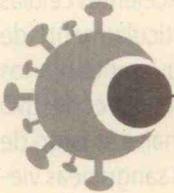


Inmunología e infección viral



Jorge Alejandro Henao. MD. Facultad de Medicina,
Grupo Inmunovirología, U de Antioquia.

Victoria Inés Bedoya. MD. PhD. Facultad de Medicina,
Grupo Inmunovirología, U de Antioquia.

Maria Teresa Rugeles. Bact. Msc. PhD. Facultad de Medicina,
Grupo Inmunovirología, U de Antioquia.

Los virus son microorganismos intracelulares que necesitan utilizar proteínas y organelas celulares para poder realizar su ciclo replicativo. Una vez se completa la formación del virión, las nuevas partículas virales salen de la célula infectada, por diferentes mecanismos, en busca de nuevas células blanco para garantizar su supervivencia. Tanto la célula infectada como los nuevos viriones liberados al espacio extracelular son susceptibles a una variedad muy amplia de mecanismos efectores del sistema inmune. La respuesta inmune antiviral comprende una interacción compleja entre las células infectadas y las células efectoras del hospedero. Las principales células efectoras durante la respuesta antiviral son las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T citotóxicos (LTC). En infecciones por algunos virus en particular las células dendríticas plasmocitoides (CDp), las células NKT invariantes (NKTi) y los linfocitos B juegan un papel relevante en la respuesta inmune protectora que se establece.

El sistema inmune innato reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), a través de moléculas sensoras denominadas receptores de reconocimiento de patrones (RRP), de las cuales hacen parte los recientemente identificados receptores tipo Toll; la interacción de alta afinidad entre estos receptores y sus ligandos, resulta en la activación de vías de señalización y de



mecanismos efectores antivirales desplegados por células de la respuesta innata. De este sistema innato hacen parte los fagocitos, las células NK y las células NKTi. Los principales fagocitos son los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas. Las células dendríticas son derivadas de médula ósea y tienen una amplia distribución en diferentes tejidos; en su estado inmaduro tienen gran capacidad fagocítica, función que van perdiendo a medida que maduran para convertirse en excelentes células presentadoras de antígeno y grandes productoras de citoquinas particularmente de IFN- α . Los macrófagos maduran a partir de monocitos circulantes que entran a los tejidos donde se encuentran en gran número, especialmente en el tejido conectivo asociado al tracto gastrointestinal, en los alvéolos e intersticio pulmonar, a lo largo de vasos sanguíneos del hígado, y en el bazo donde remueven las células sanguíneas viejas. Los macrófagos exhiben mecanismos microbicidas importantes, secretan factores solubles que afectan las células vecinas potenciando la respuesta inmune y participan en la presentación de antígenos a las células CD4+ y CD8+. Los neutrófilos controlan algunos de los patógenos intracelulares, son células terminales (no se dividen), tienen un ciclo de vida corto (de 6 a 8 horas) y reconocen, ingieren y destruyen muchos patógenos; estas células son eliminadas por los macrófagos a través de la apoptosis.

Las células NK, representan cerca del 10 % de las células sanguíneas circulantes y son la primera línea de defensa contra muchas infecciones; se activan por diferentes mecanismos, principalmente por la secreción de citoquinas como la IL-12 y TNF- α proveniente de los macrófagos y por el IFN- γ . Estas citoquinas se unen a receptores específicos en las células NK y las activan para producir citoquinas, entre ellas la más importante el IFN- γ . La cascada patógeno-macrófago-IL-12/TNF- α -células NK-IFN- γ actúa contra bacterias intracelulares, contra parásitos y particularmente contra las infecciones virales.

La mayor importancia de las células NKTi radica en su potente acción inmunorreguladora debida a la liberación rápida y masiva de citoquinas tipo Th1 y Th2, especialmente el IFN- γ y la IL-4, luego de la activación a través de su TCR invariante. Se ha demostrado que la activación de las células NKTi conduce a la estimulación de las células NK, monocitos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T ayudadores y citotóxicos, estableciendo un puente entre el desarrollo de las respuestas inmunes innata y adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa, a diferencia de los mecanismos innatos, requiere del reconocimiento de los antígenos por células que poseen receptores específicos que reconocen, en el caso de células T, segmentos pequeños de proteínas en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o en el caso de las células B, epítopos conformacionales directamente sobre el antígeno. La respuesta específica se puede dividir en mecanismos mediados por células, los cuales incluyen la activación de las células T y sus mecanismos efectores y la respuesta humoral, que consiste en la maduración de las células B a células plasmáticas y la producción de anticuerpos.

Inmunidad a virus

Los virus son microorganismos intracelulares obligatorios que expresan moléculas de superficie que los capacitan para iniciar una infección, al unirse a moléculas específicas en la membrana celular del hospedero, como la molécula CD4 en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el CR2 en el caso del Epstein Barr (EBV), el ICAM 1 en el caso de los rinovirus y residuos de ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular en el caso de los virus de influenza. La replicación y diseminación de muchos virus puede causar enfermedad aguda en el hospedero, la cual desaparece en la medida en que los virus son eliminados. Otros virus permanecen por largos períodos y causan enfermedad crónica o lenta; en forma alterna, algunos virus pueden establecer una infección latente y reaparecer en algún momento de la vida del individuo, por reactivación de la replicación viral debida a trastornos inmunológicos, hormonales o por estrés.

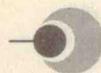
La respuesta inmune a las infecciones virales, al igual que para cualquier otro tipo de parásito, puede ser innata (inespecífica) o adaptativa (específica). Ambas actúan en diferentes períodos y en forma coordinada para controlar la infección. La respuesta innata comienza en el momento de la infección y es crítica para el control de la replicación viral y la diseminación de la infección, pero en algunas ocasiones no es suficiente para eliminar el virus. La respuesta específica es usualmente suficiente para controlar la infección, pero requiere alrededor de una semana para desarrollarse.

Respuesta innata

La respuesta inmune innata bloquea la infección inicial e induce condiciones que impiden o limitan la replicación viral dentro de las células y/o eliminan las células infectadas. La gran mayoría de las infecciones virales son asintomáticas y se cree que las barreras naturales y la respuesta innata son los mecanismos que evitan el establecimiento y/o la diseminación de la infección. Entre los componentes solubles del sistema innato antiviral se destacan las proteínas del complemento, las quimioquinas y los interferones. En forma individual o sinérgica, las citoquinas activan las funciones efectoras de las células NK, NKTi, de las CD, de los monocitos y de los macrófagos; adicionalmente, modifican los patrones de la circulación celular para atraer las células efectoras a los sitios de la infección y concentrar las células T y B del sistema inmune adaptativo en los sitios de presentación de antígeno. Las células NK y las CD son los componentes celulares del sistema inmune innato más importantes durante la respuesta antiviral.

Receptores tipo Toll (TLR)

Los TLR son un tipo de RRP que reconocen una amplia variedad de patógenos, y aunque la mayoría de los hallazgos se han obtenido con bacterias, existe evidencia reciente que sugiere que los virus también están sujetos al reconocimiento por parte de estos receptores.



Hasta la fecha se han identificado 11 TLR en los humanos, que son expresados predominantemente en células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, aunque su expresión no está restringida a este tipo de células. Generalmente son receptores localizados en la superficie celular, aunque algunos se encuentran en compartimientos intracelulares como los TLR7, TLR8, TLR9, y TLR3. La interacción con los ligandos expresados por los virus genera la multimerización de estos receptores; esto lleva a la activación de cascadas de señalización en las que NF κ B juega un papel fundamental al inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias y aumentar la expresión de moléculas co-estimuladoras como el CMH-II y CD86. Se cree que aun se desconoce la totalidad de la cascada de señalización activada por estos receptores.

Los TLR detectan patógenos a través de motivos estructurales denominados PMAP; cuatro clases de PMAP han sido identificados en virus: RNA de doble cadena (RNAdc), RNA de cadena sencilla (RNAs), Deoxicitidilato fosfato deoxiguanilato (CpG) y glicoproteínas.

Hasta el momento se ha descrito que el TLR3 reconoce el RNAdc generado durante el ciclo replicativo del citomegalovirus (CMV) murino y que su activación por parte de este ligando induce una potente expresión de IFN- β . Los TLR7 y TLR8 reconocen RNAs virales intracelulares, induciendo la secreción de IFN- α los virus de la influenza, de la estomatitis vesicular (VSV) y del VIH inducen la activación del TLR7. El TLR9 reconoce DNA viral con motivos CpG, tales como los que se encuentran en el virus herpes simplex tipo 1 (HVS-1), el tipo 2 (HVS-2) y el CMV murino; su activación induce la expresión de IFN- α . Cabe recalcar que el reconocimiento de los PMAP por parte de TLR7, TLR8, TLR9 es dependiente de la acidificación del endosoma donde se encuentran localizados. Finalmente, el TLR2 y el TLR4, expresados en la superficie de la membrana, son activados por las glicoproteínas de envoltura de los virus respiratorio sincitial, el CMV humano y el HVS-1.

Sin embargo, solo en los últimos años se ha venido identificando el papel de estos receptores en la respuesta inmune innata a virus y es claro que aún quedan muchas preguntas por resolver en la interacción viral con los TLR.

Proteínas del Complemento:

El sistema del complemento es un componente fundamental de la respuesta innata el cual se activa durante las infecciones virales; sin embargo, su activación no siempre se asocia con la neutralización del virus. Se ha demostrado que durante las infecciones virales se pueden activar las tres vías del complemento: la vía clásica, la alterna y la vía de la lectina de unión a la manosa. Una vez activado el sistema de complemento, la neutralización y/o eliminación del virus se lleva a cabo por cuatro mecanismos: i) neutralización por agregación dependiente del complemento; ii) opsonización de los

viriones recubiertos por proteínas del complemento, tales como C3 y C5; iii) lisis directa, cuando gran cantidad de anticuerpos se depositan en la superficie de los virus envueltos lo cual lleva a la activación del complemento, generando la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) en la superficie viral, que conlleva a la disrupción de la integridad viral; y iv) fagocitosis: la unión covalente de C3b al virus lo hace susceptible a la fagocitosis y su posterior destrucción, como se ha documentado con el HVS.

El complemento es un sistema inespecífico, que no reconoce entre antígenos propios y extraños; por por esta razón el organismo ha desarrollado diferentes mecanismos de regulación que impiden el daño de células propias. Aprovechando estos mecanismos de regulación, los virus han desarrollado mecanismos de evasión del sistema de complemento, los cuales serán discutidos en profundidad posteriormente.

Interferones:

Los IFN son una familia de citoquinas importantes para la supervivencia de animales vertebrados que cumplen funciones tanto autocrinas como paracrina; proveen un mecanismo de defensa amplio contra diferentes patógenos, al inhibir la replicación y la diseminación de virus, bacterias y parásitos, horas o días antes de que se estimule otro tipo de respuesta inmune. En humanos, esta familia está compuesta por los IFN tipo I con 12 especies de IFN- α , una especie de IFN- ω y una especie de IFN- β y el IFN tipo II con una especie de IFN- γ .

Aunque casi todas las células en cultivo, estimuladas apropiadamente, producen IFN- α/β ha sido muy difícil establecer *in vitro*, cuáles células producen IFN- α/β durante la infección viral. Recientemente, las células dendríticas plasmocitoides han sido identificadas como las mayores productoras de IFN- α/β aunque se ha encontrado que los niveles que se producen pueden variar de acuerdo al tipo de virus infectante. De otro lado, la producción de IFN- γ durante la fase de respuesta inmune innata a virus, está restringida a un grupo de células más limitado; las células NK y NKT son las principales productoras y durante la respuesta adaptativa, las células T activadas producen grandes cantidades de este tipo de interferón.

La producción de IFN- α/β por parte de las CD plasmocitoides es uno de los primeros eventos que se producen en el proceso inflamatorio durante una infección viral. El extenso estudio de estas citoquinas, ha llevado a avances importantes, pero las interacciones moleculares entre virus-hospedero que inducen esta respuesta no están claramente establecidas; hasta el momento, dos mecanismos se han postulado como posibles explicaciones de este fenómeno: i) interacciones entre factores virales con receptores extracelulares; y ii) las interacciones entre factores virales y receptores intracelulares. En el primer mecanismo, se han identificado interacciones inductoras de IFN- α/β tales como la interacción entre las glicoproteínas de la superficie viral y receptores tipo lectina, interacciones entre factores virales y el ácido sialico, y las interacciones recientemente identificadas entre patrones moleculares virales y los receptores tipo Toll.



En el segundo mecanismo, factores virales liberados al citoplasma, o producidos durante el ciclo replicativo, interactúan con receptores intracelulares inductores de IFN- α/β . Los principales ejemplos lo constituyen los virus que durante su ciclo de replicación pasan por una fase de RNA de doble cadena, el cual se une a los receptores intracelulares PKR y TLR3 o el RNA viral de cadena sencilla que se une a TLR9; la activación de estos tres receptores induce una potente producción de IFN- α/β .

Los IFN- α/β secretados por la célula infectada, amplifican la respuesta anti-viral al unirse a su receptor tanto en células infectadas como en las células vecinas no infectadas, y al activar la cascada de fosforilación de tirosinas dentro de las células. Esta señalización se inicia con la activación de las JAK 1 y Tyk 2 que promueven la dimerización de proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción STAT. Los dímeros de STAT son translocados al núcleo donde se unen a secuencias de DNA específicas y estimulan la transcripción de genes como el de la enzima 2'-5' oligo-adenilato sintetasa, el de la proteína de unión a dsRNA, PKR, el de ADAR1 y el de las proteínas Mx, MxA y MxB.

La enzima 2'-5' oligo-adenilato sintetasa se activa por la presencia de dsRNA y produce cadenas cortas de 2'-5' oligoadenilatos a partir de ATP; estos oligoadenilatos se unen y activan la enzima RNasa L, una endonucleasa que en su estado activo degrada el RNA. La enzima RNasa L se expresa constitutivamente en la mayoría de células; sin embargo, el tratamiento con IFN α/β puede aumentar la transcripción de este gen hasta 10 veces. La actividad antiviral también ocurre cuando se induce la PKR, una serina-treonina quinasa compuesta de 551 aminoácidos con dos sitios de unión al dsRNA, la cual se encuentra predominantemente en el citoplasma unida a los ribosomas. El dsRNA induce la autofosforilación y la activación de esta quinasa que, una vez activada, cataliza la fosforilación de por lo menos 5 proteínas más, entre ellas el EIF-2, al que inactiva, induciendo un bloqueo de la síntesis de proteínas, tanto celulares como virales. La proteína ADAR1 induce modificaciones postranscripcionales como la deaminación de adenosina para dar origen a inosina, mecanismo que altera la actividad funcional de los RNA virales y celulares. Esta modificación, desestabiliza los dsRNA ya que altera el apareamiento de las bases. Tanto el IFN tipo I como el II inducen un incremento hasta de 5 veces en la producción de esta proteína que puede llegar a tener un potente efecto antiviral. Las proteínas Mx, son una familia de GTPasas que inhiben la replicación de algunos virus RNA al unirse a estructuras de ribonucleoproteína viral, bloqueando la transcripción del RNA viral y la circulación de las sub-partículas virales dentro de la célula. Adicionalmente, los IFN- α/β inducen un aumento en la expresión de las moléculas del CMH-I lo que favorece el reconocimiento de las células infectadas por parte de los LT CD8+.

Durante la respuesta innata, la producción de IFN- γ está restringida a las células NK y NKT. El IFN- γ no es una citoquina inducida directamente por los virus, pero hace

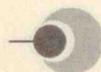
parte de una segunda serie de citoquinas secretadas más tardíamente; la inducción de su expresión es mediada por citoquinas expresadas tempranamente, o durante la respuesta adquirida por la estimulación de los receptores de células T por parte de las células presentadoras de antígeno. Múltiples citoquinas han sido implicadas con la inducción de la expresión de IFN- γ tales como: IL-2, IL-18, IL-15, IL-21 y muy particularmente la IL-12; la mayoría de estas citoquinas son producidas por las células presentadoras de antígeno (CPA). La señalización del IFN- γ ocurre mediante las quinasas JAK 1 y 2, que inducen la fosforilación de STAT 1 y siguen la cascada descrita anteriormente. Además de las proteínas inducidas por el IFN tipo I, el IFN- γ induce la expresión de moléculas del CMH-II, receptores Fc y la enzima iNOS₂ en macrófagos activados. Esta enzima cataliza la producción de óxido nítrico (ON) que reacciona con el oxígeno para producir moléculas altamente reactivas; estos compuestos ejercen su actividad antiviral al modificar químicamente proteínas esenciales para la función de virus DNA como el EBV, el herpes simplex y el virus de la hepatitis B.

Los IFN, tienen la capacidad de inhibir todas las etapas de la replicación, dependiendo del virus, por ejemplo: el ingreso del virus SV40; la transcripción de los virus de influenza; la iniciación de la traducción del genoma viral en el caso de los reovirus, los adenovirus y el virus de la vaccinia; el ensamblaje y la liberación de partículas virales en los retrovirus y el virus de la estomatitis vesicular.

Quimioquinas:

Las quimioquinas son polipéptidos pequeños especializados en la comunicación entre las diferentes células del sistema inmune, los cuales actúan a través de su interacción con receptores de membrana acoplados a proteínas G. La expresión diferencial de estas proteínas y sus receptores permiten el adecuado tráfico de los leucocitos durante diferentes infecciones. Las quimioquinas son clasificadas por su estructura, y se dividen en cuatro subgrupos, de acuerdo a la localización de residuos de cisteína conservados; estos subgrupos son denominados: CC, CXC, C, y CX3C. Adicionalmente, pueden ser clasificadas de acuerdo a su función; es así como se han identificado quimioquinas homeostáticas que controlan el tráfico de leucocitos en ausencia de infección, regulando la homeostasis del sistema inmune, y quimioquinas inflamatorias que guían a las células efectoras del sistema inmune al sitio de la infección.

Los virus inducen la expresión de quimioquinas de manera indirecta y directa. Los mecanismos indirectos de inducción están dados por la rápida secreción de citoquinas proinflamatorias, secundario a una infección viral; de esta manera los IFN tipo I y II y el TNF- α estimulan la expresión de las quimioquinas inflamatorias tipo CC y CXC, especialmente CCL3 y CCL5. De otra forma, la inducción directa de quimioquinas por las infecciones virales, se deben a la interacción directa de componentes virales, como por ejemplo RNA de doble cadena con el TLR3, lo cual activa vías de señalización que



llevan a la translocación de factores de transcripción al núcleo, lo que lleva a la expresión conjunta de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias.

Actualmente, las quimioquinas son reconocidas como una importante red de acople entre los sistemas inmunes innato y adaptativo, como se observa durante la infección por el CMV humano. Cuando un organismo es infectado por este virus, las CD plasmocitoides son activadas y secretan grandes cantidades de IFN- α , lo que a su vez lleva a la inducción de la expresión de CCL3. Esta quimioquina recluta células NK al sitio de la infección, las cuales lisan directamente las células infectadas y producen importantes cantidades de IFN- γ . El IFN-g a su vez, estimula la producción de CXCL9 por parte de los macrófagos titulares; esta quimioquina es la encargada de atraer al sitio de la infección a los LT CD4+, y así iniciar el proceso de generación de la respuesta inmune adaptativa.

Adicionalmente, diferentes receptores de quimioquinas son la puerta de entrada de patógenos; tal es el caso del antígeno Duffy, presente en eritrocitos, que permite la entrada al *Plasmodium vivax*; el PAFR que permite el ingreso del *Streptococcus pneumoniae* y de los receptores CCR5 y CXCR4 que permiten la entrada del VIH-1 a sus células blanco. A partir del momento en que se describe la participación de estas moléculas como correceptores del VIH-1 se ha señalado la importancia del sistema de quimioquinas en la resistencia/susceptibilidad a esta infección viral y en general en la patogénesis del SIDA.

Células NK

Las células NK (natural killers) corresponden aproximadamente al 5-10% de la población de linfocitos en sangre periférica, y son la primera línea de defensa contra infecciones virales ya que su activación no depende de su expansión clonal, lo que les permite montar una respuesta rápida a la infección viral, antes de que se desarrolle la inmunidad adaptativa.

Estas células expresan múltiples receptores de activación o inhibición en su membrana los cuales, a diferencia de los Linfocitos T o B, no sufren rearrreglo genético; estos reconocen fundamentalmente moléculas del CMH I, aunque interacciones con glicoproteínas también han sido identificadas. Estas células pueden ser estimuladas directamente por medio de interacciones entre ligando y receptores de membrana; en este caso, los receptores activadores de las células NK, tales como el KIR (Killer cell Immunoglobulin like receptor) que reconocen moléculas del CMH I tales como HLA A, B, C o E y moléculas expresadas por los virus durante la replicación viral, como por ejemplo la molécula m157 en el CMV murino. Adicionalmente, todas las células NK expresan receptores inhibitorios, como mecanismo evolutivo protector, ya que todas las células nucleadas del organismo expresan moléculas del CMH-I reconocidas por receptores activadores; la interacción entre receptores inhibitorios y sus ligandos pre-

viene respuestas de tipo autoinmune, modulando así la respuesta de las células NK. Su participación activa en la respuesta antiviral se debe a que algunos virus inhiben, en forma selectiva, el transporte, el ensamblaje y la expresión de las moléculas del CMH-I, evitando la interacción normal entre los receptores específicos inhibitorios de las células NK y sus ligandos naturales en el CMH-I; esto conlleva a la activación de las células NK y por ende a la eliminación de las células infectadas.

La activación de estas células también se da por la exposición a citoquinas, producidas por otras células del sistema inmune durante una infección viral tales como: los IFN α/β y algunas citoquinas secretadas por macrófagos, particularmente la IL-12, la IL-1 y el TNF- α . Todas estas citoquinas estimulan la producción de grandes cantidades de IFN- γ por las células NK, evento crucial para controlar algunas infecciones antes de la activación de los LT.

Las células NK activadas pueden ejercer su efecto antiviral en forma directa al lisis las células infectadas, por medio de la liberación al espacio extracelular del contenido de sus gránulos intracelulares con perforinas y granzimas, o como se dijo anteriormente, produciendo citoquinas proinflamatorias, las cuales reclutan, activan y modulan la respuesta de otras células del sistema inmune durante la infección viral.

La importancia de las células NK durante el control de algunas infecciones virales se ha podido establecer claramente en modelos murinos. La eliminación de células NK *in vivo*, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, llevó al aumento de la carga viral en el caso de infecciones con el virus de vaccinia y el CMV murino, pero no, en infecciones con el virus de la linfocoriomeningitis linfocítica murina. En humanos, los defectos en el número y función de las células NK son poco frecuentes; sin embargo, un individuo en quien se reportó una deficiencia completa y selectiva de las células NK desarrolló infecciones severas, inusuales, con el virus de la varicella zoster, el CMV y el HSV-1.

Considerando la importancia que tienen estas células durante la fase temprana de la respuesta inmune a infecciones virales, no es sorprendente que los virus hayan desarrollado mecanismos de modulación y evasión de la respuesta antiviral de las células NK, los cuales serán discutidos posteriormente.

Células dendríticas (CD):

Las CD comprenden un grupo heterogéneo de células que provienen de distintos precursores derivados de médula ósea; están ampliamente distribuidas como células inmaduras tanto en circulación como en tejido linfóide y no linfóide, donde representan menos del 1% de los mononucleares. Las CD mieloides producen grandes cantidades de IL-12 e inducen el desarrollo del perfil de citoquinas Th1, mientras que las CD plasmocitoides producen bajas cantidades de IL-12 e inducen el desarrollo del perfil de citoquinas Th2; de ahí, su denotación de células CD1 y CD2, respectivamente.

Estas células juegan un papel crucial en la iniciación y modulación de la respuesta inmune innata, gracias a la alta producción de IFN tipo I por parte de las CD plasmocitoides (1000 veces más que cualquier otro tipo de célula), el cual controla la replicación viral y modula la respuesta inmune adaptativa al promover la supervivencia de las células T de memoria. Además de controlar la replicación viral por este medio, las CD modulan las funciones de las células NK, NKT y macrófagos. De igual manera, las CD como células presentadoras de antígeno son claves en la activación de los LT citotóxicos y ayudadores vírgenes durante la respuesta inmune adaptativa anti-viral.

Las CD inmaduras se encuentran estratégicamente distribuidas por todo el organismo lo que les permite capturar, internalizar y procesar antígenos. Este último paso es indispensable para su maduración, lo que ocurre a medida que las células migran hacia los órganos linfoides, sitio en el cual se encuentran capacitadas para realizar el proceso de presentación antigénica.

Células NKTi:

Las células NKTi, tienen características particulares que permiten diferenciarlas de los linfocitos T clásicos y de las células NK, y que resaltan su importancia desde el punto de vista evolutivo e inmunológico. El TCR de las células NKTi es altamente conservado, con una cadena alfa invariante cuya región hipervariable tiene una secuencia de aminoácidos muy constante en el sitio de unión a los epítopes antigénicos (región determinante de la complementariedad o asa CDR3); esta cadena alfa invariante se aparea con un grupo restringido de cadenas beta, en el humano casi exclusivamente con la cadena V β 11 y en el ratón con las cadenas V β 8.2, V β 2 y V β 7. Lo anterior lleva a que las células NKTi expresen un TCR altamente homólogo con una variación estructural significativa solo en el asa CDR3 de la cadena beta.

La frecuencia de las células NKTi en los diferentes tejidos es muy variable, y aparentemente depende de su estado de activación. En los seres humanos, la frecuencia de las células NKTi en sangre periférica es muy heterogénea (desde 0.01% a 1% de los linfocitos), y su fenotipo es claramente de células T de memoria efectoras (CD45RO+ CCR7- CD62Lbajo), lo que explica su capacidad de respuesta casi inmediata ante las señales de activación mediadas por el TCR. Sin embargo, en condiciones basales expresan pocos marcadores de activación en su superficie (CD25, CD38, CD69, CD95, CD154, HLA-DR).

Las células NKTi participan en la respuesta inmune antiviral, aunque de una manera diferente según el tipo de virus; incluso, estas células podrían estar involucradas en los daños mediados por mecanismos inmunes. En el humano, las células NKTi son aparentemente esenciales en la respuesta inmune contra el virus Varicela Zoster, mientras que todavía hay controversia sobre la función de estas células en el control de otros virus.

Respuesta inmune específica

La respuesta inmune adaptativa contra las infecciones virales es mediada por anticuerpos y por LT, principalmente por CTL, que controlan la infección viral al eliminar las células infectadas. Los anticuerpos son efectivos contra los virus solo durante el estado extracelular de su ciclo de vida; antes de que entren a su célula hospedera o en el momento en que son liberadas a partir de una célula infectada. Los LT CD8+ específicos de antígeno se activan rápidamente durante la infección viral, inclusive antes de la aparición de anticuerpos neutralizantes. Aunque generalmente no tienen un efecto antiviral directo los LT CD4+ son necesarios en el control y la eliminación de las infecciones virales por su papel en la activación de los LT CD8+ y de las células B.

Respuesta inmune adaptativa mediada por anticuerpos:

Las células B, reconocen epítopes específicos, la mayoría de ellos no lineales en la superficie viral o en la superficie de las células infectadas. Durante la respuesta antiviral, los linfocitos B funcionan no solo como células efectoras específicas de antígeno sino también como CPA. Después de capturar los antígenos a través del BCR (receptor de antígeno de células B) lo internalizan y procesan para presentar los péptidos, en el contexto del CMH clase II, a los linfocitos T CD4+. En el caso de que el linfocito B sea la célula que permite la replicación viral también tendrá la capacidad de presentar péptidos provenientes de proteínas virales endógenas a los linfocitos T CD8+ en el contexto del CMH clase I.

La activación de las células B y su posterior diferenciación a células plasmocitoides productoras de anticuerpos depende de la ayuda brindada, en los órganos linfoides secundarios, por los LT CD4+ para iniciar la síntesis de anticuerpos. La respuesta primaria se caracteriza por la secreción de IgM; el cambio de isotipo y el aumento de la especificidad de los anticuerpos ocurren después de que el linfocito B es estimulado por las citoquinas producidas por los LT CD4+ y de que se da una interacción célula a célula (LB-LT). El cambio de isotipo tiene consecuencias importantes ya que la función biológica de los anticuerpos depende en gran medida de la región constante de la cadena pesada; por ejemplo, en humanos, la IgG1 e IgG3 son los isotipos de IgG que tienen mayor capacidad de fijar complemento y de unirse en forma eficiente al receptor Fc expresado por las células NK para mediar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).

Los anticuerpos ejercen su actividad antiviral por una amplia variedad de mecanismos, que actúan en diferentes estadios del ciclo viral: 1) neutralizan las partículas virales antes de que logren entrar a las células permisivas al unirse a las glicoproteínas de la envoltura o a antígenos de la cápside viral, impidiendo la interacción del virus con el receptor en la superficie de la célula blanco. Si el anticuerpo se une a la partícula viral por un sitio diferente al ligando del receptor viral se pueden producir cambios en la conformación de ese sitio, lo que impide la adsorción viral. 2) La neutralización de los

virus también puede ocurrir por agregación o aglutinación de las partículas virales por los anticuerpos, lo que reduce la cantidad de partículas virales infecciosas. 3) luego de la unión de los virus a las células, los anticuerpos neutralizantes pueden interferir con la penetración y el desnudamiento, al inhibir la internalización endocítica de los viriones y la fusión de la envoltura viral con la membrana celular respectivamente. 4) los anticuerpos también pueden opsonizar partículas virales y promover su eliminación mediante fagocitosis a través del receptor Fc o del receptor C3b si el anticuerpo producido es de un isotipo que activa el complemento. 5) las células que expresan antígenos virales en su superficie pueden ser reconocidas por anticuerpos específicos y se convierten en el blanco de las células NK o de los macrófagos que reconocen por sus receptores Fc; esto que lleva a lisis de la célula infectada mediante el mecanismo de ADCC; este fenómeno es potenciado particularmente por los isotipos IgG1 e IgG3. 6) los anticuerpos fijadores de complemento pueden promover la lisis directa de partículas virales libres, mecanismo conocido como virólisis. Adicionalmente, existen reportes que señalan que los anticuerpos pueden interferir con el ciclo viral en el interior de la célula infectada; se ha visto que anticuerpos contra el virus del sarampión suprimen proteínas virales y la síntesis de RNA en células infectadas; en forma similar, anticuerpos contra la proteína E2 del virus Sindbis protege los ratones de la infección letal del sistema nervioso central y elimina virus infecciosos de las neuronas. Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual los anticuerpos interfieren intracelularmente con la replicación viral no está claramente identificado.

A pesar de que existen diferentes mecanismos a través de los cuales los anticuerpos participan en el control de la infección viral es importante resaltar que en un hospedero particular se producen una gran variedad de anticuerpos con diferentes especificidades, afinidades, isotipos y que solo algunos de ellos tienen un efecto antiviral importante. Es por esto, que muchas infecciones naturales contra patógenos virales importantes inducen una respuesta humoral no protectora, como es el caso de la infección producida por el VIH-1 en la cual se induce la producción de títulos de anticuerpos neutralizantes muy bajos, a pesar de que la respuesta humoral es significativa.

Inmunidad mediada por células:

La inmunidad mediada por células es importante para controlar y eliminar la infección viral. Los LT CD8+ citotóxicos y los LT CD4+ Th1 son los principales componentes de la inmunidad antiviral mediada por células. Las células CD4+ sirven como reguladores de la respuesta inmune antiviral al proporcionar las citoquinas necesarias para potenciar los mecanismos efectoros de los LT CD8+ y de las células B.

La respuesta inmune mediada por LT se divide en 3 etapas: en la etapa inicial se da la activación y proliferación de los LT, sigue luego una fase efectora y termina con la fase de regulación negativa de la respuesta. La activación es producto del reconocimiento

de péptidos específicos, generados a partir de proteínas virales que son presentados en el contexto de moléculas del CMH por las CPA, siendo las CD las más importantes en la estimulación de los LT vírgenes. Luego de la activación, los linfocitos proliferan con 3 o 4 divisiones por día para producir el número de células requeridas para controlar la infección; los linfocitos activados en los órganos linfoides deben migrar al sitio de la infección para ejercer el control de la replicación viral. Se ha establecido que las quimoquinas y los respectivos receptores juegan un papel esencial en el tráfico de las células T efectoras. Tanto las células T CD4+ como las CD8+ pueden inducir una respuesta inflamatoria en el sitio de la infección, en forma similar a una reacción de hipersensibilidad retardada. Durante este proceso llegan más células efectoras al sitio de la infección y hay liberación de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias, lo que puede contribuir a daño tisular.

Una vez se ha eliminado el agente infeccioso, el sistema inmune comienza a regular negativamente la respuesta antiviral y a establecer las células de memoria específicas de virus. Los mecanismos involucrados en regular negativamente los linfocitos activados específicos del virus no están claramente identificados; sin embargo, la apoptosis de células activadas y la función ejercida por las células reguladoras parecen ser los responsables de este proceso.

Mecanismos efectores de LT CD4+: En respuesta al reconocimiento de péptidos virales en el contexto del CMH-II los LT CD4+ se diferencian hacia células Th1 o Th2. Las células Th1 producen citoquinas como IL-2, IFN- γ y TNF- α las cuales potencian la inmunidad celular, es decir los mecanismos efectores de macrófagos, de células NK y particularmente de los LT CD8+. De otro lado, las células Th2 potencian la inmunidad humoral mediante la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. El balance que se produce de estas citoquinas tiene un papel fundamental en la patogénesis y en la respuesta inmune a las infecciones virales, donde un predominio del patrón Th1 se ha asociado claramente con resistencia o resolución de infecciones virales.

Mecanismos efectores de LT CD8+: Durante las infecciones virales, las células CD8+ proliferan en forma masiva en respuesta a los antígenos de los virus sintetizados en forma endógena y que se presentan en forma de péptidos asociados a las moléculas del CMH-I en la membrana de la célula infectada. En la mayoría de las infecciones virales, la actividad específica de los CTL se desarrolla 3 a 4 días después de la infección, con un pico máximo a los 7 a 10 días. Para que los LT CD8+ se diferencien a células citotóxicas se requiere de citoquinas producidas por células CD4+ ayudadoras y/o de señales coestimuladoras generadas por las células infectadas. El control antiviral ejercido por los LT CD8+ puede ser a través de mecanismos citolíticos directos o por la secreción de citoquinas antivirales. La efectividad de cada una de estas vías suele depender de la naturaleza del agente viral y del tejido infectado. Sin embargo, el control óptimo de la mayoría de las infecciones requiere de la acción combinada de estos dos mecanismos efectores.



La lisis de las células infectadas puede ser inducida por dos mecanismos: exocitosis de gránulos e interacción de Fas/FasL. La exocitosis granular es dependiente de perforinas y de granzimas A y B que se expresan luego de que las células son activadas y se almacenan en gránulos citoplasmáticos. Una vez ocurre el reconocimiento de la célula infectada, los gránulos migran, se fusionan con la membrana del LT CD8+ y secretan su contenido. La perforina libre se polimeriza y forma un complejo que crea poros en la membrana plasmática de la célula blanco; los canales formados permiten el paso de las granzimas al interior del citosol. Estas enzimas inducen la apoptosis y la muerte de la célula infectada. De otro lado, la unión de Fas con FasL induce la agregación de los dominios de muerte de Fas, que llevan a la activación de las caspasas y a la apoptosis de las células blanco.

Los linfocitos T activados tienen la capacidad de producir grandes cantidades de citoquinas antivirales; los LT CD8+ sintetizan cantidades significativas de quimoquinas, TNF- α e IFN- γ que, como se señaló anteriormente, pueden inhibir la replicación viral a través de diversos mecanismos. Los mecanismos no citolíticos que permiten el control de la replicación viral son muy importantes durante las infecciones de órganos vitales, en la cual se debe evitar la destrucción de tejido. Se ha reportado el control de infecciones virales tales como hepatitis B, adenovirus y HSV a través de citoquinas antivirales.

Inmunopatología

Cuando los virus no causan un efecto citopático severo, el mal funcionamiento y/o destrucción de un órgano que lleva al desarrollo de la enfermedad se debe al establecimiento de la respuesta inmune. La formación de complejos inmunes es una de las manifestaciones inmunopatológicas más frecuentemente asociadas a las infecciones virales. Los anticuerpos pueden formar complejos inmunes al interactuar con los viriones libres o con antígenos virales expresados en la membrana de células infectadas. Estos complejos inmunes pueden ser removidos por los macrófagos, o por el contrario, pueden depositarse en los diferentes tejidos, particularmente cuando se producen como resultado de procesos de infección crónica. La deposición de estos complejos inmunes puede inducir el desarrollo de enfermedades como artritis, glomerulonefritis, etc. Adicionalmente, los complejos inmunes circulantes pueden servir como medio de transporte de viriones infecciosos y así facilitarles la entrada a células permisivas mediante receptores Fc o de receptores para fracciones del complemento.

Por ejemplo, durante la infección por el virus del dengue se ha hecho evidente que diferentes elementos de la respuesta inmune juegan un papel importante en la patogénesis de la fiebre hemorrágica. Para que se desarrolle este proceso inmunopatogénico se ha propuesto el siguiente modelo hipotético: los anticuerpos anti-dengue, al formar

complejos inmunes con el virus, potencian la infección de monocitos y macrófagos a través de receptores. Los LT CD4+ específicos de antígeno son activados e inician la producción de citoquinas como la IL-2 y el IFN- γ ; este último regula positivamente la expresión de moléculas del CMH-I y II y la expresión de receptores Fc γ aumentando la potenciación de la infección mediada por anticuerpos y facilitando el reconocimiento de antígenos virales expresados en las células infectadas por parte de los CTL. Los monocitos activados por IFN- γ producen altos niveles de TNF- α , IL-1 y PAF (Factor Activador de Plaquetas); estas citoquinas son liberados de los monocitos lisados por los CTL. Las plaquetas activadas también puede producir PAF. Por su parte, el TNF- α puede inducir más producción de sí mismo, de IL-1 y de IL-6 garantizando, a su vez, el estímulo para su propia producción. De otro lado, los complejos inmunes mantienen la activación constante del complemento, lo cual induce altos niveles de C3a y C5a que son potentes anafilotoxinas y por lo tanto inducen la liberación de histamina. Se propone que las altas concentraciones de mediadores como IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, PAF, C3a, C5a, e histamina aumentan la permeabilidad vascular, mediando de esta forma el choque hipovolémico y las alteraciones en el sistema de la coagulación que conducen a las manifestaciones hemorrágicas. Durante una nueva infección, por un serotipo diferente, la respuesta inmune puede facilitar y amplificar la infección viral gracias a la presencia de anticuerpos heterotípicos anti-dengue y potenciada por la activación de LT citotóxicos que reaccionan en forma cruzada con distintos serotipos.

Evación de la respuesta inmune

La larga co-evolución de virus y hospederos, y la dependencia que tienen los primeros de los segundos para poder subsistir, ha llevado a que los virus hayan desarrollado varias estrategias para evadir la respuesta inmune; entre las más comunes se destacan las siguientes:

1. Alteración del proceso de maduración de las CD: El virus del sarampión limita la maduración de las CD, induciendo un estado de inmunosupresión que permite la diseminación viral; el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), infecta preferencialmente a las CD lo cual interfiere con la inducción de respuestas citotóxicas efectivas, y favore el establecimiento de una infección crónica.
2. Variación antigénica: los virus pueden alterar sus antígenos por mutaciones puntuales, debido a la poca fidelidad de la RNA polimerasa o de la transcriptasa reversa, fenómeno muy común en los virus RNA como el influenza, el rinovirus y el VIH. Los antígenos que varían, son los que con mayor frecuencia son blanco de los anticuerpos y de las CTL.
3. Inhibición de la expresión del CMH o del proceso de presentación antigénica: se han identificado genes virales que codifican proteínas que modulan la respuesta



inmune. Algunas de esas proteínas inhiben la presentación de antígenos virales a los LT. Por ejemplo, la transcripción de los genes del CMH-I es inhibida por proteínas E1A del adenovirus. Los HSV 1 y 2 producen la proteína ICP47 que se une a TAP e impide que ésta capture péptidos citosólicos y los transporte al retículo endoplásmico, para unirse a las moléculas del CMH-I. La proteína E3 del adenovirus se une a las moléculas del CMH-I, las retiene en el retículo endoplásmico e impide su expresión en la membrana celular. La proteína US3 del CMV humano, secuestra las moléculas del CMH-I en el retículo endoplásmico, y las proteínas US2 y la US11 se unen a las moléculas del CMH-I en el retículo endoplásmico y las transportan al citosol, donde son degradadas por el proteosoma. Dos proteínas del VIH, la Vpu y la Nef, inhiben la expresión del CMH-I en las células infectadas. La proteína Nef de este mismo virus inhibe el transporte del CMH-I desde el aparato de Golgi a la membrana citoplasmática e internaliza estas moléculas desde la superficie de las células infectadas, mientras que la proteína Vpu desestabiliza las moléculas recién sintetizadas. La regulación negativa de las moléculas del CMH-I en la superficie celular, por consecuencia de la infección viral, conlleva a una actividad disminuida de los CTL.

4. Bloqueo de los Interferones: Los virus codifican proteínas que inhiben las cascadas de señalización y los mecanismos efectores inducidos por los interferones. Los virus de Epstein Barr, adenovirus y papiloma entre otros, sintetizan proteínas inhibitorias de la vía de señalización JAK/STAT, lo cual inhibe la transcripción de genes inducida por los interferones. De otra parte, múltiples virus: Reovirus, Rotavirus, influenza, adenovirus, EBV, VIH y HVS contienen genes que codifican péptidos que bloquean las proteínas efectoras PKR, y 2'5' OS (2'5' Oligoadenilato sintetasa).
5. Bloqueo de citoquinas: algunos virus como los poxvirus producen moléculas que actúan como antagonistas al unirse a varias citoquinas, como el IFN- γ , el IFN- α/β , el TNF- α , la IL-1, la IL-18 y quimioquinas. El virus EBV produce una proteína llamada BCRF1, homóloga a la IL-10, mediante la cual suprime la producción de citoquinas Th1.
6. Infección directa de linfocitos o macrófagos que destruyen la célula por mecanismos citolíticos o alteran su función y causan una inmunosupresión generalizada, como el virus de la papera, el sarampión, el EBV, el CMV y el VIH.
7. Evasión de la destrucción mediada por complemento. Los virus codifican proteínas que simulan a los péptidos reguladores del complemento, bloqueando la activación de este y la neutralización de las partículas virales. El virus de la vaccinia secreta una proteína que se une al componente C4b del complemento, e inhibe la vía clásica de activación de esta cascada. El HSV produce una glicoproteína que se une al componente C3b del complemento e inhibe tanto la vía clásica como la alterna. Adicionalmente, virus como el VIH o el CMV humano incorporan en sus envolturas moléculas como el CD59, la cual protege a la célula infectada de ser lisada por el complemento.

8. Inhibición de la apoptosis: este mecanismo de muerte celular programada, es una respuesta celular que limita la replicación y diseminación viral. La apoptosis de células infectadas es inducida por células del sistema innato y adaptativo activadas, tales como los LT citotóxicos y las células NK activadas; su inducción se da a través de la secreción de citoquinas como el TNF- α , perforinas y granzimas, o por la activación de FAS en la célula infectada. Los virus han desarrollado mecanismos virales anti-apoptóticos, como la inhibición de las caspasas, expresión de proteínas homólogas a la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y péptidos bloqueadores de PKR y P53.
9. Inhibición de la función efectora de las células NK: Virus como los CMV humano y murino, codifican las proteínas UL18 y m144 respectivamente; estas proteínas se unen a receptores inhibitorios de las células NK como el LIR-1 (leukocyte immunoglobulin like receptor), lo que conlleva a que células infectadas sean menos propensas a la lisis celular mediada por las células NK. Adicionalmente, la proteína UL40 del CMV humano, promueve la maduración y expresión en la superficie de las células infectadas de la molécula HLA-E, cuyo ligando natural en las células NK, es el receptor inhibitorio CD94/NKG2A, y el efecto es la lisis mediada por estas células. Finalmente, la proteína UL16 codificada por el CMV regula negativamente, en la célula infectada, los ligandos naturales de los receptores activadores de células NK, conocidos como NKG2D.

Cinética de la respuesta antiviral

Aunque las diferentes ramas del sistema inmune tienen distinto grado de importancia en las infecciones producidas por virus, es bien conocido que ante cualquier infección viral generalmente se desencadena una secuencia común de eventos. La respuesta inmune innata es la primera en actuar; aquí las células NK y la producción de IFN- α e IFN- γ tienen un papel central. Adicionalmente, las CPA, gracias a la secreción de quimioquinas, inician el reclutamiento de otras células del sistema inmune para facilitar la respuesta inmune específica. Esta cadena de eventos iniciales se presenta durante los primeros 4 días y su función es limitar la infección y, en la medida de lo posible, impedir su diseminación. En una segunda etapa, la cual ocurre al final de la primera semana después de la infección, se reclutan las células específicas de antígeno, se activan los LT CD8+ citotóxicos y se inicia la producción de inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas con la ayuda de los LT CD4+. En la mayoría de los casos, una vez se desarrolla la respuesta específica, se logra controlar la infección viral y se establece la memoria inmunológica que impedirá futuras reinfecciones por el mismo patógeno.

Es de recalcar que esta secuencia de eventos tiene lugar en diferentes compartimientos corporales con ciertas particularidades: en las mucosas, los factores solubles, en



particular IFN- γ y la IgA son actores esenciales; en circulación, la IgG, la IgM y el complemento neutralizan viriones circulantes o destruyen células infectadas; por último, en los tejidos la respuesta inmune celular, específicamente la respuesta citotóxica, juega el papel central, tanto en el control de la infección como en la inmunopatogénesis de las alteraciones que acompañan el proceso viral.

Inmunidad a la reinfección

La memoria inmunológica generada durante la infección viral primaria, permite que en caso de una segunda exposición al mismo agente se desarrolle una respuesta inmediata y eficaz que impide la reinfección, en la mayoría de los casos. En este momento, la respuesta inmune humoral es el brazo esencial; los anticuerpos específicos se siguen sintetizando por muchos años después de la infección viral inicial y cada uno de los contactos posteriores induce, en forma rápida, un incremento considerable de los títulos circulantes de anticuerpos. Generalmente, el grado de inmunidad adquirida se correlaciona con la cantidad de anticuerpos específicos en la circulación. La respuesta inmune celular de memoria es menos rápida: los LT CD8+ citotóxicos específicos, altamente efectivos en el control de la infección primaria desaparecen rápidamente; sin embargo, los LT CD4+ de memoria permanecen por largos períodos y son éstos los que coordinan, por medio de la secreción de citoquinas, una respuesta inmune humoral y citotóxica rápida, lo suficientemente potente como para impedir la reinfección.

La inmunidad adquirida en muchos casos de infecciones virales es duradera y el individuo es inmune a las reinfecciones por muchos años e inclusive durante toda la vida; sin embargo, existen casos donde esta situación es diferente, como es la infección por el virus de la influenza. Posterior a la infección primaria por una cepa específica de este virus, se genera una potente respuesta inmune celular y humoral de memoria, con anticuerpos y CTL dirigidos contra un epítipo que tiene alta tendencia a la mutación. Estas mutaciones pueden conducir a la aparición de una cepa viral que no es susceptible a la respuesta inmune de memoria, frente a lo cual es necesario empezar la secuencia de eventos de la respuesta inmune primaria. Esto explica el porqué del potencial epidémico y aún pandémico de la influenza, y es un ejemplo claro del papel de la respuesta inmune de memoria.