-) pero positivo para CD11c, CD1c y CD1d (tabla 2). No expresan receptores tipo Toll-9 pero sí del tipo 2 y 4, por lo que pueden ser estimuladas con lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ácido teicóico.

Sus funciones más importantes son la captación de antígenos (por pinocitosis, endocitosis, fagocitosis) y la activación de las células T.<sup>20,21</sup>

Por su lado, las células dendríticas plasmacitoides también son negativas para marcadores de linaje y no expresan CD11b, CD11c, CD1c ni CD1d; en cambio, tienen una alta expresión de CD123 (cadena alfa del receptor de IL-3; tabla 2). La principal función de las células dendríticas plasmacitoides es la secreción de interferón alfa en respuesta a las infecciones virales; su potencial

**Tabla 2.** Subgrupos de células dendríticas: fenotipos y funciones.

ORIGEN	LINFOIDE	MIELOIDE	
Subgrupo de Células dendríticas	Célula dendríticas plasmacitoide	Célula dendríticas Intersticial	Células de Langerhans
Precusores inmaduros (en sangre periférica)			
Fenotipo	CD11c-/CD1a- CD123 ++ BDCA2+/ BDCA4+	CD11c-/CD1a - CD123 dim BDCA1 +	CD11c <sup>dim</sup> / CD1a+ CD123 - BDCA3 +
Producción de IFN-a	++++	No	No
Células maduras			
Fenotipo	CD11c - CD11b - CD1a - CD1c- CD1d- CD123++ CD13 - CD33- CD4++ CD45RA+ CD45RO- CD86 + CD40 + Receptores Fc - Gránulos Birbeck - Langerina -	CD11c ++ CD11b ++ CD1a- CD1c ++ CD1d ++ CD123 <sup>dim</sup> CD13 ++ CD33++ CD4+ CD45RA- CD45RO+ CD86 + CD40 + Receptores Fc - Gránulos Birbeck - Langerina -	CD11c +/- CD11b ++ CD1a++ CD1c - CD1d - CD123- CD13++ Cd33++ CD4+/- CD45RA- CD45RO+ CD86 + CD40 + Receptores Fc - Gránulos Birbeck + Langerina +
Función			
Secreción IL-12	+/-	++++	++++
Secreción IL-10	-	++++	+/-
Activación LT CD4+	++	++++	++++
Activación LT CD8+	++	+++	++++
Interacción LB/DC	¿	++++	+

IL: interleucina; LT: linfocitos T; LB: linfocitos B; DC: célula dendrítica; dim: expresión baja

como células presentadoras de antígenos es bajo. Las células dendríticas plasmacitoides también juegan un papel importante en la protección contra las infecciones causadas por los gérmenes oportunistas.<sup>20</sup>

Varias investigaciones han revelado la importancia de la interacción entre las células dendríticas y las células iNKT para la regulación del tipo e intensidad de la respuesta inmune.<sup>22-24</sup> También existen evidencias de una deficiente comunicación entre las células iNKT y las células dendríticas en algunas enfermedades en las que el control de la respuesta inmune depende de las células iNKT, como los trastornos autoinmunes y la tolerancia en los órganos inmunoprivilegiados.<sup>25-28</sup>

### Funciones de las células iNKT

Si bien las células iNKT forman parte del sistema inmune innato, tienen un efecto regulador sobre la respuesta inmune adaptativa. El comportamiento funcional de estas células es muy heterogéneo y depende del sitio anatómico donde se encuentren.<sup>10</sup> Usando tetrámeros de la molécula CD1d cargada con alfa-galactosil-ceramida se ha podido definir la existencia en sangre periférica de dos grupos funcionales de células iNKT, los cuales difieren en la producción de citocinas y en la expresión de moléculas citotóxicas.<sup>29</sup>

Las células iNKT CD4+ activadas producen citocinas de los patrones Th1 y Th2, pero con una mayor secreción de interleucina-4, intermedia de interleucina-2 y escasa de interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa. De otro lado, cuando las células iNKT doblemente negativas y las CD8+ son activadas secretan principalmente citocinas del tipo Th1 como interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa, y baja cantidad de interleucina-2 e interleucina-4; además, producen perforinas en respuesta a la estimulación con interleucina-2 e interleucina-12. Por lo tanto, las células iNKT pueden tener efectos inmunomoduladores opuestos como resultado de la activación selectiva de alguno de los subgrupos fenotípicos definidos anteriormente.<sup>29</sup>

Se ha comprobado que las células iNKT son importantes en la generación de la respuesta inmune contra diferentes patógenos intracelulares, incluyendo virus, bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*), hongos (*Cryptococcus neoformans*), *Toxoplasma gondii* y *Leishmania major*.<sup>6,20</sup> Además, las células iNKT cumplen un papel crítico en la vigilancia antitumoral;<sup>30,31</sup> esta función se incrementa significativamente por la adición de alfa-galactosil-ceramida, resultado de la interacción de las células iNKT

con las células dendríticas y es dependiente de la secreción de interleucina-12 por las células dendríticas mieloides.<sup>22</sup>

Las células iNKT también tienen actividad lítica. Ellas expresan constitutivamente el ligando para la molécula Fas y eliminan células que sean Fas+; además, pueden lisar células tumorales por un mecanismo dependiente de perforinas.<sup>20</sup> Datos recientes indican que las células iNKT también pueden suprimir las células tumorales, ya sea por una actividad lítica dependiente de la secreción de interferón gamma o por la activación de los linfocitos T citotóxicos mediada por la secreción de interleucina-13.<sup>32</sup>

La disfunción de las células iNKT se ha visto correlacionada con el desarrollo de enfermedades autoinmunes mediadas por los linfocitos T, tanto en roedores como en humanos, como es el caso de la diabetes tipo I.<sup>25</sup> Adicionalmente, se ha observado que la activación o la transferencia de las células iNKT inhibe directamente el desarrollo de autoinmunidad en los modelos murinos de diabetes.<sup>33,34</sup>

### LAS CÉLULAS iNKT EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Hay un número muy limitado de estudios que analizan el comportamiento de las células iNKT durante la infección por el VIH.<sup>7,8,35</sup> La susceptibilidad potencial de las células iNKT a la infección por el VIH está sustentada por la expresión de las moléculas críticas para la entrada de este virus, como son el receptor CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4.<sup>8,36</sup>

Se ha demostrado que estas células pueden ser infectadas *in vitro* por el VIH utilizando varias fuentes de células iNKT, como por ejemplo linfocitos T Va24+ obtenidos a partir de los mononucleares de sangre periférica<sup>35</sup> y células iNKT clonadas de donantes sanos.<sup>36</sup> Aunque se ha observado que las células iNKT se infectan preferencialmente por los virus M trópicos (cepas que utilizan el correceptor CCR5), también son infectadas eficientemente por los virus T trópicos (que utilizan el CXCR4).<sup>8,35</sup>

Los estudios en sujetos infectados por el VIH han demostrado que en sangre periférica las células iNKT se encuentran disminuidas significativamente en comparación con sujetos no infectados.<sup>7,8</sup> Una investigación realizada en pacientes pediátricos VIH+ mostró una fuerte correlación de la pérdida de las células iNKT con una carga viral elevada y con la disminución en el recuento de linfocitos T CD4+.<sup>8</sup> Otro estudio

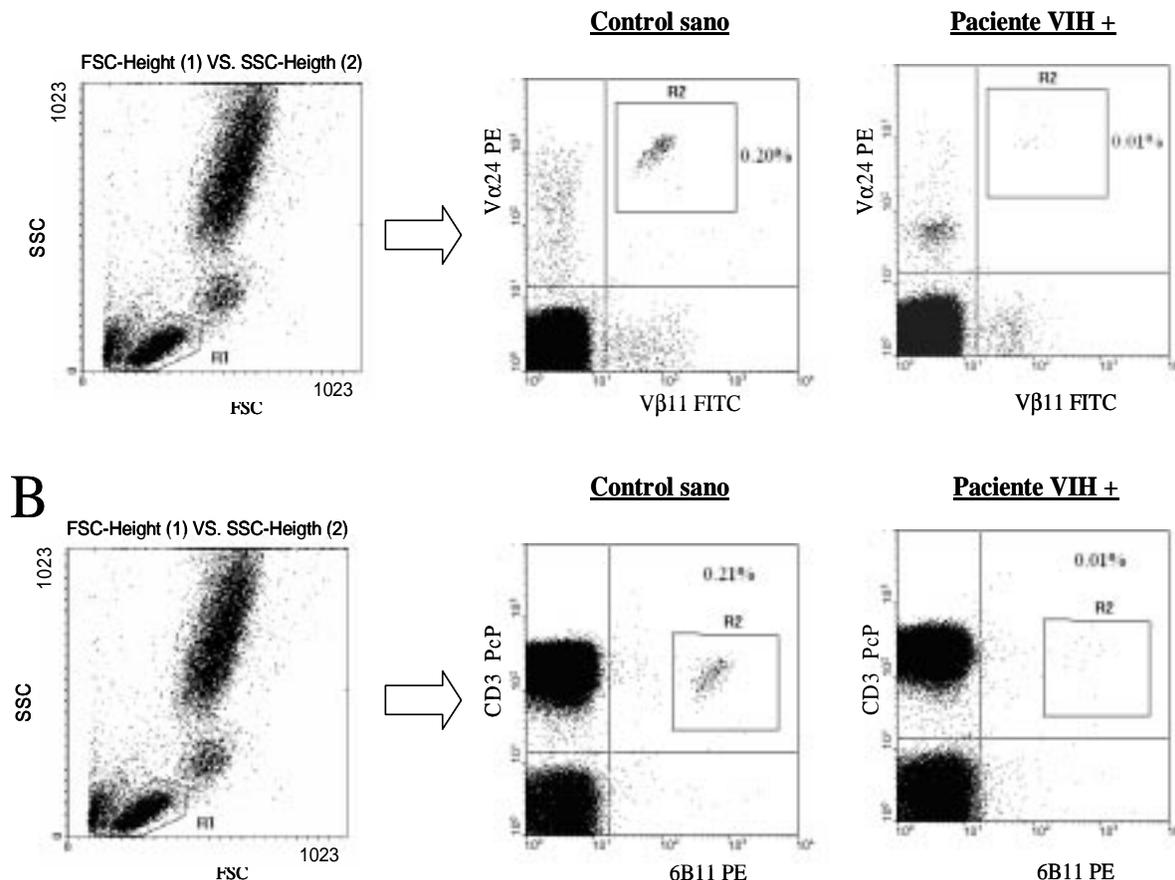
longitudinal, en el cual los individuos fueron evaluados antes de la seroconversión y 1 a 5 años después de ella, demostró que la mayor pérdida de las células iNKT tuvo lugar dentro del primer año pos seroconversión.<sup>7</sup> Actualmente se desconocen los mecanismos que llevan a la disminución de las células iNKT circulantes en sangre periférica; como en el caso de las células T CD4+, se propone la ocurrencia de varios fenómenos: infección directa por el VIH, inducción de apoptosis y cambios en el patrón de recirculación, con concentración de las células iNKT en los ganglios linfoides.

Aunque en los infectados por el VIH se ha documentado la disminución de las células iNKT circulantes (figura 2), hasta el momento no existen investigaciones acerca del impacto funcional de la infección por el VIH en las células iNKT, particularmente sobre la producción de citocinas

y la actividad lítica. Tampoco se ha evaluado si otras células infectadas por el VIH pueden ser blanco de la acción lítica mediada por las células iNKT CD8+, y no se conoce bien el impacto que la terapia antirretroviral tiene sobre el número y la función de las células iNKT. Finalmente, se desconoce porque algunos individuos VIH+ con muy bajos recuentos de células T CD4+ no sufren infecciones oportunistas, y si esta protección está mediada de alguna manera por las células iNKT.

Las alteraciones cuantitativas y cualitativas en las células iNKT podrían ser responsables de varias manifestaciones presentes durante la infección por el VIH. Dada su función en la regulación de la autoinmunidad, la pérdida de ellas podría contribuir a la presencia de procesos autoinmunes, claramente documentados durante esta infección. Además, la

Figura 2. Alteración cuantitativa de las células iNKT en los infectados por el VIH



Comparación del número de células iNKT en la sangre venosa periférica de controles normales y pacientes infectados por el VIH. La evaluación se realiza por citometría de flujo; para la tinción de las células en sangre total se pueden utilizar varias combinaciones de anticuerpos: **A.** Anticuerpos contra las dos cadenas del receptor antigénico, la invariante Va24 y la Vb11; **B.** Un anticuerpo contra el complejo CD3 y otro (denominado 6B11) específico para el asa CDR3 de la cadena Va24JaQ. El análisis se hace en una región que abarca los linfocitos (R1). En estas figuras representativas de un control normal y un paciente se puede observar que en los infectados por el VIH existe una disminución marcada de las células iNKT circulantes. Aún se desconoce si este fenómeno se debe a la lisis de las células iNKT infectadas o a la concentración de ellas en los sitios de alta actividad replicativa, como los ganglios linfáticos.

aparición de tumores y de infecciones oportunistas también podría ser en parte consecuencia de las anomalías de las células iNKT. Con el advenimiento de la terapia antirretroviral se han disminuido significativamente la morbilidad y mortalidad asociadas con las fases avanzadas de la infección por el VIH,<sup>37</sup> pero la disminución en la frecuencia de tumores ha sido menos notoria sugiriendo una menor recuperación de la inmunidad antitumoral comparada con la respuesta anti infecciosa.

Las células iNKT pueden ser críticas durante la infección por el VIH para coordinar las respuestas del sistema inmune innato y adaptativo. Así, se puede pensar que modulando las células iNKT se favorece la restauración de la respuesta inmune de los individuos infectados por el VIH, al activar una parte del sistema inmune que es necesaria para controlar no solo la replicación viral sino también los tumores e infecciones oportunistas asociadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

## PAPEL PROMISORIO DE LOS OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS CPG EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

### Oligodeoxinucleótidos con Motivos CpG

Los oligodeoxinucleótidos CpG son moléculas sintéticas que mimetizan el DNA bacteriano, el cual es rico en dinucleótidos CpG no metilados, en contraste con el DNA metilado de los vertebrados. Esta característica ha permitido que las células del sistema inmune innato desarrollen receptores para reconocer huéspedes extraños que expresan esta clase de material genético.<sup>38</sup> Varias clases de oligodeoxinucleótidos CpG, de acuerdo con diferencias en la secuencia y estructura, han mostrado efectos significativos sobre diversas células del sistema inmune. La primera clase, conocida como clase A, contiene un esqueleto fosfodiéster y estimula predominantemente las células NK y las células dendríticas plasmacitoides. Los oligodeoxinucleótidos CpG clase B tienen un esqueleto tipo fosforotioato y estimulan especialmente los linfocitos B. Todavía no es claro el papel fisiológico de los patrones diferenciales de activación inmune en respuesta a los diversos tipos de oligodeoxinucleótidos CpG, pero es posible que el DNA de los diferentes patógenos pueda contener una proporción variable de las secuencias clase A o B que lleven a diferentes tipos de respuesta inmune.<sup>39</sup>

Los efectos celulares de los oligodeoxinucleótidos CpG son mediados por la interacción específica con el

receptor tipo Toll-9 (TLR9).<sup>40</sup> Las células dendríticas plasmacitoides, que expresan TLR9, son activadas directamente por los oligodeoxinucleótidos CpG aumentando la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86 y CD54, y la secreción de citocinas como el interferón alfa.<sup>17,41,42</sup> Una vez activadas, las células dendríticas plasmacitoides tienen la capacidad de estimular las células dendríticas mieloides, las células NK e iNKT y los linfocitos T CD4+. Los linfocitos B son el otro grupo celular que expresa TLR9 y también son activados directamente por los oligodeoxinucleótidos CpG, fenómeno que incrementa la expresión de las moléculas CD80 y CD86, así como la secreción de inmunoglobulinas y citocinas (como la interleucina-10).<sup>43</sup>

Las células dendríticas mieloides no expresan TLR9 y aunque no son activadas directamente por los oligodeoxinucleótidos CpG, se sabe que estas moléculas estimulan indirectamente su maduración y activación.<sup>44,45</sup> La actividad inmunoestimuladora de los oligodeoxinucleótidos CpG sobre las células NK también parece ser indirecta, requiere de las células dendríticas plasmacitoides y de las citocinas interleucina-12, factor de necrosis tumoral alfa e interferón alfa. De igual manera, los monocitos y macrófagos no expresan TLR9 pero son activados indirectamente por los oligodeoxinucleótidos CpG incrementando la secreción de interleucina-6, factor de necrosis tumoral alfa y la expresión de CD40.<sup>46-48</sup>

Los oligodeoxinucleótidos CpG aumentan el procesamiento y la presentación antigénica, la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas. En consecuencia, favorecen las respuestas *in vivo* mediadas por los linfocitos T y promueven la diferenciación hacia una respuesta tipo Th1. Además, favorecen el desarrollo de la respuesta de las células T citotóxicas e inducen en ellas la capacidad de responder en una forma independiente de las células T CD4+.<sup>38,49</sup>

### Impacto de los Oligodeoxinucleótidos CpG sobre la Activación y Función de las Células iNKT

Así como en el caso de los efectos mediados por los oligodeoxinucleótidos CpG, también la activación *in vivo* de las células iNKT lleva rápidamente a la activación de los monocitos, las células NK y los linfocitos T y B. Muchas de las citocinas inducidas *in vivo* o *in vitro* en respuesta a los oligodeoxinucleótidos CpG son importantes activadores de las células iNKT por una vía independiente del receptor antigénico. Todas estas evidencias se traslapan y apuntan hacia una vía común

que comunica los oligodeoxinucleótidos CpG con las células iNKT. Sin embargo, a pesar de este paralelismo muy poco se conoce acerca del impacto de los oligodeoxinucleótidos CpG sobre la función de las células iNKT, pero parece razonable especular que las respuestas inmunes reguladas por las células iNKT y por los oligodeoxinucleótidos CpG se comparten en gran parte. La acción de los oligodeoxinucleótidos CpG sobre las células iNKT se evaluó en un modelo murino de fibrosarcoma diseminado, que demostró que los oligodeoxinucleótidos CpG tenían efectos anti metastásicos que eran dependientes de las células iNKT y eran indirectamente mediados por la producción de interferón alfa.<sup>50</sup> Actualmente se realizan estudios adicionales para definir *in vitro* e *in vivo* otros efectos de los oligodeoxinucleótidos CpG sobre las células iNKT, tanto en sujetos sanos como en individuos infectados por el VIH.

### Oligodeoxinucleótidos CpG en el desarrollo de vacunas contra el VIH

En modelos animales se ha evaluado la capacidad de los oligodeoxinucleótidos CpG para inducir respuestas inmunes innatas y adaptativas contra varios patógenos; el efecto más potente se ha observado cuando los animales reciben estas moléculas días antes del inóculo infeccioso.<sup>51,52</sup> También se ha evaluado extensamente su capacidad adyuvante, tanto en vacunas proteicas como de DNA. El efecto predominante de los oligodeoxinucleótidos CpG es la inducción de una respuesta tipo Th1, potenciando la respuesta inmune celular con la producción de interferón gamma y aumentando de la actividad citotóxica de los linfocitos T. Además, se ha demostrado que los oligodeoxinucleótidos CpG tienen capacidad de suministrar actividad adyuvante tanto en las vacunas administradas parenteralmente como por las mucosas.<sup>53</sup>

Los estudios más recientes en modelos animales se han enfocado en la capacidad de los oligodeoxinucleótidos CpG para actuar como adyuvantes cuando se administran conjuntamente con proteínas o péptidos del VIH. Se han realizado investigaciones combinando oligodeoxinucleótidos CpG con la proteína gp120 de la envoltura del VIH; los ratones inmunizados desarrollaron respuestas inmunes humorales y celulares específicas contra el VIH, incluyendo la producción de citocinas Th1 y la actividad de los linfocitos T citotóxicos. En este modelo, los ratones a los que se les eliminó las células T CD4+ también fueron capaces de montar una respuesta de células T CD8+ específica y efectiva contra el VIH, indicando que otras células con capacidad inmunorreguladora estaban controlando esta respuesta.<sup>54</sup> Esos resultados evidencian

que la adición de los oligodeoxinucleótidos CpG a los antígenos del VIH optimiza la respuesta inmune específica contra este virus, y soportan el uso de una combinación de oligodeoxinucleótidos CpG con virus completos muertos o péptidos en una vacuna contra el VIH.

### CONCLUSIONES

Las células iNKT constituyen un elemento crítico de la inmunidad innata para la regulación de la respuesta inmune adaptativa por medio de la producción de citocinas tipo Th1 y Th2. El papel de las células iNKT en la infección por el VIH es materia de estudio y representa claramente una vía novedosa de investigación. Los oligodeoxinucleótidos CpG inducen la producción de interferón alfa, citocina que se conoce como un potente activador de las células iNKT. Dado que las células iNKT y las células dendríticas mieloides aparentemente no expresan TLR9, mientras que si se encuentra en los linfocitos B y en las células dendríticas plasmacitoides, una hipótesis probable es que los oligodeoxinucleótidos CpG pueden activar las células iNKT indirectamente por medio de la activación de las células dendríticas plasmacitoides productoras de interferón alfa. Adicionalmente, es importante determinar si los oligodeoxinucleótidos CpG tienen el potencial de revertir, al menos en parte, la inmunodeficiencia inducida por el VIH tanto *in vitro* como *in vivo*, de manera que se pueda mejorar la respuesta inmune en los sujetos infectados.

Una estrategia terapéutica que no requiera de la actividad ayudadora de las células T CD4+, como el uso de un adyuvante tipo oligodeoxinucleótidos CpG, podría ser crucial para los pacientes infectados por VIH que ya tienen un deterioro cualitativo y cuantitativo significativo de las células CD4+. En esos pacientes, el uso de los oligodeoxinucleótidos CpG como adyuvante podría ser importante para potenciar la respuesta inmune y sería un complemento ideal para los efectos de restauración inmunológica y supresión viral observados con la terapia antirretroviral.

### REFERENCIAS

1. Cohen O, Weissman D, Fauci AS. The immunopathogenesis of HIV infection. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology* (ed 4th). Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers; 1999:1455-98
2. UNAIDS and WHO. AIDS epidemic update: December 2001. Geneva, Switzerland: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS); 2002

3. Battgay M. Critical issues of HIV treatment in the era of highly active antiretroviral therapy. *Expert Opin Invest Drugs*. 2001;2:175-83
4. Mitsuyasu RT. Immunotherapy. non-highly active antiretroviral therapy management of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis*. 2002;185(Suppl.2):S115-22
5. Dalgleish AG. The immune response to HIV: potential for immunotherapy? *Immunol Today*. 1995;16:356-8
6. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol today*. 2000;21:573-83
7. Van der Vliet HJ, von Blumberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, Van Benthem BH y col. Selective decrease in circulating V alpha 24+ V beta 11 + NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*. 2002;168:1490-5
8. Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, Fennelly G, Dobroszycki J, Palumbo P y col. Selective loss of innate CD4+ Va.24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2002;76:7528-34
9. Eberl G, Lees RK, Smiley ST, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR. Tissue- specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NKT cells. *J Immunol*. 1999;162:6410-9
10. MacDonald HR. Development and selection of NKT cells. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:250-4
11. Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:458-64
12. Emoto M, Zerrahn J, Miyamoto M, Perarnau B, Kaufmann SH. Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells. *Eur J Immunol*. 2000;30:2300-11
13. Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M y col. NKT cell are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol*. 1999;29:3768-81
14. Kim CH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood*. 2002;100:11-6
15. Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat. Immunol*. 2002;3:867-74
16. Sonoda KH, Stein-Streilein J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J Immunol*. 2002;32:848-57
17. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R y col. Toll- like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*. 2001;31:3026-37
18. Wilson SB, Byrne MC. Gene expression in NKT cells: defining a functionally distinct CD1d-restricted T cell subset. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:555-61
19. Takahashi T, Nieda M, Koezuka Y, Nicol A, Porcelli SA, Ishikawa Y y col. Analysis of human V alpha 24+ CD4+ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2000;164:4458-64
20. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ y col. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811
21. Pulendran B, Mataskovsky E, Banchereau J, Maliszewski CR. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol*. 2001;22:41-7
22. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y y col. 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;189:1121-8
23. Yang YF, Tomura M, Ono S, Hamaoka T, Fujiwara H. Requirement for IFN-gamma in IL-12 production induced by collaboration between v(alpha)14(+) NKT cells and antigen-presenting cells. *Int Immunol*. 2000;12:1669-75
24. Ikaishi Y, Mikami R, Bendelac A, Terme M, Chapul N, Terada M y col. Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon gamma production. *J Exp Med*. 2001;194:1179-86
25. Van der Vliet HJ, von Blumberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, Van Bodegraven AA y col. Circulating V(alpha)24(+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol*. 2001;100:144-8
26. Tanaka Y, Kami M, Ogawa S, Machida U, Takahashi T, Ichikawa M y col. Hyperacute graft-versus-host disease and NKT cells. *Am J Hematol*. 2000;63:60-1
27. Sonoda KH, Taniguchi M, Stein-Streilein J. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *J Immunol*. 2002;168:2028-34
28. Seino KI, Fukao K, Muramoto K, Yanagisawa K, Takada Y, Takada S y col. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2577-81
29. 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;195:625-36

30. Cul J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I y col. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*. 1997;278:1623-6
31. Smlyth MJ, Thia KY, Strel SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M y col. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med*. 2000;191:661-8
32. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD y col. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol*. 2000;1:515-20
33. Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira P A, Godfrey DI, Baxter AG. Alpha/beta- T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin- dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med*. 1998;187:104756
34. Hammond KJ, Godfrey DI. NKT cells. Potential targets for autoimmune disease therapy? *Tissue Antigens*. 2002;59:353-63
35. Motsinger A, Haas DW, Stanic AK. CD1d-restricted human natural killer T cell are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med*. 2002;195:869-75
36. Fleuridor R, Wilson B, Hou R, Landay A, Kessler H, Al-Harhi L. CD1d-restricted natural killer T cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection. *Immunology*. 2003;108:3-9
37. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA y col. Declining morbidity among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1998;338:853-60
38. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:709-60
39. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *J Immunol*. 2001;166:2372-7
40. Takeshita F, Leifer CA, Gursel K, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M y col. Role of Toll-like receptor 9 in CpG-DNA induced activation of human cells. *J Immunol*. 2001;167:3555-8
41. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9305-10
42. Krug A, Rothenfusser S, Homung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK y col. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001;31:2154-63
43. Decher T, Scheneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H y col. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in Chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000;95:999-1006
44. Askew D, Chu RS, Krieg AM, Harding CV. CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J Immunol*. 2000;165:6889-95
45. Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H y col. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166:5000-7
46. Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Kumbur U, Krieg AM, Heppner DG, Walsh DS. Whole blood cultures to assess the immunostimulatory activities of CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol Methods*. 2001;247:83-94
47. Takeshita S, Takeshita F, Haddad DE, Ishii KJ, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides induce murine macrophages to up-regulate chemokine mRNA expression. *Cell Immunol*. 2000;206: 101-6
48. Chace JH, Hooker NA, Mildenstein KL, Krieg AM, Cowdery JS. Bacterial DNA- induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Immunol Immunopathol*. 1997;84:185-93
49. Krieg AM. Now I know my CpGs. *Trends Microbiol*. 2001;9:249-52
50. Hafner M, Zawatzky R, Hirtreiter C, Buurman WA, Echtenacher B, Hentges T y col. Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type 1 IFN. *Can Res*. 2001;61:5523-8
51. Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol*. 1998;161:2428-34
52. Gramzinski RA, Doolan DL, Sedegah M, Davis HL, Krieg AM, Hoffman SL. Interleukin-12 and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun*. 2001;69:1643-9
53. Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol*. 2002;168:1659-63
54. Hornef AA, Datta SK, Takabayashi K, Belyakov IM, Hayashi T, Cinman N y col. Immunostimulatory DNA-based vaccines elicit multifaceted immune response against HIV at systemic and mucosal sites. *J Immunol*. 2001;167:1584-91