



Inmunología

www.elsevier.es/inmunologia



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 (iNKT) 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 iNKT. 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 iNKT. Four sub-populations of iNKT 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 tímicas, 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 afección 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 afección 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-ceramidas 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 las células NKTi en el contexto humano²⁰.

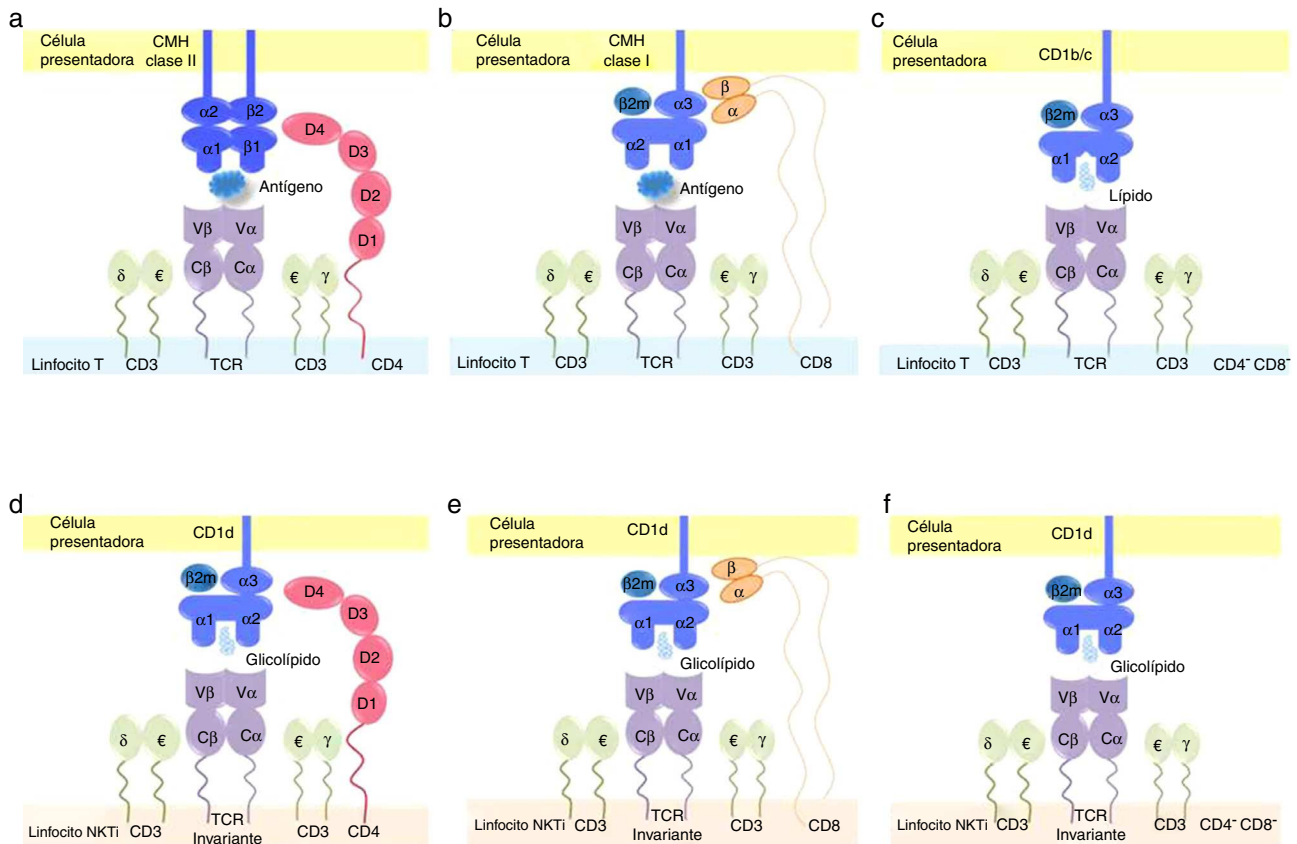


Figura 1 – Sinapsis inmunológica en los linfocitos T convencionales y en las células NKTi. Los linfocitos T convencionales, tanto CD4⁺ (a) como CD8⁺ (b), reconocen antígenos presentados por células especializadas a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y clase I, respectivamente, a través de su receptor de célula T (TCR por sus siglas en inglés). El correceptor CD4 interactúa con las regiones $\beta 1$ y $\beta 2$ del CMH clase II, mientras que CD8 lo hace con las regiones $\alpha 1$ y $\alpha 2$ 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 $\alpha 1$ y $\alpha 2$ 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 rearrreglo 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 rearrreglo de los segmentos que codifican $V\alpha 14$ y $J\alpha 18$ 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 PKC θ y NF κ B. 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 1](#)²⁵. 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 NK^{Ti} junto a linfocitos T convencionales CD4⁺ o CD8⁺, linfocitos NK o B, obtenidos de SP de donantes sanos, se observó que las células NK^{Ti} 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 NK^{Ti} 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 NK^{Ti} CD8^β⁺ mostraron una mayor capacidad para inducir la expresión de CD25 en linfocitos T CD8⁺ convencionales. Esta capacidad cooperadora de las células NK^{Ti} con otros linfocitos se asocia con su habilidad para producir diferentes citoquinas, mostrando los linfocitos NK^{Ti} CD4⁺ habilidad para secretar tanto IFN- γ como IL-4, mientras que los CD8⁺ y DN producen casi exclusivamente IFN- γ ³⁸. Este estudio, sin embargo, no analizó la subpoblación de células NK^{Ti} CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, aunque presumimos que se incluye dentro de las células DN (CD4⁻/CD8 β ⁻). Se ha observado adicionalmente que las células NK^{Ti} CD8 $\alpha\beta$ ⁺ exhiben un fenotipo Th1 y actividad citotóxica, al igual que las células NK^{Ti} DN, y tienen una mayor capacidad de eliminar células tumorales en relación a las células NK^{Ti} CD4⁺ o DN³⁹. Por su parte, las células NK^{Ti} DN han mostrado habilidad para secretar IL-17 tras la estimulación con PMA/ionomicina o α GalCer y la exposición a células HeLa transfectadas con CD1d⁴⁰.

En otro estudio, en el cual se intenta caracterizar las subpoblaciones de las células NK^{Ti} CD4⁺ o DN (no se caracteriza la subpoblación de estas células que expresa CD8), las células NK^{Ti} DN (CD4⁻/CD8 β ⁻) 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 NK^{Ti} 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 α GalCer acortando sus residuos de esfingosina, las células NK^{Ti} 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 NK^{Ti} DN producen mayor cantidad de perforina comparadas con las CD4⁺ al activarse con α GalCer, 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 NK^{Ti} CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, 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 NK^{Ti} 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 NK^{Ti} CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, 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 NK^{Ti} y su diferenciación a células CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, CD4⁻/CD8 $\alpha\beta$ ⁺ y CD4⁻/CD8⁻.

Linfocitos NK^{Ti}: una posible herramienta terapéutica en humanos

Algunos fenómenos autoinmunes parecen tener una marcada influencia en el número de células NK^{Ti} circulantes en humanos. Se ha reportado, por ejemplo, una marcada disminución en el número absoluto de células NK^{Ti} 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 NK^{Ti} 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 NK^{Ti} 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 NK^{Ti} 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 NK^{Ti} 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 NK^{Ti} 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 α GalCer) 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 infundiéndose células pulsadas con glucolípidos para inducir la activación de las células NK^{Ti} de una manera más efectiva. Uno de los primeros estudios clínicos de fase I publicados se

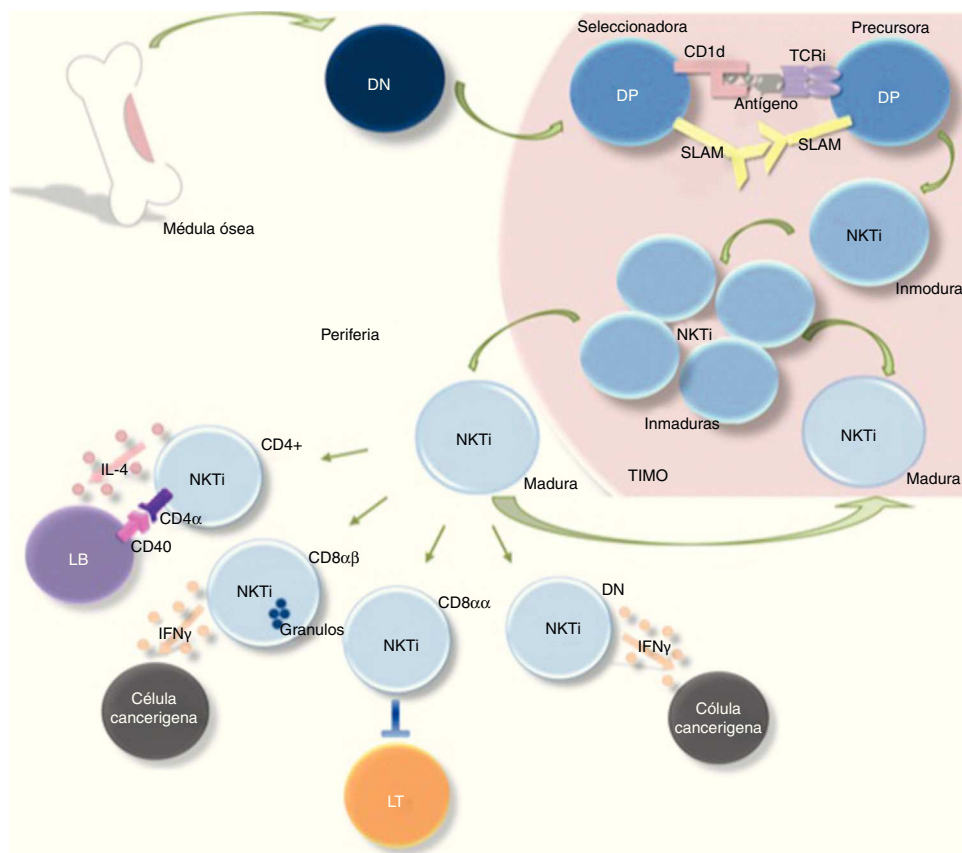


Figura 2 – Proceso de selección y maduración de los linfocitos NKTi. Una célula doble negativa (DN) proveniente de la médula ósea pasa al timo para su diferenciación en célula precursora de linfocitos doble positiva (DP). Su selección ocurre por la interacción de una célula seleccionadora (presentadora 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⁺, CD8αβ, CD8αα 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-γ 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-γ 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-γ, 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 NK Ti , 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 NK Ti 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 NK Ti 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 las células NK Ti , la señala como un blanco de investigación en el entendimiento de la relación de las células NK Ti 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 NK Ti en la periferia, ya que, como se mencionó anteriormente, tanto α -GalCer como KRN7000 son moléculas no fisiológicas.

El estudio de la función de las células NK Ti 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 NK Ti CD4 $^{+}$, la regulación de la proliferación de linfocitos T activados por las células NK Ti CD8 $\alpha\alpha^{+}$ y la actividad citotóxica contra células tumorales asociada a las células NK Ti 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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*. 1995;268:863-5.
6. Brigl M, Brenner M. CD1: Antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:817-908.
7. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Taura 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.
8. Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. α -galactosylceramide: Potential immunomodulatory activity and future application. *Curr Med Chem*. 2004;11:241-52.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, et al. Genetic evidence supporting selection of the α 14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity*. 2005;22:705-16.
13. Yassai M, Cooley B, Gorski J. Developmental dynamics of post-selection thymic DN iNKT. *PLoS One*. 2012;7:e43509.
14. 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.
15. Bendelac A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med*. 1995;182:2091-6.
16. 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.
17. 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, Kyprisoudis 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 24 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(-)CD8alphaalpha 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, Sibilia 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. α-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 Valpha24+Vbeta11+ 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.