

CÉLULAS CITOTÓXICAS Y MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD

Julio César Bueno, Angela P. Cadavid
Universidad de Antioquia

Abreviaturas usadas en este capítulo

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	ITIM: Motivo de inhibición del inmunorreceptor vía tirosina
APAF: Factor 1 activador de proteasas apoptóticas	kDa: Kilo dalton
CAD: Deoxirribonucleasa activada por caspasas	KIR: Receptores de células NK similares a inmunoglobulina
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad	LAK: Células asesinas activadas por linfoquinas
CMV: Citomegalovirus	LFA: Antígeno asociado a la función leucocitaria
CRD: Dominios de unión a carbohidratos dependientes de calcio	LIF: Factor inhibidor de leucemias
CSF: Factor estimulador de colonias	LRC: Conjunto de receptores de leucocitos
CTL: Linfocitos T citotóxicos	NFκB: Factor nuclear de kappa B
FADD: Dominio proteico de muerte asociado a FAS	NK: Asesinas naturales
GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos	Pre-CTL: Linfocito T precitotóxico
ICAM: Molécula de adhesión intercelular	TAP: Proteína transportadora de péptidos
IFN: Interferón	TGF: Factor transformante del crecimiento
IL: Interleuquina	TNF: Factor de necrosis tumoral
	TNF-R: Receptor del factor de necrosis tumoral
	SHP: Fosfatasa de dominios SH

INTRODUCCIÓN a.

Las infecciones producidas por virus lo mismo que las desencadenadas por bacterias y parásitos intracelulares no pueden ser controladas adecuadamente por las moléculas efectoras de la inmunidad humoral ya que éstas no tienen acceso al interior de las células; además, estos patógenos pueden evadir diferentes aspectos de la respuesta inmune y proliferar en el interior de las células fagocíticas. Por lo tanto, se requieren mecanismos efectores adicionales que permitan la eliminación de las células infectadas y es aquí donde entra a participar la citotoxicidad dependiente del contacto entre células. De igual forma, durante la respuesta inmune contra células tumorales y durante el rechazo de injertos alogénicos participa este mecanismo de citotoxicidad.

En este capítulo se presentarán los aspectos más importantes acerca de la estructura y función de las células citotóxicas, los mecanismos que utilizan para eliminar a las células blanco y se hará mención acerca de algunos modelos en los que estas células tienen una participación importante.

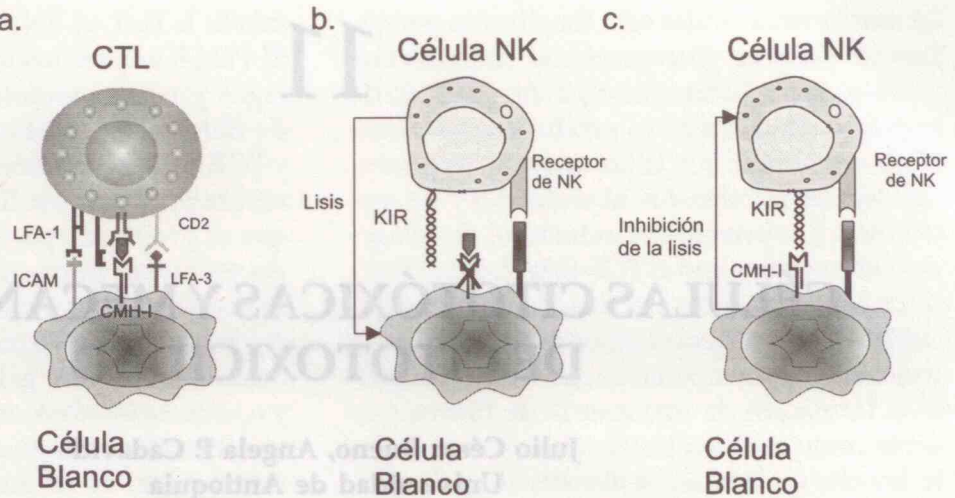


Figura 1. Reconocimiento del antígeno por las células citotóxicas e interacción con la célula blanco.

- Los CTL, a través del complejo TCR-CD3, reconocen el péptido específico unido a la molécula del CMH-I en la célula blanco; esta unión es estabilizada por el CD8 y otras moléculas coestimuladoras como el CD2 y el LFA-1 que se unen a sus ligandos LFA-3 e ICAM-I en la célula blanco.
- Las células NK, por medio de receptores todavía no muy bien caracterizados, reconocen moléculas en células blanco que no expresan el CMH-I, iniciando su actividad citotóxica.
- Cuando las células blanco expresan el CMH-I, éste es reconocido por el receptor KIR y se inhibe la vía de señalización dependiente de tirosina-quinasa por la activación de fosfatasa como la SHP-1.

CÉLULAS CITOTÓXICAS

Las principales células citotóxicas del sistema inmune son los CTL y las células NK. La función de estas células es complementaria en la defensa contra las infecciones porque mientras los CTL lisan células que presentan el péptido específico en el contexto del CMH clase I, las células NK reconocen células que no expresan el CMH-I, de tal suerte que células tumorales o aquellas que tienen alterado este complejo, como consecuencia de una infección viral, pueden ser lisadas por las células NK. Esto implica que cuando las células NK reconocen

el CMH-I específico en las células blanco se bloquea su maquinaria citotóxica (Figura 1). Tanto los CTL como las células NK tienen mecanismos efectores comunes: exocitosis de los gránulos y la vía mediada por FAS que llevan finalmente a la apoptosis de la célula blanco. Otro mecanismo efector de estas células es la producción de citoquinas como el TNF y el IFN- γ que tienen acción citotóxica cuando son secretadas en la vecindad de las células blanco.

Linfocitos T citotóxicos: linfocitos efectores de la inmunidad adaptativa

Los CTL son células efectoras que juegan un papel preponderante en la respuesta contra células infectadas con virus u otros patógenos intracelulares, en la eliminación de células tumorales y en el rechazo de injertos. La mayoría de los CTL expresan la molécula CD8 y específicamente reconocen péptidos derivados de antígenos degradados en el citoplasma y luego expresados en la superficie celular asociados con moléculas del CMH-I propias. Sin embargo, un 10% de las células citotóxicas son CD4+ y reconocen péptidos asociados con moléculas del CMH clase-II. Cuando se mencione en este capítulo los CTL nos referiremos a los CTL-CD8+, a menos que se especifique que son CTL-CD4+.

La respuesta citotóxica de las células T requiere un primer paso de activación y diferenciación de los pre-CTL en CTL funcionales, y un segundo paso que incluye el reconocimiento del antígeno en la célula blanco, la unión con ésta y el inicio de una serie de eventos que llevan a la destrucción de dicha célula.

Los pre-CTL se encuentran en baja frecuencia en sangre periférica y tejidos linfoides periféricos; cuando salen del timo no están completamente diferenciados y aunque tienen especifi-

cidad para un antígeno determinado son funcionalmente inmaduros. Para la generación de CTL completamente funcionales se requieren al menos dos señales: 1) el reconocimiento del antígeno específico en la célula blanco unido al CMH-I y 2) una segunda señal, que dependiendo de la naturaleza de la célula que esté expresando el antígeno, puede ser la interacción de las moléculas coestimuladoras CD28/B7 si es una célula presentadora de antígeno profesional o citoquinas provenientes de los linfocitos T ayudadores si es otra célula del organismo.

Los CTL funcionales se unen a la célula blanco por la interacción del TCR con la molécula del CMH-I que contiene el péptido específico, esta unión es estabilizada por el CD8 y por otras moléculas coestimuladoras como CD2 y LFA-1 que se unen a sus ligandos en la célula blanco LFA-3 e ICAM-1, respectivamente. Después que se forma el complejo de la célula efectora con la célula blanco, se activan los mecanismos líticos que se explicarán más adelante en este capítulo.

Células Asesinas Naturales: linfocitos efectores de la inmunidad innata

En la década de los años 70 se describió una población de linfocitos que, de manera similar a las células T citotóxicas, tenía la capacidad de lisar tumores pero, a diferencia de éstas, no requerían de una sensibilización o una estimulación previa, fenómeno que se denominó reactividad citotóxica natural. Su nombre actual, células NK, fue acuñado en 1977 y en su caracterización se encontró que presentaban marcadores de la línea linfocitaria como el Thy-1; por esto, se consideró que tanto las células NK como los linfocitos T provenían de un precursor común. En las décadas de los 80 y los 90 se identificaron otras células blanco sensibles a la acción citotóxica de las células NK, como las

células alogénicas y las células infectadas por patógenos intracelulares, lo que llevó a postular su participación en el contexto de la inmunidad innata durante los estadios iniciales de las infecciones por *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y a los virus de la familia herpesviridae entre otros.

En los humanos, la tipificación de las células NK se inició en los años 80's con base en la capacidad citotóxica natural descrita para el modelo murino y en una morfología particular de linfocitos granulares grandes. En esta morfología se describían abundantes gránulos azurófilos en el citoplasma, núcleo en forma de riñón y un diámetro que oscilaba entre los 12 y 15 μm . Estas células se caracterizan morfológicamente por la presencia de lisozimas, granzimas y perforinas en los gránulos azurófilos intracitoplasmáticos, los cuales son liberadas al entrar en contacto con la célula blanco. Si bien en su ontogenia provienen de un precursor común con las células B y T (cuyo marcador es el CD45), se ha demostrado que tanto en los ratones atímicos como en los ratones que no expresan el gen rag-1 (los que a su vez son deficientes de linfocitos B y T) la presencia de las células NK no se encuentra afectada.

Células NK y linfocitos T citotóxicos: la delgada línea roja

Ha sido difícil definir un marcador específico de las células NK, pues muchas de las moléculas expresadas en estas células también se encuentran en los linfocitos T; por eso, para su definición se tiene en cuenta la ausencia del receptor de la célula T, TCR, aunado a la característica que se describió inicialmente de reactividad citotóxica natural. Aunque en un principio se planteó que las células NK no expresaban el complejo proteico del CD3 propio de los linfocitos T, más adelante se encontró que

expresaban la cadena ζ del CD3 en la membrana, haciendo aun más difícil la caracterización particular de los dos tipos de linfocitos.

En el humano, entre 20 y 40% de las células NK provenientes de sangre periférica expresan el marcador CD8 de los linfocitos T citotóxicos. Este marcador está constituido por las cadenas α y β en los linfocitos T mientras que las células NK sólo expresan las cadenas α . Por esto, la delimitación de ambas poblaciones ha sido principalmente funcional, pues mientras los linfocitos T citotóxicos necesitan de la expresión de moléculas del CMH en las células blanco para que se hagan efectivos los mecanismos citotóxicos, las células NK son dependientes del reconocimiento de las moléculas del CMH-I para regular negativamente su actividad citotóxica. Además, para las células NK no es indispensable la diferenciación tímica como sí sucede con los linfocitos T: en ratones atímicos por ejemplo, cuya citotoxicidad dependiente de linfocitos T es mínima, los porcentajes de citotoxicidad endógena (o natural) son similares a los encontrados en los ratones inmunocompetentes. Estos antecedentes sustentan la necesidad, aún vigente, de una caracterización molecular más precisa de las células NK, particularmente en función de su actividad citotóxica endógena y del reconocimiento de potenciales células blanco.

Marcadores de las células NK

Para la caracterización de las células NK humanas se ha usado la coexpresión de los marcadores CD56 (molécula de adhesión celular neural 1) y el CD16 (Fc γ RIII), ambos marcadores distintivos de estas células con respecto a los demás linfocitos. De acuerdo a la intensidad de fluorescencia y a la expresión de estos marcadores se encuentran dos tipos de células NK: CD56^{dim+} (fluorescencia moderada) CD16+, correspondiente al 90% del total de

las células NK existentes en sangre periférica y CD56^{bright+} (fluorescencia intensa) CD16-, que constituyen el 10% restante. La expresión del CD16 en las células NK tiene importancia pues éste es un receptor para la IgG, por el cual las células NK pueden reconocer y lisar otras células que tienen anticuerpos unidos a sus membranas.

Localización de las células NK

Las células NK son abundantes en ciertas mucosas y en el intersticio de los capilares pulmonares, mientras que su número es más reducido en los nódulos linfáticos; también han sido identificadas en el tracto gastrointestinal, en el hígado, en el bazo y en sangre periférica en donde corresponden a un 5-15% de los linfocitos circulantes (frecuencia similar a la del bazo). Existen precursores de las células NK en médula ósea y en el timo pero están prácticamente ausentes en los vasos linfáticos y en los ganglios. En el hígado hay predominio particular de una subpoblación de linfocitos, las células NKT, la cual presenta una maquinaria citolítica común a las células NK y a los linfocitos T (como son los gránulos que contienen perforinas o granzimas), pero que además pueden reconocer la molécula presentadora de antígenos no clásica CD1d. Se ha postulado que las células NKT participan, al igual que las células NK, en el contexto de la inmunidad innata para el control de las infecciones virales, en la capacidad antitumoral y en la activación de otros mecanismos efectores mediante la producción de citoquinas como el IFN- γ . El sitio que característicamente tiene una alta concentración de células NK es la decidua materna; esta subpoblación es mayoritaria respecto a otras células provenientes del sistema inmune, posiblemente por la acción de factores quimiotácticos de origen placentario o endometrial que inducen el reclutamiento de células NK hacia este tejido.

Funciones citotóxicas de las células NK

Las células NK fueron reconocidas en un principio como leucocitos que hacían parte de la inmunidad innata, es decir, que tan sólo lisaban las células blanco sin ninguna especificidad. Se pensaba entonces que su capacidad citolítica era independiente del reconocimiento en el contexto del CMH y por lo tanto, su acción estaba dirigida en contra de múltiples células blanco, entre éstas las de origen tumoral y aquellas infectadas por virus. Se conocía también que la citotoxicidad de estas células era dependiente de anticuerpos gracias a la expresión en su superficie de receptores para la fracción Fc de la IgG, lo que permite a su vez el reconocimiento de anticuerpos adheridos a las células blanco. Este tipo de citotoxicidad que se conoce como ADCC se ha observado sólo en las células NK, más no en los linfocitos T citotóxicos. En modelos de experimentación *in vitro* se caracterizó otro mecanismo de citotoxicidad llamado lisis redirigida, mediante el cual se reconocen células blanco tumorales de origen linfoide, que también expresan receptores para la fracción Fc. Al unirse los anticuerpos a la célula blanco por el Fc, el Fab de los mismos reconoce un ligando aun no bien caracterizado que se expresa en las células NK y activa los mecanismos de citotoxicidad (Figura 2).

Como no todos los blancos posibles de las células NK inducían la activación de la respuesta citotóxica se comenzó a reconsiderar el concepto de lisis inespecífica inherente a estos linfocitos. La actividad citotóxica y la interacción con las diferentes células blanco son elementos centrales de la hipótesis del reconocimiento de ausencia de lo propio, «missing self», propuesta por Klass Kärre en 1981. Kärre sustentó que la citotoxicidad de las células NK era regulada negativamente por la expresión de moléculas propias en las células blanco sensibles, y más adelante, este evento se correlacionó con

la disminución en la expresión de las moléculas del CMH-I en las líneas tumorales susceptibles a la lisis y la resistencia híbrida en los modelos murinos de trasplantes de médula ósea. Múltiples experimentos demostraron que las moléculas del CMH-I inhibían la lisis de las células NK y cómo estas células reconocían la ausencia de lo propio: cuando una clona de células NK estimulada con IL-2 entraba en contacto con células de la línea 721.221, las cuales no expresan moléculas del CMH-I, se observaba un porcentaje mayor de citotoxicidad endógena. Sin embargo, si se transferían genes de moléculas del CMH-I a estas células susceptibles la lisis se inhibía. De otro lado, si se bloquea la interacción de las células blanco con un anticuerpo monoclonal que reconoce las moléculas del CMH-I, la actividad lítica de las células NK se recupera casi a los niveles normales (Figura 1).

Para explicar la resistencia híbrida en los trasplantes, Kärre demostró que, al transplantar células de linfoma o células de médula ósea que expresaban la molécula del CMH-I H-2^{b/b} de un ratón donante a un ratón receptor que expresaba los alelos H-2^{a/b}, se inducía finalmente un rechazo ya que estos injertos no expresaban al menos uno de los alelos del receptor. De este

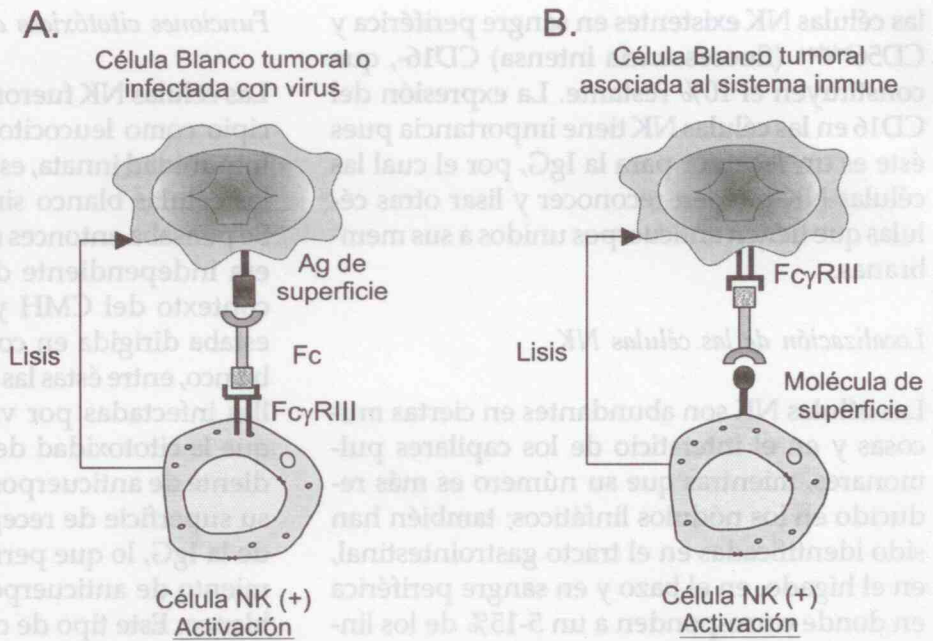


Figura 2. Otros Mecanismos citotóxicos de las células NK.

- a) **ADCC:** los antígenos de superficie presentes en las células blanco son reconocidos por anticuerpos del tipo IgG1. Mediante la unión del receptor FcγRIII a la fracción cristalizante de la IgG1 se activan los mecanismos de citotoxicidad de las células NK dependientes de señales intracelulares en las que participan proteínas tirosina quinasa.
- b) **Lisis redirigida:** Si las células blanco provienen de tumores asociados al sistema inmune, éstas pueden expresar receptores del tipo FcγRIII y unir inmunoglobulinas por la fracción cristalizante. El Fab de estos anticuerpos es capaz de reconocer moléculas de la superficie de las células NK e iniciar la actividad citotóxica.

modo, la hipótesis "missing self" postula que una expresión reducida de productos del CMH-I permitiría el rechazo a aloinjertos mediado por las células NK, y a la inversa, un aumento en la expresión de estas moléculas en la superficie de las células blanco (como lo inducen el IFN-γ y algunos factores estimulantes de colonias como la IL-3) bloquearían estos mecanismos de lisis.

Mecanismos moleculares de regulación citotóxica en las células NK

En la última década se han caracterizado diferentes receptores para las moléculas del CMH-

Expresados por las células NK, entre los que se encuentran: a) los receptores de la familia de las inmunoglobulinas, llamados receptores KIR, algunos de ellos con función de inhibición y otros con función activadora y b) los receptores tipo lectina. La unión a los KIR inhibidores induce una serie de señales negativas que inhiben la actividad citotóxica de las células NK; se ha demostrado que muchas de las moléculas del CMH-I tienen afinidad por estos receptores. De otro lado, los receptores tipo lectina son dependientes de calcio y algunos como el NKR1P1 son capaces de iniciar cascadas de señalización que inducen la actividad citotóxica. Debido a que estos receptores son codificados por genes que se expresan primariamente en las células NK, esta región genética ha sido denominada complejo NK, cuyos genes presentan un 70% de homología entre sí y se encuentra en el cromosoma 12 de los humanos y en el cromosoma 6 de los roedores. El complejo genético NK incluye los receptores tipo lectina Ly-49 en roedores, el NKR1P1 en roedores y en humanos, el NKG2 en humanos y ratas y el CD94 en humanos.

De los receptores tipo lectina, el NKR1P1 se expresa como un homodímero que une azúcares, principalmente ricos en manosa. Se identificaron inicialmente en las células NK de rata y luego en el ratón a partir de genes homólogos correspondientes al marcador NK1.1 (NKR1P1C). Estos receptores se han descrito en las células NK y en una subpoblación de linfocitos T y su activación inicia la cascada de señalización del inositol trifosfato y la subsecuente movilización de iones de calcio. En el ratón, se han caracterizado dos funciones importantes para los receptores tipo lectina: la primera es que pueden inducir la mayoría de las señales efectivas para la producción del IFN- γ en células NK activadas con IL-2, y la segunda es que al parecer están involucrados en la regulación de la proliferación de las células NK.

La familia de receptores Ly-49 consiste por lo menos de 9 moléculas estructuralmente relacionadas en el ratón y 4 moléculas en la rata, de las cuales Ly-49A y Ly-49C se han caracterizado como receptores inhibitorios específicos en NK para moléculas del CMH-I, presentes solamente en los murinos. Los Ly-49 son proteínas transmembrana tipo II que contienen dominios de unión a carbohidratos dependientes de calcio codificados por 3 exones y que comparten esta característica con otros receptores de las células NK como el CD94, el NKR1P1 y el NKG2. Los análisis cristalográficos del Ly-49 muestran que estos receptores presentan dominios citoplásmicos, transmembrana, tallo ("stalk") y CRD y al parecer inhiben las funciones efectoras de estos linfocitos mediante el reconocimiento de los carbohidratos presentes en las moléculas del CMH-I. La eliminación o el bloqueo de los carbohidratos de la célula blanco interrumpe la interacción con las moléculas del CMH-I, lo cual limita parcialmente la inhibición de la actividad citotóxica de las células NK.

Las células NK humanas no expresan receptores Ly-49 pero funciones similares son mediadas por receptores tipo KIR, los cuales no son codificados en el complejo genético NK del cromosoma 12p13 sino en el conjunto de LRC en el cromosoma 19. Ambos tipos de receptores comparten la característica de presentar motivos ITIM, a los cuales se asocia la tirosina fosfatasa citoplásmica SHP-1, lo cual se asocia con la inhibición de las acciones efectoras de las células NK. Un análisis del dominio intracitoplásmico muestra la secuencia de aminoácidos VxYxxV, un motivo ITIM putativo para la unión de SHP-1 y 2, las cuales pertenecen a la familia de las proteínas tirosina fosfatasas citoplásmicas, las cuales pueden desactivar muchas de las proteínas fosforiladas que participan en las cascadas de señalización.

De otro lado, un fenómeno importante para las células NK es el hecho que los receptores tipo lectina como el CD94 formen heterodímeros con moléculas NKG2, pues en los humanos el receptor CD94 carece de residuos cargados negativamente en su dominio transmembranal y presenta una cola intracitoplasmática corta, sin dominios identificables. Al parecer es necesaria la formación del complejo CD94/NKG2 en la membrana plasmática. Los receptores humanos NKG2A y la variante generada por el procesamiento alternativo del RNAm, el NKG2B, presenta dominios tipo ITIM que indican su función inhibitoria, mientras que los NKG2C y E no presentan ITIM lo que permite pensar que participan en la activación de las células NK. De esta manera, se ha evidenciado que las colas intracitoplasmáticas de los receptores NKG2A y B inhiben la función citotóxica de las células NK por medio del reclutamiento de la fosfatasa SHP-1, mientras que el receptor NKG2C se asocia con la proteína adaptadora DAP-12 para inducir las cascadas de señalización intracelular dependientes de proteínas tirosina quinasas.

El heterodímero CD94/NKG2 sólo reconoce una molécula del CMH-I no clásica llamada HLA-E, la cual es codificada por un alelo de polimorfismo limitado si se compara con otros alelos de las moléculas CMH-I clásicas tipo A, B o C. Los transcriptos del HLA-E se expresan en una variedad de células humanas, pero para su expresión en la membrana plasmática requieren de la unión a un péptido, el cual se deriva de secuencias líder selectas provenientes de moléculas del CMH clásicas y no clásicas. Como se verá más adelante, la inducción de este tipo de regulación de las células NK por parte de algunos virus se constituye en un mecanismo de evasión de la respuesta citotóxica contra los patógenos intracelulares y en otros contextos un elemento constitutivo de la tolerancia inmunológica. Si bien los receptores NKG2

presentan patrones de reconocimiento similares en roedores y en humanos, los papeles fisiológicos de éstos en la biología de las células NK son aún inciertos, por lo que se ha especulado que hacen parte de un sistema redundante de receptores para el reconocimiento de lo propio/nopropio fuera de los ya reconocidos Ly-49 en los murinos y los KIR en los humanos.

El locus genético de las moléculas KIR presenta una gran diversidad, lo cual se debe a un polimorfismo tanto poligénico como multialélico. Se han identificado cerca de 14 genes KIR que se expresan en células inmunes, los cuales se clasifican de acuerdo al número de dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (2D o 3D) y a las características de la cola citoplasmática. También se conocen según la nomenclatura del sistema CD como CD158a, CD158b, CD158c, etc. Independiente del número de dominios de inmunoglobulina que posean, los KIR tienen dominios intracitoplasmáticos largos o cortos. Los KIR con dominios citoplasmáticos largos tienen la actividad inhibitoria gracias a los dominios ITIM presentes en sus dominios citoplasmáticos; por su parte, los KIR de cola citoplasmática corta pueden transmitir señales de activación a las células gracias a la interacción con la molécula adaptadora conocida como proteína asociada a receptores activadores de células asesinas (KARAP), la cual contiene dominios ITAM. Los LILR tienen dos o cuatro dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y una cola intracitoplasmática corta o larga. Las colas citoplasmáticas largas contienen hasta cuatro dominios ITIM y por lo tanto pueden inhibir la actividad celular.

Producción e interacción con citoquinas por las células NK

En el contexto de la inmunidad innata frente a las infecciones, las células NK tienen la capaci-

dad de secretar citoquinas que promueven la respuesta citotóxica, la activación de macrófagos, linfocitos B y la hematopoyesis. Con un estímulo adecuado producen grandes concentraciones de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ y de los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas como la IL-3, el CSF-1 y el GM-CSF. En este sentido, se ha propuesto que estas células pudieran presentar diferentes patrones de secreción de citoquinas, algo semejante a lo descrito para los linfocitos T y de acuerdo a esto clasificarlas como NK1 o NK2. Las evidencias encontradas señalan que las células NK humanas cultivadas en presencia de IL-12 secretan principalmente TNF- α , IL-10, GM-CSF e IFN- γ (patrón NK1), mientras que aquellas cultivadas en medio suplementado con IL-4 secretan cantidades mucho mayores de IL-5 e IL-13, niveles menores de IFN- γ y concentraciones similares de TNF- α , GM-CSF e IL-10 (patrón NK2).

La IL-2 por su parte puede inducir la diferenciación de las células NK a células LAK, al parecer con una actividad citotóxica independiente de la regulación mediada por moléculas del CMH-I y con una proliferación celular significativa. El fenotipo de las células LAK se caracteriza por su adherencia al plástico, una actividad citotóxica mayor que la observada en las células NK, un aumento en el tamaño (15 μ m) y más cantidad de gránulos intracitoplasmáticos que contienen granzimas y perforinas comparado con el de la célula precursora. Sin embargo, la capacidad citotóxica de las células LAK murinas disminuye luego de 3 días de cultivo bajo el estímulo de la IL-2 y se hacen manifiestos cambios morfológicos como el aumento del volumen celular e inclusiones intracitoplasmáticas de glicógeno y gotas lipídicas. También, se ha descrito una disminución del porcentaje de células en fase S y una disminución en su interacción con las células blanco. Estos hallazgos morfológicos son similares a los encontrados en los diferentes estadios de

diferenciación de las células NK uterinas, las cuales se encuentran bajo el influjo de la IL-15, una citoquina funcionalmente similar a la IL-2. La subpoblación de células NK uterinas disminuye su capacidad citotóxica a medida que transcurre la gestación; sin embargo, no se conoce si este efecto es debido a la acción continua de la IL-15 secretada en el microambiente uterino (de manera análoga a lo que ocurre con las células LAK luego de varios días de cultivo con IL-2) o si otros factores tisulares u hormonales median en esta diferenciación funcional. Además, la subpoblación de células NK CD56^{bright+}/CD16⁻, las cuales son los linfocitos predominantes en el endometrio humano, es considerada una fuente primaria de citoquinas inmunoreguladoras que participan en el contexto de la inmunidad innata. La producción de citoquinas por parte de esta subpoblación es mayor si se compara con las células NK CD56^{dim+}/CD16⁻, las cuales presentan característicamente una mayor actividad citotóxica que la subpoblación CD56^{bright+}. Estas evidencias permiten sugerir una redefinición del carácter de las células NK como simples efectoras citolíticas: la capacidad de producir citoquinas puede considerarse igual de importante en el medio ambiente tisular participando, posiblemente, en diversos eventos fisiológicos.

Efectos de la IL-15 sobre las células NK

La IL-15 es una citoquina con una estructura proteica de 4 hélices α que participa en la diferenciación, proliferación y activación de las células NK. El papel relevante de esta citoquina en la ontogenia de las células NK se evidenció en ratones "knock-out" para la cadena γ común del receptor de la IL-2, la cual es también compartida por el receptor de la IL-15. Además de la cadena γ común, ambos receptores expresan la subunidad β mientras que la subunidad α es específica para cada una de las citoquinas; de este modo, la subunidad α de la

IL-15 sumada a la β y la γ del receptor de la IL-2 conformaría un receptor de alta afinidad para la IL-15. Al bloquear la acción de la IL-15 con un anticuerpo específico contra la cadena α del receptor se observa que ésta es necesaria para el proceso de diferenciación de las células NK a partir de precursores provenientes de médula ósea. La IL-15 promueve entonces la diferenciación de las células NK murinas a partir de timocitos y de células progenitoras bipotenciales NK/T, siendo 4 veces más potente que la IL-2 para la producción de células NK funcionales.

La activación de las células NK por la IL-15 potencia también la proliferación celular, la citotoxicidad endógena, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos e induce la secreción de IFN- γ , GM-CSF y TNF- α en sinergismo con la IL-12. El rango de expresión de la IL-15 es a su vez mayor que el de la IL-2, pues es producida por monocitos y macrófagos, por células epiteliales, fibroblastos, células estromales, macrófagos deciduales y células del amnion en ambientes tisulares como el del endometrio y la decidua. A su vez, la cadena α del receptor de la IL-15 presenta una amplia distribución en diferentes tipos celulares y la afinidad de unión encontrada para este receptor es 1000 veces mayor que la afinidad del IL-2R α a la IL-2. En ausencia de suero, la IL-15 puede mantener la sobrevivencia de las células NK, evento que ha sido asociado con la prevención de la muerte celular programada. Además de las funciones ya descritas, se ha reportado la IL-15 como un factor quimiotáctico de las células NK aumentando su adhesión a las células endoteliales mediante el receptor LFA-1, por lo que se ha implicado en el reclutamiento de estas células hacia los tejidos.

MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR

La función efectora de las células citotóxicas concluye con la destrucción de la célula blan-

co ya sea por apoptosis o por necrosis, siendo la primera de estas formas de muerte celular la más frecuente. La citotoxicidad de contacto mediada por linfocitos ocurre por dos mecanismos independientes: la vía perforina/granzima o exocitosis de los gránulos y la vía no secretoria iniciada por los receptores FADD. La mayoría de los CTL-CD8 $^{+}$ utilizan preferencialmente la vía de perforina/granzima para la lisis de la célula blanco, mientras que los CTL-CD4 $^{+}$ utilizan la vía asociada a FAS para su función efectora. Algunas células utilizan otro mecanismo de citotoxicidad que no requiere el contacto de la célula efectora con la célula blanco y es la apoptosis inducida por citoquinas mediante la utilización de otro receptor de muerte, el TNF-R1.

Dada la importancia de la apoptosis como mecanismo de eliminación de las células blanco, procederemos a presentar una breve explicación de este proceso para entender con más claridad las vías de citotoxicidad.

Apoptosis

La apoptosis o muerte celular "programada" se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que se desencadenan en respuesta a determinados estímulos que conducen a la muerte en forma ordenada y "silenciosa" de la célula. La apoptosis constituye un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del organismo y participa en situaciones biológicas tan cruciales como el desarrollo embrionario para la remodelación de los tejidos, por ejemplo, la eliminación de estructuras como las membranas interdigitales en el feto, en el control de la sobreproducción de células y en el control de células defectuosas; además, la apoptosis es importante en los procesos de selección celular en el sistema nervioso y el sistema inmune. En este último es

responsable, de la selección negativa de los linfocitos en el timo. En condiciones de agresión como el cáncer y las infecciones por gérmenes intracelulares, la apoptosis es un mecanismo por el cual se pueden eliminar las células tumorales o puede ser un mecanismo de defensa que limita la propagación del virus. De otro lado, el exceso de apoptosis podría ser responsable de las manifestaciones asociadas a infecciones virales pues este es un mecanismo de patogénesis o de los defectos de algunas enfermedades neurodegenerativas y enfermedades de la vejez, entre otras. Sin embargo, una disminución de la respuesta apoptótica también conduce a condiciones anormales como las enfermedades autoinmunes, pues la falta de apoptosis de linfocitos permite la generación de clonas autorreactivas.

Los eventos apoptóticos incluyen: alteraciones de la membrana plasmática apareciendo el característico "blebbing" (evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana que le confieren a la célula un aspecto "hirviente" al inicio del proceso y en forma de "palomitas de maíz" en los últimos estadios), pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana con exposición de la fosfatidilserina, alteración del citoesqueleto con encogimiento celular, desensamblaje de las células en vesículas rodeadas de membrana (cuerpos apoptóticos), condensación de la cromatina y fragmentación del DNA en subunidades regulares que resultan del corte al azar de los nucleosomas. *In vivo*, los cuerpos apoptóticos son encerrados por las células vecinas o fagocitados por los macrófagos para evitar la liberación del contenido intracelular y la consecuente respuesta inflamatoria, hecho que sí ocurre en la muerte por necrosis.

La mitocondria es una de las organelas que más está implicada en la apoptosis. En ella, se producen una serie de cambios funcionales que no se relacionan con cambios morfológicos ya

que su estructura se mantiene intacta en casi todo el proceso. Entre las alteraciones que se producen en la mitocondria se pueden mencionar: desacople en la cadena de electrones y detención del metabolismo energético, producción de especies reactivas de oxígeno, liberación de citocromo c, falla en el mantenimiento del potencial transmembrana y finalmente, formación de poros en la membrana mitocondrial.

Vías apoptóticas

Existen dos vías diferentes que son responsables de iniciar la muerte por apoptosis, una intrínseca a la célula y otra por señales extrínsecas.

a) Vía intrínseca: es iniciada por señales que provienen del interior de la célula y responden a situaciones que comprometen el buen funcionamiento de la célula en su entorno como la pérdida de contacto con células vecinas, el estrés celular, el daño del DNA y la falta de estímulos tróficos. En estos casos, la célula es potencialmente peligrosa para el organismo y por lo tanto debe ser eliminada. El proceso de apoptosis inducido por esta vía se inicia por la liberación del citocromo c de la mitocondria, el cual en conjunto con el Apaf, el trifosfato de deoxiadenosina y la procaspasa 9 conforman el apoptosoma que activa la caspasa 9, la cual a su vez activa a la caspasa 3. Otros factores apoptóticos que se liberan de la mitocondria son: el smac/diablo que bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis y, el factor inductor de la apoptosis que, independiente de las caspasas, estimula directamente la apoptosis en el núcleo.

b) Vía extrínseca o apoptosis instructiva: esta vía es iniciada por la unión de ligandos de muerte específicos a sus receptores de muerte situados en la membrana celular; se inicia

una serie de interacciones proteína-proteína que terminan en la activación de la cascada de las caspasas.

Las caspasas

Son una familia de proteasas que son responsables del programa apoptótico. Son cisteína proteasas con una especificidad muy estricta y cortan siempre en el aminoácido posterior al ácido aspártico, pero requieren el reconocimiento de un tetrapéptido con aminoácidos amino terminales en el sitio de corte, el cual es diferente para cada una de las caspasas, lo que explica su diversidad biológica; además, la estructura terciaria del sustrato influye en su reconocimiento. La estricta especificidad de las caspasas es determinante para que en la apoptosis no ocurra una digestión indiscriminada de proteínas sino que un grupo selecto de ellas son cortadas en forma coordinada llevando a la pérdida o alteración de la función. En los mamíferos se han descrito 14 caspasas agrupadas en una familia, que tienen en común una estructura compuesta por un dominio N-terminal o prodominio y una región catalítica constituida por un dominio grande de 20 kDa y otro pequeño de 10 kDa que después de la activación por proteólisis y la eliminación del prodominio, formarán el heterodímero que conforma la enzima (Figura 3).

Procaspasa

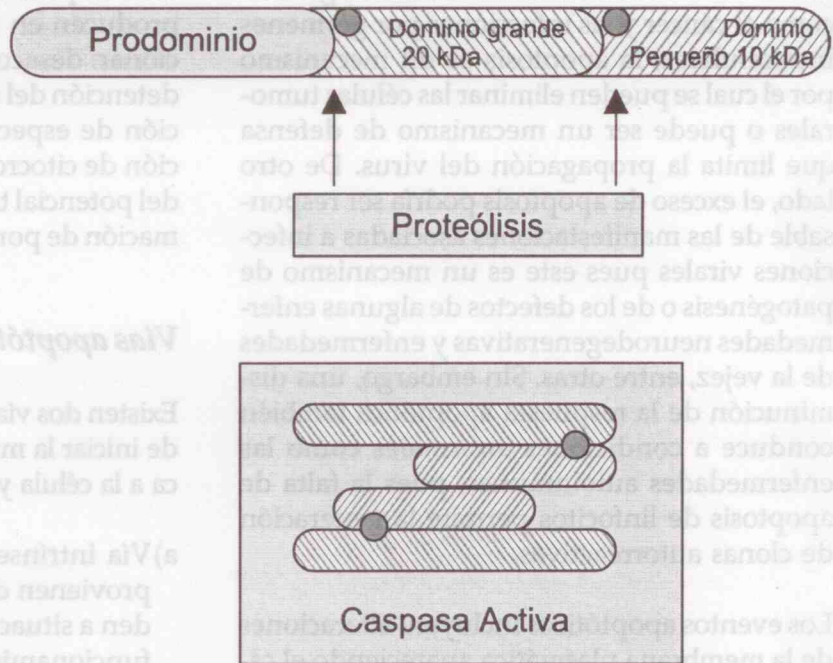


Figura 3. Activación de las caspasas.

La procaspasa inactiva está compuesta por un dominio N-terminal o prodominio, una subunidad catalítica grande de 20kDa y una pequeña de 10 kDa. Después de la activación por proteólisis en dos sitios, se separan las tres subunidades y se forma un heterodímero por unión de la subunidad grande y la pequeña por sus sitios activos.

Las caspasas que intervienen en la apoptosis se dividen en dos subgrupos, de acuerdo a la longitud de su prodominio, con funciones bien definidas:

- Caspasas iniciadoras o con prodominio largo. Pertenecen a este grupo las *procaspasas* 8 y 10 que tienen en sus prodominios unas secuencias repetitivas de interacción proteína-proteína llamadas dominios efectores de muerte y las *procaspasas* 1, 2, 4, 5 y 9 que contienen dominios de reclutamiento de caspasas. Estos dominios permiten su reclutamiento hacia los receptores de muerte situados en la membrana celular como el FAS y el TNF-R.

- Caspasas efectoras o con prodominio corto. Son activadas por alguna de las caspasas iniciadoras; al parecer, son las que actúan al final de la cascada haciendo proteólisis de las estructuras celulares. Pertenecen a este grupo las caspasas 3, 6 y 7.

Las principales acciones de las caspasas incluyen:

- a) Inactivación proteolítica de proteínas que protegen las células de la apoptosis. Una de estas es la ICAD, una proteína que mantiene inhibida a CAD, nucleasa responsable de la degradación del DNA en el proceso de apoptosis. Otras moléculas que protegen la célula de la apoptosis son algunos miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Cuando las moléculas Bcl-2 son cortadas liberan fragmentos que promueven la apoptosis, realizando así una retroalimentación positiva de la acción de las caspasas.
- b) Desensamble de la estructura celular por degradación de moléculas involucradas en la regulación del citoesqueleto como son la gelsolina, la quinasa de adhesión focal y la quinasa 2 activada por p21. Además, las caspasas cortan las proteínas filamentosas que constituyen la lámina nuclear, ésta es una estructura rígida que tapiza internamente la membrana nuclear; por lo tanto, el corte de estas proteínas produce colapso de la lámina y contribuye a la condensación de la cromatina.
- c) Degradación de algunas proteínas relacionadas con los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA (como la DNA-PKC) y con el procesamiento del RNAm (como la U1-70K).

Receptores de muerte

Son receptores situados en la membrana de la célula que al unirse a ligandos de muerte acti-

van las caspasas y con ello la cascada de apoptosis. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral que tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína y una secuencia en el dominio intracitoplasmático que le sirve para acoplar este receptor con el resto de la maquinaria apoptótica.

Entre los múltiples receptores de muerte que se han caracterizado, se podrían mencionar como los más importantes:

- **FAS (CD95/Apo1):** Proteína presente en la superficie de algunas células como linfocitos B y linfocitos T activados, líneas tumorales de origen linfoide y en hepatocitos. Su ligando fisiológico es el FAS-L que se expresa preferencialmente en células T y células NK activadas, y en los tejidos "inmunológicamente privilegiados" como el ojo y los testículos, donde las células del sistema inmune activadas son eliminadas por apoptosis con el fin de evitar una respuesta inflamatoria deletérea.
- **TNF-R1:** Este receptor se expresa en la mayoría de las células del organismo, su ligando es el TNF y la interacción de éstos envía a la célula dos tipos de señales diferentes. De un lado, se activan factores de transcripción como NFκB que dan lugar a la inducción de genes de carácter proinflamatorio e inmunomodulador; de otro lado, induce una señal de apoptosis la cual es restringida sólo a algunos tipos celulares.

Vías de citotoxicidad de las células citotóxicas

Vía perforina/granzima

Esta vía es importante en diferentes situaciones de relevancia biológica como el rechazo alo-

génico, la muerte de células tumorales, la eliminación de algunos virus y en la homeostasis de los linfocitos. Tanto en los CTL-CD8+ activados como en las células NK ocurre la exocitosis de los gránulos para inducir la muerte de las células blanco. En las células NK, los gránulos son preformados pero su actividad se puede incrementar con estímulos como la IL-2 y el IFN- γ ; su respuesta es rápida después de la estimulación de receptores de activación, sin embargo ellas no proliferan significativamente con este estímulo. Por su parte, los pre-CTL requieren un proceso de activación previa que puede durar de 1-3 días; la activación y proliferación de estas células requiere la inducción, estimulada por el TCR de receptores de citoquinas como la IL-2 y la IL-6, ya que estos factores inducen la expresión de los componentes de los gránulos. Los CTL pueden eliminar múltiples células blanco gracias a la reorientación de sus gránulos a otra región de contacto; por su parte, las células NK requieren organizar de nuevo su maquinaria lítica en respuesta al estímulo con IL-2 antes de ser efectivas contra otros blancos.

Cuando los CTL reciben señales específicas del TCR para su activación y proliferación, se disparan mecanismos transcripcionales que llevan a la síntesis de los gránulos y de las proteínas que los constituyen. En el transcurso de 1 a 2 días, los genes para perforina, granzima A, granzima B y otras granzimas tienen una alta actividad transcripcional y estas proteínas sintetizadas *de novo* son luego transportadas y ensambladas en los gránulos funcionales. Tanto las granzimas como las perforinas sufren modificaciones postrcripcionales para asumir una conformación activa. Adicionalmente, las granzimas son también glicosiladas y seleccionadas por el receptor de manosa-6-fosfato en el aparato de Golgi en su camino hacia los gránulos especializados.

Otros componentes de los gránulos, además de las perforinas y las granzimas son: a) granu-

lisina, que además de su capacidad para inducir apoptosis y daño directo de la membrana, tiene una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias intra y extracelulares; b) complejos de glicosaminoglicanos, particularmente el proteoglicano serglicina que puede servir como chaperona para la granzima B; c) calcireticulina, la cual inhibe el daño de la célula blanco mediado por perforina y pudiera actuar como una molécula reguladora.

Después de la interacción del linfocito efector con la célula blanco, los gránulos que permanecían en el citoplasma son rápidamente orientados hacia el sitio de contacto, se fusionan con la membrana plasmática de la célula y secretan su contenido en la unión estrecha entre las dos células. La perforina, en presencia de calcio, se polimeriza y forma una estructura en forma de anillo que se inserta en la membrana de la célula blanco. Se ha propuesto también la existencia de receptores específicos de perforina en la célula blanco, pero este mecanismo no se ha caracterizado (Figura 4).

Durante mucho tiempo se aceptó que la perforina formaba poros o canales en la célula blanco similares a los del complejo de ataque de membrana del complemento, los cuales llevaban por un lado, a la muerte de la célula blanco por daño en la membrana y alteración osmótica y por otro actuaban como puerta de entrada para otras proteínas citotóxicas como la granzima B que inducía la muerte apoptótica. Esta explicación ha sido reconsiderada en los últimos años porque se ha demostrado que el tamaño de los canales creados por la perforina es pequeño, alrededor de 16 nm, lo cual no permite el ingreso de proteínas como las granzimas que tienen un peso molecular que oscila entre 30 y 65 kDa. La endocitosis reparativa, es un mecanismo alternativo que se ha planteado para explicar la entrada de las granzimas a la célula blanco:

la ubicación de la perforina en la membrana de la célula blanco genera una señal para reparar el daño, lo que permite la endocitosis de la perforina que está incrustada en la membrana plasmática que la rodea; las granzimas que están en la vecindad son también endocitadas y a partir de allí liberadas al citoplasma y transportadas al núcleo de la célula blanco donde inducen apoptosis (Figura 4).

Las granzimas pueden ser internalizadas también por endocitosis mediada por receptor; se ha demostrado que el receptor de manosa-6-fosfato une e internaliza granzima B, la cual es retenida en endosomas. Para su liberación en el citoplasma, se requiere de un segundo agente como perforina, adenovirus o toxinas bacterianas (Figura 4). La granzima B libre tiene diferentes rutas de activación de la apoptosis: a) activa directamente la caspasa 3 por corte de la procaspasa 3; b) inactiva ICAD para liberar la nucleasa CAD con la consecuente fragmentación del DNA; c) estimula el BID (un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) y la traslocación de BID y BAX a la mitocondria induce la liberación del citocromo c (Figura 5).

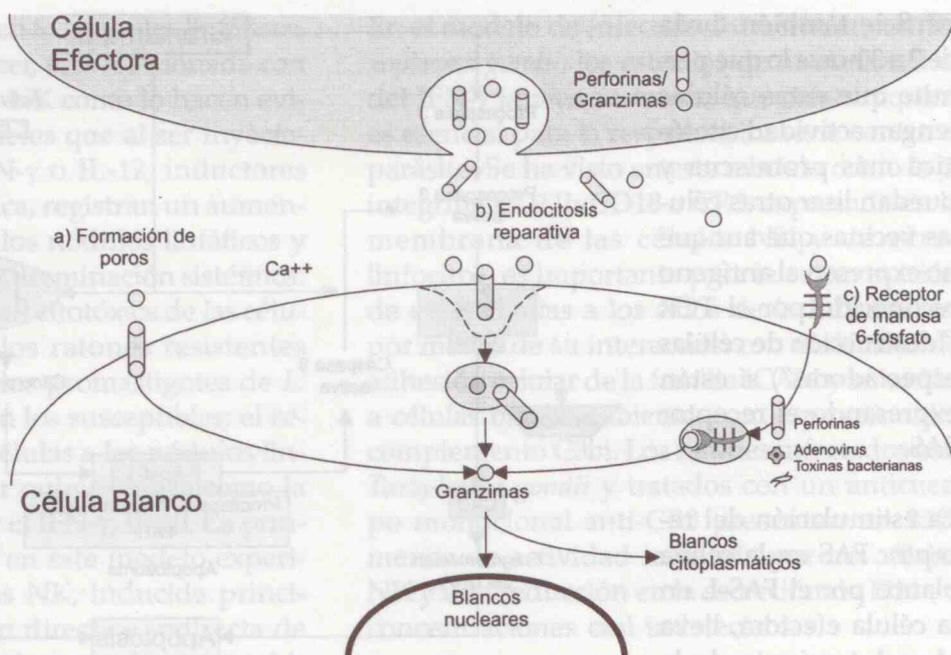


Figura 4. Vías de entrada de perforinas y granzimas a la célula blanco.

a) La perforina se polimeriza en presencia de calcio y se inserta en la membrana de la célula blanco formando unos poros a través de los cuales podrían entrar las granzimas, (ésta es una versión inicial que ha sido revaluada); b) el daño que provoca la perforina en la membrana induce una respuesta de endocitosis reparativa a través de la cual entran las perforinas que están incrustadas en la membrana y las granzimas que están en la vecindad; c) la granzima B, particularmente, puede entrar a la célula blanco a través de la unión al receptor de manosa-6-fosfato; después de ser internalizada se libera del endosoma por acción de diferentes agentes como perforinas, adenovirus o toxinas bacterianas. La granzima B induce la apoptosis por acción sobre diferentes sustratos en el citoplasma y el núcleo.

Vía dependiente de receptores de muerte ligados a FAS

Esta vía se encuentra activa en todas las líneas de células asesinas pero es más importante en las células CD4+ especialmente del fenotipo Th1. La activación de esta vía es más lenta que la de exocitosis de los gránulos, porque aún en células activadas existe muy poco FAS-L almacenado y se requiere su síntesis, lo cual puede tardar de 1-2 horas después de la estimulación del TCR. Sin embargo, su eliminación de la su-

perficie también tarda de 2 a 3 horas lo que permite que estas células tengan actividad citotóxica más promiscua y puedan lisar otras células vecinas que aunque no expresen el antígeno reconocido por el TCR (“destrucción de células espectadoras”) sí están expresando el receptor FAS.

La estimulación del receptor FAS en la célula blanco por el FAS-L en la célula efectora, lleva al reclutamiento de la procaspasa 8 por interacción con los dominios de muerte. La caspasa 8 tiene dos vías diferentes de iniciación de la apoptosis: a) activa directamente otras caspasas efectoras como la caspasa 3; b) activa a BID el cual, cuando está insertado en la membrana mitocondrial con BAX, permite la liberación de citocromo c. Este último, activa la caspasa 9 por interacción con el factor activador de la proteasa apoptótica, APAF-1; la caspasa 9 a su vez activa la caspasa 3.

MODELOS DE RESPUESTA INMUNE MEDIADOS POR CÉLULAS NK

A continuación se presentan algunos ejemplos de la participación de las células NK en la respuesta inmune contra infecciones intracelulares y en la fisiología de la gestación.

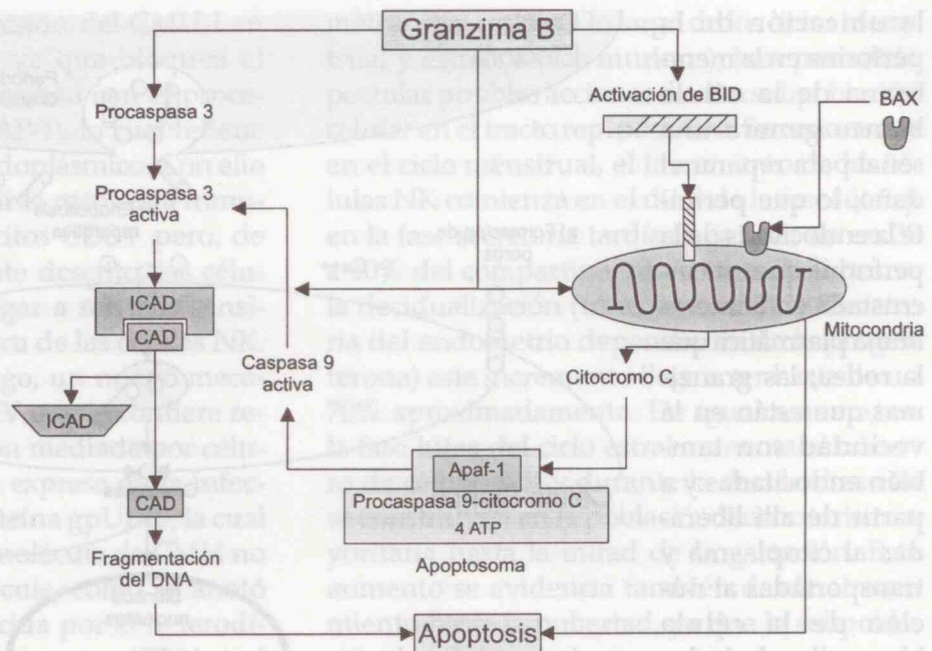


Figura 5. Mecanismos de acción de la granzima B.

Después de que la granzima B es liberada en la célula blanco ejerce diferentes acciones que inician la apoptosis: induce proteólisis de la procaspasa 3 dando origen a la caspasa 3 activa; inactiva el inhibidor de la nucleasa CAD responsable de la fragmentación del DNA; activa a BID (factor proapoptótico de la familia BCL-2) y su traslocación a la mitocondria en conjunto con el factor BAX para formar un canal que permite la liberación de citocromo c y la formación del apoptosoma para activar la caspasa 9 y continuar el proceso con la activación de la caspasa 3; la granzima B puede actuar directamente sobre la mitocondria induciendo despolarización de la membrana sin liberación de citocromo c.

Infección por *Leishmania major*: La infección cutánea con *L. major* en ratones, es un modelo experimental bien establecido de enfermedad crónica causada por un patógeno intracelular. En este modelo de infección, la mayoría de las cepas de ratones desarrollan un patrón polarizado de respuesta inmune hacia el tipo Th1 o respuesta inmune celular, mientras que las cepas susceptibles a la infección, como los Balb/c, activan una respuesta humoral o tipo Th2. También se ha observado que los ratones susceptibles presentan una diseminación más rápida de los parásitos, mientras que en los resistentes

tes éstos son retenidos en los nódulos linfáticos. Esta retención, al parecer, está relacionada con la acción de las células NK como lo hacen evidentes ratones susceptibles que al ser inyectados con Poly(I-C), IFN- γ o IL-12, inductores de la respuesta citotóxica, registran un aumento de los parásitos en los nódulos linfáticos y una disminución en la diseminación sistémica. De otro lado, la actividad citotóxica de las células NK es mayor en los ratones resistentes cuando se exponen a los promastigotes de *L. major* si se compara con los susceptibles; el reclutamiento de estas células a los nódulos linfáticos es mediado por quimoquinas como la proteína inducible por el IFN- γ , IP-10. La principal fuente de IFN- γ , en este modelo experimental, son las células NK, inducida principalmente por la acción directa e indirecta de la IL-12, producida por los macrófagos, e inhibida por citoquinas presentes en los ratones susceptibles como el TGF- β y la IL-10, lo que permite pensar que la resistencia a la infección se deba a una activación temprana de las células NK.

Infección por *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* o *Plasmodium yoelii*: El agente etiológico de la enfermedad de Chagas, el *Trypanosoma cruzi*, induce la secreción de IFN- γ en cultivos de esplenocitos murinos luego de incubarlos con tripomastigotes vivos; esta producción disminuye significativamente si se utilizan anticuerpos anti NK1.1 para eliminar las células NK de estos cultivos. También se ha demostrado que ratones deficientes de células NK o aquellos tratados con un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ presentan un aumento en la parasitemia y una disminución de la tasa de supervivencia. En este modelo experimental, es necesaria la infección con tripomastigotes vivos que estimulen significativamente la secreción de IFN- γ pues los sonidos del parásito no son capaces de mimetizar este efecto.

En el modelo de infección intracelular con *Toxoplasma gondii*, los estudios de neutralización del IFN- γ *in vivo* sustentan que esta citoquina es esencial para la respuesta inmune contra el parásito. Se ha visto en este modelo como la β_2 integrina CD11b/CD18 o CR3, expresada en la membrana de las células NK y de otros linfocitos, es importante para la extravasación de estas células a los sitios de la inflamación por medio de su interacción con moléculas de adhesión celular de la familia ICAM y su unión a células blanco cubiertas con la proteína del complemento C3bi. Los ratones infectados con *Toxoplasma gondii* y tratados con un anticuerpo monoclonal anti-CR3 presentan un 25% menos de actividad inducida por las células NK y una reducción en la secreción de IFN- γ a concentraciones casi indetectables.

Por otra parte, en el modelo de infección de *Plasmodium yoelii* se ha visto que las células T CD8+ juegan un papel importante en la inmunidad adaptativa la cual es dependiente de la producción de IFN- γ y de la activación de las células NK. Esto último, se evidencia luego de una inmunización con esporozoitos irradiados o vacunas de ADN específicas para el parásito, en la cual la respuesta inmune inducida es dependiente de la IL-12 y del IFN- γ , que a su vez requiere de células NK y es independiente de la acción de los linfocitos T CD4+.

En estos tres modelos, se ha visto como la respuesta inmune mediada por citoquinas es la base para el control de la infección, siendo primordial la activación temprana de las células NK y su producción de IFN- γ .

Infección por citomegalovirus. El CMV es un virus herpes del género β que infecta a la mayoría de las poblaciones humanas y cuya infección es persistente a lo largo del tiempo. Este virus presenta mecanismos diferentes para evadir el sistema inmune del hospedero. En pri-

mer lugar, reduce la expresión del CMH-I en la célula del hospedero ya que bloquea el péptido transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP-1), lo cual retiene el CMH-I en el retículo endoplásmico. Con ello el CMV es capaz de evadir la respuesta inmune dependiente de linfocitos CD8+ pero, de acuerdo a lo anteriormente descrito, las células infectadas pueden llegar a ser más sensibles a la actividad citotóxica de las células NK. Se ha descrito, sin embargo, un nuevo mecanismo de evasión del CMV que le confiere resistencia natural a la acción mediada por células NK. El CMV humano expresa en la infección temprana la glicoproteína gpUL40, la cual media la expresión de la molécula de CMH no clásica HLA-E. Esta molécula, como se anotó anteriormente, es reconocida por el heterodímero compuesto por el receptor CD94 y el NKG2, el cual induce señales inhibitorias sobre la capacidad citotóxica de las células NK mediadas por fosfatasa intracelulares. Adicionalmente, la expresión de moléculas homólogas a las moléculas del CMH-I por el CMV murino, así como la expresión de productos del locus de susceptibilidad genética a la infección por el CMV murino (el cual ha sido localizado en el complejo genético NK que codifica para la mayoría de los receptores de las células NK), son mecanismos esenciales en la evasión de muchos virus al ataque de las células NK y son cruciales en la sobrevida por largos períodos en el hospedero. Del estudio de estos mecanismos de evasión, podrán desprenderse nuevas alternativas terapéuticas cuya efectividad dependerá de una adecuada estimulación de la respuesta inmune y particularmente de las células NK, consideradas bajo esta perspectiva como las células efectoras intermediarias entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica.

Células NK en la gestación. Los cambios en el número de células NK residentes en el endo-

metrio observados a lo largo de los ciclos menstrual y estral (en los murinos), han permitido postular posibles acciones de esta subpoblación celular en el tracto reproductivo. Se conoce que en el ciclo menstrual, el incremento de las células NK comienza en el día 3 de la fase lútea y en la fase secretoria tardía llega a ser de un 30 a 40% del compartimiento estromal. Si ocurre la decidualización (transformación inflamatoria del endometrio dependiente de la progesterona) este incremento llega a ser hasta de un 70% aproximadamente. De igual manera, en la fase lútea del ciclo estral aumenta el número de células NK y durante la decidualización se constituyen en la población leucocitaria mayoritaria hasta la mitad de la gestación. Este aumento se evidencia también desde el nacimiento hasta la pubertad, ya que la subpoblación de células uterinas que expresan el marcador LGL-1 es encontrado a partir de la segunda semana de vida en los ratones. Los interrogantes acerca de una posible función de las células NK en el fenómeno reproductivo, especialmente el que tiene que ver con la implantación y el desarrollo embrionario temprano, cuyos eventos median el ulterior desarrollo del trofoblasto (componente fetal de la placenta humana), han justificado una reciente línea de investigación en este tema.

Si bien el papel que puedan ejercer las células NK en la gestación temprana no es claro, se han esgrimido algunas hipótesis sobre su posible función, las cuales destacamos a continuación:

- Las células NK son iniciadoras de la falla del embarazo en los humanos y en el modelo murino de aborto. Inicialmente se explicaba el rechazo fetal mediante la acción citotóxica de las células NK presentes en la interfase materno fetal; sin embargo, diferentes evidencias sostienen que la subpoblación de células NK deciduales no son las directamente

implicadas en la falla de los embarazos. Por ejemplo, en el caso de las células NK CD56^{bright+} endometriales y deciduales, su porcentaje disminuye proporcionalmente en comparación con la subpoblación CD56^{dim+} en las mujeres abortadoras habituales, la cual proviene de sangre periférica. Esto refuerza el concepto que existen dos poblaciones diferentes desde el punto de vista funcional y que las células NK periféricas, CD56^{dim+} en particular, presentan mayor capacidad citotóxica comparada con la población decidual. Por lo tanto, el rechazo alógeno del feto puede ser llevado a cabo por linfocitos infiltrantes del tipo de las células NK más no por células deciduales residentes o con el fenotipo CD56^{bright+}. Sin embargo, en un modelo murino de aborto (CBAxDBA/2), se ha reconocido que la subpoblación infiltrante de células en el rechazo alógeno no corresponde con las células NK sino con linfocitos T atípicos, que expresan el marcador asialo GM-1 (que también es expresado por las células NK) concomitantemente con el receptor de células T γ/δ y que producen principalmente TNF- α , una citoquina implicada en las reabsorciones embrionarias.

- Las células NK que llegan al endometrio limitan la invasión trofoblástica por medio de mecanismos citotóxicos. La limitación en la invasión trofoblástica debida a la citotoxicidad de las células NK, es una hipótesis que tiene poca evidencia experimental, teniendo en cuenta que existen mecanismos no conocidos del trofoblasto que inhiben la lisis por parte de las células NK, diferentes a aquellos conocidos de la expresión de moléculas clase I no clásicas (Ib) como el HLA-E y el HLA-G. Por el contrario, se ha establecido que la subpoblación de células NK deciduales produce componentes de la matriz extracel-

lular como la mucina 1, la cual se acumula progresivamente en sus gránulos intracitoplasmáticos y al ser secretada hace las veces de "autopista" para el trofoblasto invasor en dirección a las arterias espirales uterinas. Lo anterior favorece la invasión trofoblástica de alguna manera en vez de limitarla, al tiempo que permite el mantenimiento del embrión y el soporte nutricional a partir de la circulación materna.

- Los productos solubles de las células NK deciduales son promotores del crecimiento y la invasión trofoblástica. La correlación existente entre la actividad lítica disminuida por parte de las células NK, desde los estadios tempranos hasta la mitad de la gestación y la reducción de las funciones endosomales y lisosomales en este mismo período de tiempo, parecen mostrar que el medio ambiente uterino es capaz de inducir un bloqueo de la cascada de señales, particularmente de aquellas responsables de los mecanismos citotóxicos. De otro lado, la subpoblación de células NK humanas CD56^{bright+} CD16⁻, se ha considerado como la fuente primaria de citoquinas inmunoreguladoras que participan de la inmunidad innata. Es posible entonces un redireccionamiento de la señalización intracelular hacia la producción de citoquinas, evento que se ha venido estudiando en la última década. En este sentido, se ha demostrado que las citoquinas que favorecen el desarrollo embrionario y placentario son producidas además por las células NK deciduales desde sus estadios tempranos de diferenciación, a la vez que se ha intentado determinar el papel de estas células en la implantación, el desarrollo y la diferenciación embrionaria. Entre las citoquinas producidas por las células NK deciduales están: el LIF, el GM-CSF, el CSF-1, el TNF- α , el IFN- γ , la IL-8 y el TGF- β .

LECTURAS RECOMENDADAS

1. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E, Waldmann TA. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:4940-4944.
2. Barry M, Bleackley C. Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2:401-409.
3. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97:3146-3151.
4. Dyugovskaya L, Berkutski T, Ginsburg H. Characterisation of the morphogenetic course and secretion of two different types of mucoid material by granulated metrial gland/lymphokine-activated killer cells. *J Anat* 1995;187:693-708.
5. Ginsburg H, Coleman R, Davidson S, Khoury C, Mor R. Lymphokine-activated killer cells are identical to the uterine granulated metrial gland (GMG) cells. *Transplant Proc* 1989;21:186-189.
6. Kagi D, Lederman B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Ann Rev Immunol* 1996;14:207-232.
7. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:2632-2640.
8. Henkart PA. Cytotoxic T lymphocytes. En: Paul WE (ed) *Fundamental Immunology*, Fourth Edition. Lippincott Raven Publishers, 1999. Pp: 1021-1049.
9. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:323-370.
10. Seaman WE. Natural Killer cells and Natural Killer T cells. *Arthritis Rheum* 2000;43(6):1204-1217.
11. Ye W, Zheng LM, Young JD, Liu CC. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med* 1996;184:2405-2410.
12. Ye W, Young JD, Liu CC. Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes. *Cell Immunol* 1996;174:54-62.
13. Introducción general a la apoptosis. <http://apored.rediris.es/divulgacion04.htm>.
14. Caspasas: los enemigos internos. <http://www.microscopios.freeservers.com/caspasas.htm>.