



FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL:

***EFFECTO DE UNA VACUNA TERAPÉUTICA BASADA EN CÉLULAS
DENDRÍTICAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN LA
INFECCIÓN POR VIH***

*MARIO FRIAS CASAS
Córdoba, 2013*

TITULO: *EFFECTO DE UNA VACUNA TERAPÉUTICA BASADA EN CÉLULAS DENTRITICAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN LA INFECCION POR vih.*

AUTOR: *MARIO FRIAS CASAS*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Efecto de una vacuna terapéutica basada en células dendríticas sobre la respuesta inmune innata en la infección por VIH

DOCTORANDO/A: Manuel Mario Frías Casas

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS:

D. Jose Peña Martínez, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada, Catedrático en Medicina de la Universidad de Córdoba y Jefe de la Unidad Clínica de la Inmunología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba certifica que:

La tesis doctoral ha sido realizada bajo su dirección por D. **Manuel Mario Frías Casas**, Licenciado en Biología y Máster en Metodología de la Investigación en Ciencias de la Salud y se ha desarrollado de manera favorable y eficiente al objeto de estudiar la respuesta inmune innata ante la administración de una vacuna de células dendríticas autólogas a pacientes VIH⁺. El doctorando en estos años a mi juicio ha reunido condiciones suficientes para optar al grado de DOCTOR.

La producción científica derivada de la tesis ha sido:

- 1.Effects of a therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection on innate immunity. *Viral Immunology*.Vol.25(1) 2012
- 2.Effects of a therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection on innate immunity. *AIDS Research and Human Retroviruses*. Vol.27 (10). AIDS 2011 Conference. Bangkok. Tailandia. Octubre 2011.
- 3.Importancia de los diferentes receptores NK en el deterioro de la respuesta inmune innata observada en pacientes VIH⁺ Virémicos. *Inmunología*. Vol.29 (1).2010

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 22 de Mayo de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.: José Peña Martínez

Agradecimientos

En primer lugar agradecer al Dr. Peña la oportunidad que me ha brindado para la realización de esta tesis, por toda su confianza y afán de perfección durante todos estos años.

Al Dr. Rafael González también por ayudarme en muchas ocasiones de manera científica y personal.

Por supuesto también acordarme en este momento de mis compañeros y amigos del laboratorio del Servicio de Inmunología: Carmen, Alejandra, Inma, Silvia, Orlando, Sara, Aurora, Juan, Rocío, Ana, Bárbara y especialmente a Laura con la que he compartido muchos momentos. Esta tesis habría sido muy difícil sin ella.

Agradecer también a todas las técnicas y facultativos del Servicio con las que he compartido momentos muy agradables y divertidos. Gracias a las tres M^a Jose, Rafaela, Rafi, Manolo, Rafa Solana, Corona y por supuesto a mis “madres” en el laboratorio que son Pilar y Marisa, para ellas dos un mundo de sincera gratitud, se preocuparon por mi como el que más y siempre lo recordaré.

Como no acordarme de mis nuevos compañeros del Servicio de Infecciosos que me han acogido de una manera muy entrañable, han depositado su confianza en mí y con los que tengo puestas muchas esperanzas y metas. Gracias a Toto, Ana, Loreto, al gran Ismael, Laurita y por supuesto también a la Dra. Camacho y al Dr. Rivero.

Agradecimiento de corazón a mis amigos de toda la vida que con el paso del tiempo van quedando los que lo son realmente y que son ya parte de mi familia: Bea, Sori, Raúl, Juan, Laura, Javi y Maritere. Obviamente un recuerdo muy especial para mi amiga Sara, tengo la extraña sensación de que has estado muy presente en estos meses y me has “obligado” a hacer esta tesis, nunca te olvidaré doctora.

Mil gracias también a mis cuñados/as, hermana y mujer, sobretodo ésta última que es la que me ha aguantado durante todo este tiempo y la que ha siempre ha creído en mi ciegamente y me ha apoyado en todo. Espero recompensarte como te mereces.

Y finalmente a mis padres, esta tesis no es más que una humilde forma de agradecimiento por vuestro sacrificio durante mi toda mi existencia. GRACIAS.

"De ti aprendí a ser la mano
que da sin recibir, generosa y leal"

A mis padres y
a Sara A.B.

Índice



1. Introducción

1.1 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida: Aspectos epidemiológicos y sociales

1.2 La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1.3 Respuesta inmune frente al VIH-1

1.4 Células NK como parte esencial de la respuesta innata

1.5 Efecto de la infección por VIH-1 en las células NK

1.6 Molécula HLA-G

1.7 HLA-G en la infección por VIH

1.8 Terapias del SIDA

1.9 Vacuna terapéutica basada en células dendríticas

1.10 Vacuna terapéutica CD-DM: Efecto sobre la respuesta adaptativa y ausencia de estudios sobre la respuesta innata

2. Objetivos

3. Pacientes, Materiales y Métodos

3.1 Pacientes y diseño del estudio

3.2 Metodología

3.3 Materiales

3.4 Creación de la vacuna terapéutica de células dendríticas autólogas en el Hospital Clinic

4. Resultados

4.1 Distribución de las subpoblaciones NK

4.2 Expresión de receptores específicos de HLA en células NK

4.3 Concentración de HLA-G soluble

5. Discusión

6.Conclusiones

7.Referencias

8.Anexo

8.1 Abreviaturas

8.2 Grupos de pacientes

8.3 Tablas con porcentajes de Citometría

8.4 Publicación

1. Introducción

1.1 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida: Aspectos epidemiológicos y sociales

En la década de los años 80, el Sarcoma de Kaposi y ciertas neumonías fueron aumentando en número en el área de San Francisco de EEUU. Ante este hecho el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta alertó de la posibilidad de un nuevo patógeno cuya diana fuese el propio sistema inmunológico. En septiembre de 1982 se le denominó a este síndrome con el término SIDA (AIDS) cuyas siglas correspondían al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

Éste, causado por el virus de Inmunodeficiencia Humano (el VIH), es una enfermedad con un alto índice de mortalidad desde los años 80. En concreto con una mortalidad cercana al 100 % en los 5-10 años después del diagnóstico.

Desde entonces se ha recorrido mucho camino en la lucha global contra el VIH/SIDA. Se han desarrollado terapias que ayudan a controlar al virus en el organismo. Sin embargo, la epidemia, sigue afectando a los países Occidentales y a todo el globo.

Según estimaciones de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA publicadas con motivo del Día de SIDA Mundial en el año 2012 había: 34 millones de personas portadoras del VIH, 2.5 millones de personas se infectaron ese año y 1.7 millones de personas murieron de enfermedades relacionadas con el SIDA¹.

¹ (Datos disponibles en http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120_globalreport2012/)

1. Introducción

Mario Frías Casas

En los 30 años transcurridos desde el reconocimiento de la enfermedad se ha trabajado para el cuidado de las personas con la infección de VIH, identificar nuevos procedimientos terapéuticos, estudiar el virus y analizar su patogenicidad, encontrar nuevos instrumentos de diagnóstico, evaluar el papel de posibles coinfecciones, y mitigar los acontecimientos adversos del tratamiento antirretroviral así como prevenir la propia infección de VIH.

Desafortunadamente, los tratamientos para el VIH/SIDA son caros y por tanto de difícil uso en países limitados en recursos. Incluso en países de ingresos altos, el gasto de medicina para el tratamiento de VIH/SIDA hoy representa, según estimaciones recientes, el 62,4 % de coste total contra un 20 % para otras enfermedades crónicas y el coste por persona tratada es el 38 % más alto que el tratamiento de cáncer.

La infección por VIH/SIDA se caracteriza por un descenso de linfocitos T colaboradores CD4 [1-3] que a medida que se hace severa, provoca mayor disfunción del sistema inmunológico que se acompaña de infecciones oportunistas y de ciertos tumores. Así la infección por VIH-1, en principio asintomática, da paso al SIDA, fase en la que aparece aparecen los principales problemas clínicos.

1.2 La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El descubrimiento del virus VIH-1 es relativamente reciente, y se acepta que probablemente el origen de la enfermedad está relacionado con el fenómeno de zoonosis de primates a humanos.

En 1983 en el Instituto Pasteur de Paris consiguieron aislar e identificar un retrovirus [4]. Este virus fue llamado inicialmente como virus asociado a linfomadenopatía (LAV, Lymphadenopathy-associated virus). Un año después el Dr. Robert Gallo del NCI (National Cancer Institute) confirmó el descubrimiento del virus y que este era el causante del SIDA. El virus fue renombrado a virus T-linfotrópico tipo III (HTLV-III) [5, 6].

En 1985 se comprobó que el LAV y el HTLV-III era el mismo virus [7-9]. Finalmente el 23 Mayo de 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus acordó eliminar los nombres anteriores (LAV y HTLV-III). A partir de ese momento el virus del SIDA se conoce como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [10].

Características virológicas

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana pertenece a la familia Retroviridae (Tabla 1a) [11]. Estos virus a su vez son clasificados en siete subfamilias según el ICTV el (Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus) [12]. Una de estas familias, los lentivirus, es el grupo al que pertenece el VIH tipo-1 y 2, que son retrovirus citopáticos que producen la muerte y

1. Introducción

Mario Frías Casas

disfuncionalidad de las células infectadas, especialmente células del sistema inmune lo que originaría de esta forma fenómenos de inmunodeficiencia y otras enfermedades autoinmunes [13]

Subfamilia	Virus
Alpharetrovirus	Virus del Sarcoma de Rous
Gammaretrovirus	Virus Mason Pfizer del simio
Deltaretrovirus	HTLV-I, HTLV-II
Epsilonretrovirus	Virus del Sarcoma Dérmico de Walleye
Lentivirus	VIH-1, VIH-2, SIV
Espumavirus	Espumavirus simio

Tabla 1a: Clasificación de la familia de virus retroviridae.

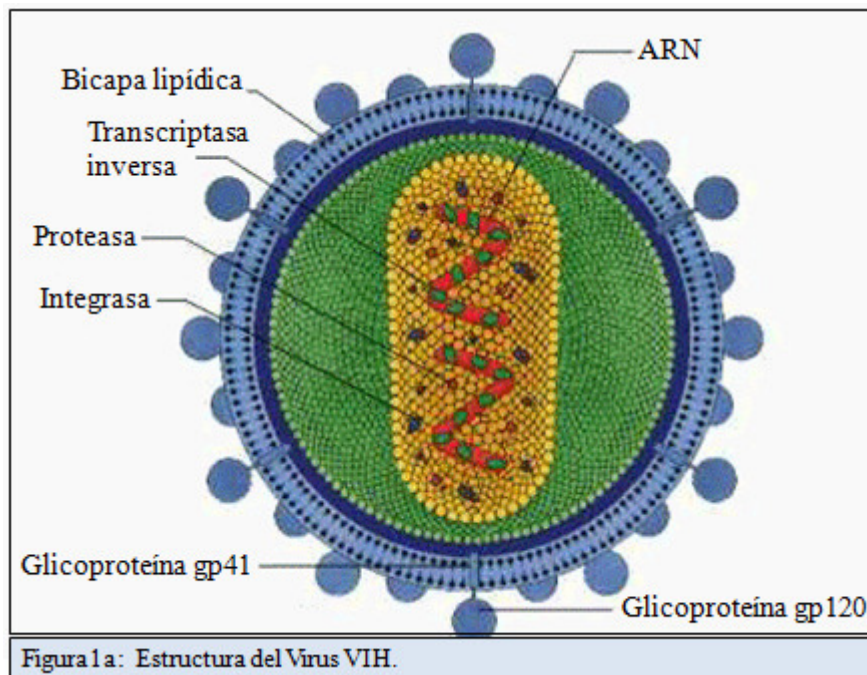
El ciclo vital del VIH tiene dos fases, una como virión infectante cuyo material genético se encuentra en forma de ARN y otra en forma de provirus con ADN, siendo esta forma la característica en los periodos de latencia con viremias persistentes.

El mecanismo de replicación es contrario al de los virus ARN donde la enzima transcriptasa inversa juega un papel fundamental. Utiliza como células huésped a los linfocitos CD4, a los macrófagos, las células nerviosas de la microglía y las células dendríticas de las mucosas también conocidas como células de Langerhans.

Estructura

El virus VIH está compuesto por una capa externa lipídica, una nucleocápside y un núcleo (Figura 1a). La capa externa la componen

proyecciones o prolongaciones de las glicoproteínas gp120 y gp41 que son importantes en el momento de unión entre virus y célula hospedadora. La capa intermedia o nucleocápside constituida por las proteínas y el ácido nucleico estructurados de fuera a dentro como una matriz (p17). El núcleo o capa interior de forma cónica (p24) en cuyo interior está el genoma viral (dos cadenas idénticas de ARN unidas por la P7) y proteínas con función enzimática o reguladora tales como la transcriptasa inversa, integrasa y proteasa [14].



Infección de las células hospedadoras

El ciclo vital del VIH puede definirse bien en siete fases:

- Fusión y entrada a la célula hospedadora
- Síntesis de ADN
- Integración
- Transcripción inversa

1. Introducción

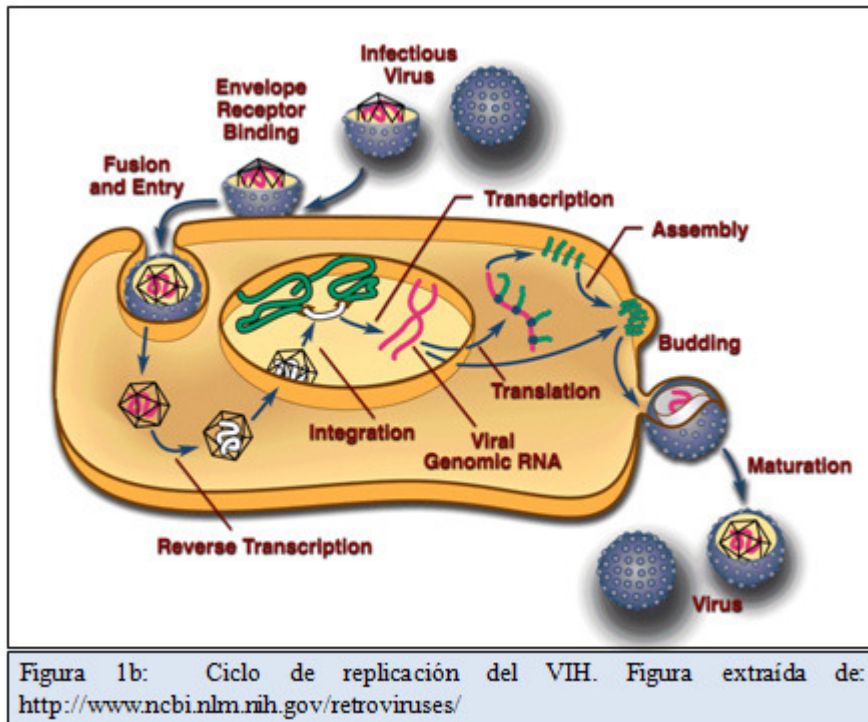
Mario Frías Casas

- Traducción
- Ensamblaje y salida del virus
- Maduración

La gp120 del virión entra en la célula mediante la unión con el receptor CD4 presente en los linfocitos Th (CD4⁺), macrófagos y otras células. Además requiere unirse simultáneamente a otros receptores de quimiocinas como son el CXCR4 y el CCR5. Esto induce un cambio en la gp41 o proteína transmembrana que da lugar a la penetración y denudación de la cápside quedando libre el ARN. Este va a ser posteriormente utilizado por la transcriptasa inversa para la síntesis de una doble cadena de ADN que emigrará al núcleo celular donde va a quedar integrado en su genoma.

De esta fase surge la forma replicativa del VIH, conocida como provirus. Éste transcribe su molde a ARN a través de enzimas como la ARN polimerasa.

Posteriormente, emigrará al citoplasma donde se formarán nuevos viriones que se ensamblarán y liberarán para luego a través de las proteasas madurar y constituir así un virus infeccioso [15-17] (Figura 1b).



Genoma del VIH-1

El genoma del VIH-1 contiene 9 genes potencialmente codificantes, los cuales se transcriben en más de 30 moléculas de ARN de tipo mensajero diferentes y tiene capacidad de codificar proteínas estructurales y enzimáticas comunes a todos los retrovirus, así como proteínas reguladoras [18].

Entre los genes codificantes de proteínas estructurales y enzimáticas, se encuentran: El gen *gag*, que codifica una proteína precursora que sufre un procesamiento proteolítico, tras el cual se generan p24, p17, p7 y p6 que son formas maduras. El gen *pol*, es el que codifica la proteína dimérica p51/p66 que actúa como transcriptasa inversa. El gen *env*, que codifica un precursor altamente glicosilado que da lugar a dos proteínas maduras, la proteína externa gp120 y la transmembránica gp41.

1. Introducción

Mario Frías Casas

Además de estos genes que codifican proteínas estructurales y enzimáticas, el genoma del VIH presenta otros genes que codifican proteínas reguladoras. También existe una porción de RNA que codifica los LTR que son unas secuencias repetidas situadas en ambos extremos del genoma del VIH mediante las cuales el virus regula su replicación en la célula huésped.

Variabilidad del VIH

Una de las principales características de los lentivirus es su enorme diversidad genética. Ello se debe a que el VIH-1 se divide en tres grupos: M, O y N y a su vez el grupo M, que es el responsable de la mayor parte de las infecciones en todo el mundo, posee múltiples subtipos [19-21].

Además el VIH-1 tiene un sorprendente grado de heterogeneidad genómica, que se hace evidente cuando se comparan los virus de diferentes individuos infectados e incluso del mismo individuo. Esta heterogeneidad es debida a que, ya dentro de las células que infecta, la transcriptasa inversa del VIH-1 comete numerosos errores en la copia del RNA viral en DNA. Aunque los clones virales de un mismo individuo están más relacionados entre sí que con clones virales de otros individuos infectados, los niveles de heterogeneidad genética que se dan dentro de una persona son suficientes para producir virus con diferentes propiedades biológicas e inmunológicas.

De todos los productos proteicos del VIH-1, la glicoproteína gp120, es la que presenta una mayor variabilidad genética [22]. La generación de variantes

genéticos es uno de los mecanismos que el VIH-1 usa para evadir la respuesta inmune como veremos más detenidamente.

Además las cepas de VIH-1 diferentes pueden recombinarse, con lo cual se producen amplias variedades genéticas. La recombinación requiere la infección simultánea de una misma célula con virus diferentes y la encapsulación de transcriptos de ARN de cada provirus en un virión heterocigoto.

1.3 Respuesta inmune frente al VIH-1

Cuando el virus consigue replicarse lo hace de manera continua aunque con diferentes intensidades dependiendo de la eficiencia de las defensas inmunológicas del huésped. En el supuesto de que en el individuo infectado por VIH no reciba tratamiento, la infección evoluciona en tres fases o periodos con características propias desde el punto de vista viral e inmunológico. Estas son fase aguda, fase crónica y fase final o de SIDA [23].

Fase aguda o primoinfección

En esta fase, que puede durar entre una y seis semanas, el sistema inmunológico innato intenta detener la infección y aparecen síntomas similares a los de una gripe que en muchos casos pueden pasar desapercibidos [24, 25].

Tras la infección con el VIH se suele producir un aumento brusco de su replicación que da lugar a un aumento del virus en sangre. Después la viremia desciende también bruscamente debido a que los virus se diseminan por el organismo y aparecen los anticuerpos específicos contra éste. Al mismo tiempo, la intensa replicación viral que se produce durante estas primeras semanas de infección, termina produciendo un descenso en el número de linfocitos T CD4 que al ser infectados por el virus, mueren por la acción destructora del mismo.

Durante la primera parte de este periodo se pone en marcha la respuesta inmune innata con intervención de macrófagos, células NK y células dendríticas. Los macrófagos y las células NK desarrollan su actividad citotóxica frente a los virus en su camino de entrada. Las células dendríticas captan los virus y los

transportan a los ganglios locales, lo que reactiva la respuesta adaptativa que se hace patente pasadas varias semanas del contagio [24, 25].

Fase crónica

Esta fase puede extenderse durante varios años y donde hay una intensa actividad humoral y celular. Durante este periodo los ganglios linfáticos son el gran reservorio y allí es donde van a tener lugar los fenómenos de infección y propagación del VIH. Menos de un 1% de los linfocitos afectados sufrirán una replicación activa albergando la mayoría de ellos un genoma proviral latente [25, 26].

La respuesta del sistema defensivo del individuo empieza a tener un progresivo agotamiento y pérdida del control de la replicación viral. Los linfocitos T CD4 van progresivamente disminuyendo.

La respuesta del sistema inmunológico provoca una disminución en la carga viral por una parte pero por otra muchos virus permanecen en estado de latencia durante mucho tiempo, debido a la larga vida media de los linfocitos T CD4 de memoria infectados por el VIH, en donde puede permanecer silente durante más de 40 años, en forma de reservorios virales [25, 26].

Fase avanzada o SIDA

En este periodo ya existe un gran descenso de linfocitos CD4 a la vez que un gran ascenso de carga viral que conllevará a un deterioro progresivo de la respuesta humoral y celular conjuntamente a una disminución de los niveles de anticuerpos. De igual modo, se deterioran la actividad citotóxica CTL, la

1. Introducción

Mario Frías Casas

citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la actividad de las células Natural Killer (NK) que forma parte esencial de la respuesta inmune innata [27-29].

El aumento de la viremia hasta altos niveles conduce a la aparición de manifestaciones clínicas evidentes en forma de infecciones oportunistas y tumores, todo lo cual define el SIDA propiamente dicho. De hecho la inmunodeficiencia que se adquiere llega al extremo de que las infecciones oportunistas son la causa de muerte más importante en estos pacientes.

Una carga viral elevada y la caída del número de T CD4 por debajo de 200 células/ μ l, indican claramente que el sistema inmunológico ha perdido la capacidad de controlar al virus [30-32].

Características de los distintos tipos de respuesta inmune frente al VIH-1

En los pacientes infectados por el VIH se ha descrito una respuesta inmunitaria intensa que abarca prácticamente todos los componentes del sistema defensivo. Esta respuesta es amplia en la fase aguda y crónica, desarrollándose frente a prácticamente todas las proteínas del virus y las células infectadas. Sin embargo, es insuficiente para controlar la replicación del VIH, sobre todo al final de la fase crónica y en la fase de SIDA, periodos en los cuales termina por agotarse.

Respuesta Celular

Esta respuesta es eficiente en las primeras fases de la infección por el VIH pero su deterioro se va acrecentando a lo largo de la fase crónica de la infección y se hace máxima en la fase final o SIDA propiamente dicho. Todo ello en ausencia

de tratamiento, que mitiga profundamente estos cambios. En ella intervienen los linfocitos T CD4/CD8 y las células dendríticas que colaboran en su inicio.

En concreto las células T CD4 son las células centrales en la respuesta inmune por su capacidad de regular otras células como células T CD8, células NK y células B. En las células T CD4, al ser las células que predominantemente infecta el VIH, se produce una disminución cuantitativa del número total de estas células y defectos funcionales importantes de las mismas. Todo ello va aumentando a lo largo de la fase crónica de la infección [33-35].

Finalmente, las células CD4 de sujetos infectados por el VIH-1 son incapaces de responder frente a estímulos antigénicos, expresan muy bajos niveles del receptor de la IL-2 y la producción de linfocinas baja sustancialmente.

Por otra parte las células T CD8 que muestran actividad citotóxica frente a diferentes proteínas estructurales y reguladoras del virus se expanden en los enfermos portadores de VIH. Esta respuesta es intensa y completa, y actúa como filtro en la selección de variantes víricas [36]. También estas células, junto con las NK, liberan quimiocinas que tienen la capacidad de actuar como factores inhibidores del VIH. Algunas de estas quimiocinas se unen a sus receptores en la membrana celular bloqueando la unión a ellos de ciertas proteínas de VIH-1. Con ello bloquean las puertas de entrada en la célula huésped impidiendo así la progresión de la infección, sobre todo en linfocitos T CD4 [37].

Por último las células dendríticas se caracterizan porque son de suma importancia en el inicio de la respuesta inmune frente a virus. Su función es

1. Introducción

Mario Frías Casas

captar a estos virus en la puerta de entrada, generalmente en las mucosas, transportándolos a los ganglios y presentándolos a los linfocitos T. En la infección por VIH, uno de los principales fallos precisamente es que estas células transportadoras del virus a los ganglios linfáticos no destruyen en su camino al virus y consecuentemente infectan a los linfocitos T en los ganglios.

Respuesta humoral

Aunque frente al VIH se produce una respuesta humoral [38], ésta no es eficiente para bloquear la progresión de la infección. Esta incapacidad se debe a que, tanto en la fase crónica como final del SIDA, se produce una disfunción policlonal de las células B. Esto se manifiesta por el elevado número de células que espontáneamente secretan anticuerpos inespecíficos e inútiles llegando a producir una hipergammaglobulinemia policlonal e incluso un agotamiento funcional de las células B [39, 40].

Consecuentemente, se produce una disminución de la eficiencia de la respuesta humoral lo que no excluye que una proporción de células B circulantes produzcan anticuerpos frente al VIH-1. Algunos de estos anticuerpos tienen capacidad neutralizante y por tanto "protectora" aunque desgraciadamente no son muchos los que presentan esta propiedad debido, entre otras cosas, a la variabilidad de estos virus.

Respuesta innata

Este tipo de respuesta interviene, como hemos comentado anteriormente, en la fase aguda de la infección aunque muchos de sus componentes siguen

actuando a lo largo de todo el proceso infeccioso. Como es sabida las células participantes en este tipo de respuesta, son los macrófagos, las células NK y las células dendríticas, entre otras.

Los macrófagos, en los enfermos VIH⁺, presentan defectos en su quimiotaxis, en su capacidad destructiva celular dependiente de anticuerpos (ADCC), en la actividad microbicida intracelular y en la capacidad de producir IFN- γ .

Los macrófagos, al igual que las células T, se infectan vía CD4. Sin embargo, los receptores Fc y del complemento pueden estar también implicados en la infección de macrófagos mediante opsonización del virus.

Las células asesinas naturales (NK) son componentes esenciales del sistema innato que participan activamente en la vigilancia de células infectadas por VIH. Esta acción se lleva a cabo en la fase de infección aguda, pero se mantiene durante todas las fases de la infección.

También se ha indicado el hecho de que la disfunción de NK se asocia en muchos casos con una progresión rápida de la enfermedad y la alta incidencia a infecciones oportunistas, tanto en modelos experimentales como en pacientes infectados por el VIH [41, 42].

Estrategias del VIH-1 frente al sistema inmune

El VIH utiliza estrategias para infectar al huésped y a la vez no ser destruido por sus defensas del mismo:

1. Introducción

Mario Frías Casas

1) El VIH se replica a una alta velocidad con lo cual compite con el sistema inmunológico que tiene que adaptarse a una velocidad muchas veces imposible de lo marcado por el virus. Además cuando el virus se reproduce comete una gran cantidad de errores con lo cual genera tal diversidad de nuevos tipos virales que escapan a la acción vigilante del sistema inmunológico [43]. La consecuencia de todo esto es que el VIH-1 cambia en cada persona que infecta más incluso de lo que lo hace el virus de la gripe en cada una de las pandemias anuales a nivel global. Esto conduce a un "agotamiento" del sistema inmunológico que le hace ineficiente.

2) La capacidad del VIH-1 de pasar a una forma latente al estado de provirus, ocultándose del ataque de las células del sistema inmune. Esto crea una enorme dificultad para el sistema inmunológico que no puede identificar y en consecuencia destruir a las células portadoras del virus, pero que en cualquier momento estos provirus pueden replicarse de nuevo y generar nuevos virus [44].

3) El VIH posee una asombrosa capacidad de evadir al Sistema Inmunológico actuando sobre las células que infecta cambiando las moléculas de superficie para no manifestar que están infectadas y así hacerse menos vulnerables a su destrucción [45, 46].

1.4 Células NK como parte esencial de la respuesta innata

Las células asesinas naturales (NK) forman parte de las células de estirpe linfoide cuya función es importante como mediadoras de la respuesta inmune innata contra virus y células tumorales [47].

Constituyen alrededor del 15% de los linfocitos de sangre periférica y también pueden ser encontradas en el hígado, peritoneo y placenta [47]. Las células NK fueron descubiertas por la habilidad de eliminar espontáneamente a células tumorales in vitro lo cual le dio el nombre de "Natural Killer cells" [48].

La activación de estas células depende enteramente de la interacción de diversos receptores en su superficie (receptores de citoquinas, moléculas de adhesión y receptores de citotoxicidad) con sus respectivos ligandos presentes en la membrana de las células diana como son los tumores y las células infectadas por virus [49, 50].

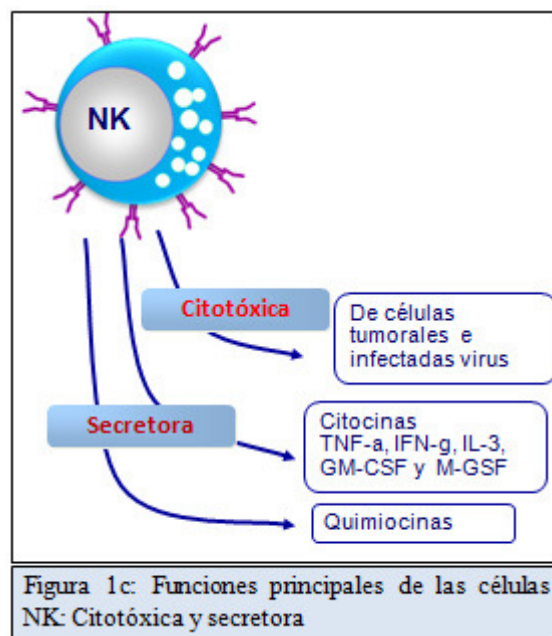
El balance entre la estimulación de receptores inhibidores y activadores en células NK va a ser fundamental en la regulación de la actividad citotóxica y secretora de estas células [49-51].

A pesar de todo, las células NK no sólo van a tener actividad citolítica. Estas pueden liberar diversas quimioquinas como CCL3 (CC-Chemokine ligand 3), CCL4 y CCL5 (también conocida como RANTES) y también otras citoquinas como IFN- γ (Interferon-gamma) y TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Cada uno

1. Introducción

Mario Frías Casas

de estos factores solubles juegan un papel muy importante en inflamación, hematopoyesis y activación de otras células inmunes [52-54] (Figura 1c).



Tipos de Células NK

Hasta ahora, en condiciones normales han sido descritas dos tipos de subpoblaciones NK, clasificadas según la expresión de ciertos marcadores en su superficie, como son CD16 y CD56 [55-57].

Por un lado tenemos a las células *NK bright*, las cuales poseen poca o ninguna expresión de CD16 y alta expresión de CD56 ($CD16^{low/-} CD56^{high}$). Éstas constituyen menos del 10% del total de células NK circulantes y son importantes en la producción de quimioquinas y citoquinas. También producen gran cantidad del *receptor de Interleuquina-2* (IL-2) y también producen grandes cantidades de *Interferon- γ* . Esto explicaría la poca actividad citotóxica de estas *NK bright*

puesto que tienen un papel más enfatizado en la regulación del resto de células de los otros tipos.

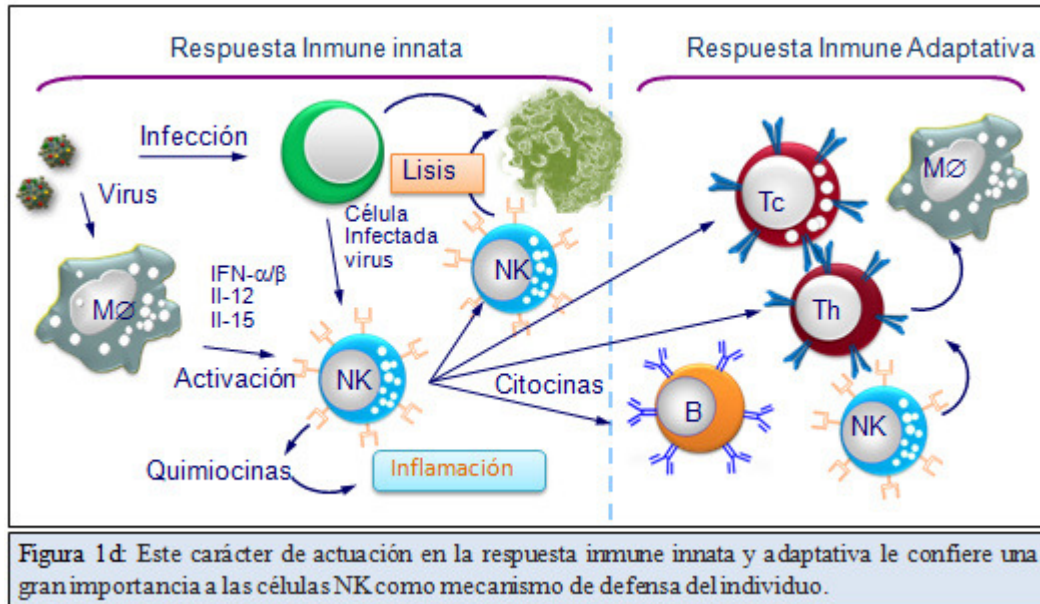
En contraste, existen las células *NK dim*, cuya expresión de CD16 es más alta sin embargo posee poca expresión del marcador CD56 (CD16^{high} CD56^{low}). Al contrario que el anterior tipo, las células *NK dim* constituyen aproximadamente el 90% del total de células NK y son las principales responsables de toda la actividad citolítica y de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) [55, 57].

Debido a su habilidad para producir citoquinas y favorecer la activación de otros tipos celulares, las células NK, son un crucial enlace entre la respuesta innata y adaptativa [54, 58, 59]. Se ha descrito concretamente que las células NK interaccionan directamente con las células dendríticas en el fenómeno denominado cross-talk [54, 58-60].

De esta forma, las células dendríticas activan en cierta manera a las células NK y a su vez éstas secretan citoquinas que ayudan a la maduración de las células dendríticas inmaduras influenciando de esta manera en la activación de la propia respuesta adaptativa (Figura 1d).

1. Introducción

Mario Frías Casas



Ante estas habilidades de las células NK, cabría esperar por parte de éstas un potencial importante en la prevención y control de la infección por VIH-1. Sin embargo a pesar de todo, estas células en los individuos afectados por el virus se encuentran alteradas tanto en forma como función. Pronto se descubrió que el defecto en la función de las células NK estaba asociada con un progreso de la enfermedad [61-63].

Hasta la introducción del TARGA no se logró comparar los efectos de la viremia (paciente virémico sin TARGA/paciente avirémico con TARGA) en la expresión y función de los receptores NK así como los posibles cambios en la distribución de los distintos subtipos de células NK.

Receptores de células NK

Para que las células NK desarrollen su función tienen que identificar a la célula blanco. Para ello las células NK poseen diferentes tipos de receptores con

función de reconocimiento de moléculas en las células blanco y en consecuencia de activar la maquinaria citolítica y/o secretora de estas células. Hoy se conoce que la acción final de las células NK depende del equilibrio entre las señales inhibitoras y activadoras procedentes de sus receptores de superficie.

Entre los receptores de activación de las células NK destacan el CD16, CD80, CD43 y los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) y entre los inhibidores destacan ciertos receptores presentes en las células NK con capacidad de reconocer moléculas de histocompatibilidad.

Receptores de moléculas HLA en células NK

Existen receptores presentes en células NK que reconocen moléculas de histocompatibilidad clase I y que tienen capacidad de activar o de inhibir sus funciones. Precisamente del equilibrio de estas acciones, bien de activación o de inhibición, resultará del efecto final de las células NK, bien desarrollando sus funciones citotóxicas y/o secretoras o bien haciendo que queden bloqueadas [64] (Figura 1e).

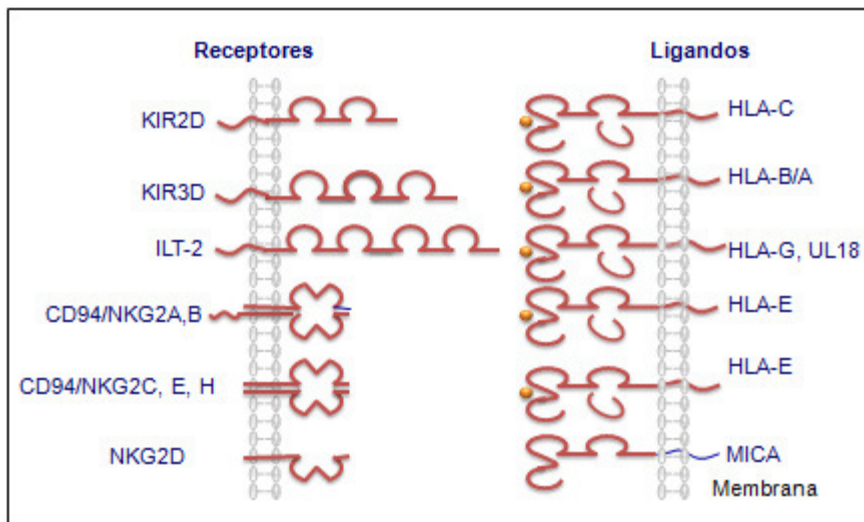


Figura 1e: Representación de los diferentes tipos de receptores NK tipo HLA y sus ligandos que como se ve mayoritariamente son moléculas de tipo HLA

1. Introducción

Mario Frías Casas

Estos datos provienen de las observaciones de Kärre [65, 66], quien utilizando variantes de una misma línea celular tumoral, encontró distinto grado de sensibilidad a la lisis NK, que se correlacionaba inversamente con la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I. Así fue propuesta la teoría de "pérdida de lo propio" (missing self theory). Esto explica el hecho de que las moléculas HLA propias, presente en la mayoría de las células del organismo, inhiban la destrucción de éstas por las células NK. Estos receptores además de expresarse en células NK, se encuentran también en ciertos linfocitos T.

Existen tres familias de estos receptores [64]:

- Receptores tipo KIR (killer cell Ig-like receptors)
- Receptores ILTs (immunoglobulin like transcripts) y
- Receptores tipo lectinas

Receptores NK tipo KIR

Estos receptores fueron descubiertos debido a que estaban implicados en la inhibición de la lisis al interactuar específicamente con determinadas moléculas HLA de clase I de la célula blanco. Pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas [64].

A la palabra KIR, se añaden los sufijos 2D y 3D, que indican el número de los dominios de inmunoglobulina que poseen y la letra L (long) o S (short) según la cola citoplasmática de estas moléculas sea larga o corta respectivamente.

Estos receptores pueden ser de tipo inhibidor o de tipo activador. La distribución de estos receptores en las células NK no es homogénea y cada clon NK puede expresar uno o varios tipos de estos receptores. Se aprecian claras diferencias en la expresión de cada receptor cuando se estudian distintos individuos.

Receptores NK tipo ILT

Este tipo de receptores ILTs (immunoglobulin like transcripts) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, Algunos de estos receptores no sólo reconocen moléculas HLA de tipo I clásicas sino que también reconocen moléculas no clásicas. Pueden ser expresados en monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, T y NK [67].

Uno de ellos conocido como el receptor ILT-2 (LIR-1, CD85j) es el único miembro de esta familia que sólo está expresado en algunas células NK [68-70].

Tiene la capacidad de unirse varios tipos de moléculas HLA de clase I, incluyendo HLA-G. Se reconoce este receptor por tener una función inhibitoria en las células donde es expresado debido a los cuatro motivos ITIM que posee intracitoplasmáticos (immunoreceptor tyrosinebased inhibitory motives) Estos motivos tienen la propiedad de unirse al dominio SH2 que contiene las tirosín-fosfatasas y así producir inhibición de la citotoxicidad por la desfosforilación que producen [68-72].

1. Introducción

Mario Frías Casas

Varios son los trabajos en los que se ha demostrado que este receptor juega un papel muy importante en la infección por VIH donde se ve incrementada su expresión en células NK así como en células CD8 citotóxicas [73-77].

Receptores NK tipo lectina

La tercera familia de receptores NK que se unen a moléculas HLA I son la familia de los receptores tipo lectina. La mayoría de estos receptores son expresados como heterodímeros con CD94 unidos covalentemente a un miembro de la familia NKG2 [78-80].

Al igual que la familia de los KIRs la familia CD94/NKG2 tiene miembros que son tanto activadores como inhibidores. Uno de los miembros inhibidores de esta familia es NKG2A. En concordancia con su función inhibitoria tiene cola intracitoplasmática con motivos ITIM. Las formas activadoras de esta familia son NKG2C, NKG2E y NKG2H [81, 82].

El ligando de CD94/NKG2 es la molécula no clásica HLA-E [81, 82]. Las moléculas HLA-E se caracterizan porque se encuentran asociadas con péptidos derivados de la secuencia líder de las moléculas HLA clase I. Este fenómeno, descubierto por F. Borrego [83], tiene una gran relevancia en el mantenimiento de la identidad inmunológica de cada uno de los individuos.

Se considera a estos receptores de especial importancia en los procesos de regulación de las células NK, debido a la extensa distribución de las moléculas

de histocompatibilidad HLA-E que reconocen y sobre todo por el hecho de encontrarse presentes en un amplio número de células NK (60-80 %).

Al igual que ocurría con el receptor ILT-2, tanto CD94/NKG2A como CD94/NKG2C diversos trabajos han descrito las alteraciones y cambios en su expresión como efecto de la viremia indicando que estos dos receptores son importantes en la defensa contra la infección y progresión de la enfermedad [84, 85].

1.5 Efecto de la infección por VIH-1 en las células NK

Ha sido descrito que el virus VIH-1 para escapar del sistema inmune utiliza como estrategia inducir una baja expresión de las moléculas HLA-A y HLA-B en la superficie de la célula que infectan por lo que la actividad de las células NK sobre estas células sería defectuosa [86, 87]. En contraste con esta situación existe a la vez un incremento de expresión de las moléculas HLA-C y HLA-G como mecanismo de inmunotolerancia y cuya funcionalidad está relacionada con la inhibición de células efectoras, evadiendo de esta manera la acción no sólo de las células NK sino también de los linfocitos T CD8⁺ consiguiendo que el sistema inmune sea incapaz de eliminar células infectadas por el VIH-1 [73, 88].

Además en condiciones de viremia también existe una asociación entre el incremento de expresión de receptores inhibidores de la citotoxicidad específicos de HLA-C lo que conllevaría en un aumento de células que no van a reaccionar ante una célula infectada por el virus [73, 88].

La viremia por VIH induce en las células NK diversas alteraciones tanto fenotípicas como funcionales [88-93]. En diversos estudios se ha descrito que el número de células NK que expresan iNKR_s (receptores NK inhibidores) está aumentado en individuos virémicos [90, 94-96]. Esto sería de gran relevancia puesto que nos encontraríamos que las células NK del paciente VIH-1⁺ no podrían lisis ni eliminar a las células infectadas.

Se han observado células asesinas naturales que en condiciones de alta viremia han visto incrementada la expresión de CD94 (también conocida como KLRD1), ILT-2 (también denominada CD85j) y algunos otros miembros de la familia KIR [90, 95, 97, 98]. Esto tendría un efecto perjudicial para la actividad citolítica de las células NK y por consiguiente la imposibilidad por parte del organismo para controlar la replicación del propio virus.

Por otro lado también se ha descrito que el número de células que expresan estos iNKRs se normalizan en situaciones de control de la viremia bajo tratamiento, dejando claro de esta manera la importancia de la viremia en la expresión acentuada de estos iNKRs.

En cuanto al análisis de receptores activadores (aNKRs) en individuos que no controlan la enfermedad son expresados en menor medida respecto a células NK de individuos sanos. Entre ellos destacan los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) y NKG2A y NKG2D. Al igual que ocurría con los receptores inhibidores la situación se normaliza con los receptores activadores una vez que la replicación se controla por tratamiento.

Proliferación y expansión de una tercera subpoblación CD16^{high}/CD56^{neg}

A la hora de estudiar los cambios fenotípicos observados en las células NK en la infección por VIH-1 se ha demostrado que existe un descenso en el número de células de la subpoblación *NK dim* de función citolítica en detrimento

1. Introducción

Mario Frías Casas

de una tercera subpoblación expandida sólo en estos individuos cuyo fenotipo sería CD16^{high}/CD56^{neg} [92, 93, 99].

Esta subpoblación a pesar de que también aparece en otras infecciones crónicas [100] no ha sido muy estudiada. Se cree que dicha subpoblación ve incrementada su porcentaje respecto al número de NK totales debido a la pérdida de la molécula CD56 por parte del subtipo *NK dim* [101]. Por otro lado también, se ha comprobado que poseen una capacidad citolítica más ajustada respecto al subtipo *NK dim* y una secreción de citoquinas muy baja [102]. Sin embargo a pesar de todo, no han perdido la capacidad de secretar quimioquinas que como hemos visto anteriormente son esenciales en control de la replicación del virus VIH-1 [100].

Interacción entre células NK y células dendríticas.

Diversos estudios han hecho hincapié en la regulación de la maduración y función de las células dendríticas por parte de las células NK, enlazando en cierta manera la respuesta inmune innata con la respuesta adaptativa [54, 60, 103].

Se ha demostrado la capacidad de las células asesinas naturales para eliminar de manera las células dendríticas inmaduras, sin embargo esta capacidad se ve mermada en la infección por VIH-1[104].

Por otro lado se cree que cierta manera las células asesinas naturales no sólo controlarían la maduración de las células dendríticas sino que también

ejercerían una actividad de selección de aquellas células dendríticas más óptimas para su función [54, 59, 103, 105].

Ya de por si la interacción de las células NK y DC en la patogénesis de la infección es un área actualmente activa de investigación por lo que el estudio de las células NK en el contexto de vacuna terapéutica que utiliza las propias células dendríticas como vector es de importancia crucial para observar la propia viabilidad y funcionalidad que pretende dicha inmunización en los pacientes.

1. Introducción

Mario Frías Casas

1.6 Molécula HLA-G

El HLA-G es una molécula que pertenece al Sistema Mayor de Histocompatibilidad. Es clasificada como una molécula de histocompatibilidad de clase I no clásica. Ésta se caracteriza por tener un limitado polimorfismo [106] y una distribución tisular muy restringida [107].

Sistema Mayor de Histocompatibilidad

La discriminación entre lo propio y lo extraño es esencial para que el sistema inmune elimine a cualquier patógeno que invada al organismo una vez que éste es reconocido como ajeno al mismo. Los linfocitos T no son capaces de hacer este reconocimiento directamente sino que precisan de la presentación de los antígenos por parte de las denominadas células presentadoras.

Así, el elemento extraño que consigue penetrar en el organismo es endocitado, procesado por células del sistema monocitomacrófago y expuesto en la cara externa de la membrana plasmática asociado a unas proteínas de membrana llamadas Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA). Esto da lugar a la formación de un complejo HLA-péptido antigénico que ya sí puede ser identificado por los linfocitos T por medio de su receptor específico (RCT) y dar inicio a la respuesta inmune.

El sistema genético que codifica las proteínas de histocompatibilidad es el Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) y está localizado en el brazo

corto del cromosoma 6 [108, 109]. Hay varios grupos de genes dentro del CPH, en nuestro caso son de especial interés los grupos I y II.

Las glicoproteínas de HLA de clase I se encuentran en la membrana de casi todas las células nucleadas y las plaquetas, están compuestas por una cadena pesada alfa y una cadena ligera constante, la beta-2-microglobulina. No expresan este HLA los hematíes, el sincitiotrofoblasto ni los timocitos. Las glicoproteínas del HLA de clase II se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos y están formados por una cadena alfa y otra beta.

El hecho de que los linfocitos T no reconozcan al antígeno más que en combinación con moléculas HLA hace que éstas deban de poseer la cualidad de combinarse con cualquier péptido, aunque la afinidad de esta combinación dependa de la estructura del péptido y del HLA correspondiente.

El HLA de clase I se forma al ensamblarse la cadena alfa y beta-2-microglobulina sobre un fragmento peptídico presente en el citoplasma celular y que es imprescindible para que el ensamblaje se realice. Este péptido puede ser un fragmento de una proteína propia o vírico en una célula infectada, así podríamos decir que el HLA de clase I expresa antígenos procedentes del interior de la célula. En el caso del HLA de clase II, las cadenas alfa y beta se ensamblan independientemente del antígeno en el fagolisosoma, así podríamos decir que expresa antígenos procedentes del exterior de la célula. A su vez, el HLA de clase I se divide en clásico o no clásico. Dentro del primer grupo encontramos el

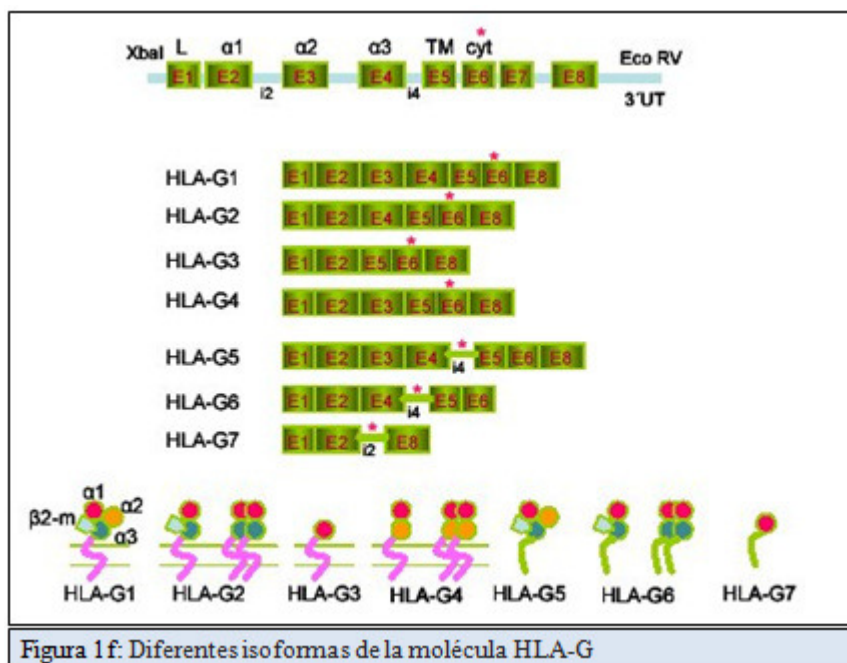
1. Introducción

Mario Frías Casas

HLA-A, el HLA-B y el HLA-C, dentro del segundo grupo están el HLA-E, el HLA-F y el HLA-G [110, 111].

Estructura y función de la molécula HLA-G

La molécula HLA-G se puede expresar en 7 isoformas diferentes de las cuales cuatro están unidas a membrana (G1, G2, G3 y G4) y las otras tres se presentan en forma soluble (G5, G6, G7) [112] (Figura 1f). Entre las diferentes isoformas, HLA-G1 y HLA-G5 son las más expresadas y a la vez las más estudiadas [113]. Sin embargo, HLA-G1 puede ser liberada también como molécula soluble (sHLA-G1) después de escindirse de la membrana celular. De hecho, sHLA-G1 y HLA-G5 son consideradas las más formas solubles más importantes funcionalmente [114].



Bajo circunstancias fisiológicas, la expresión de HLA-G está principalmente detectada en células del trofoblasto placentario [115], aunque

también se puede encontrar en el timo [116], cornea [117], páncreas [118] y en el endotelio [119]. De manera ectópica la expresión de HLA-G en membrana puede también estar detectada en monocitos [120] y en otras células inmunitarias bajo diversas condiciones patológicas como trasplante, tumores, enfermedades autoinmunes e infecciones virales [113, 121].

Actualmente se acepta que la molécula HLA-G puede actuar como inmunomodulador. Se ha demostrado que participa en la tolerancia materno-fetal [122], tolerancia en el trasplante [123], descenso de la respuesta inmune inflamatoria [124], viabilidad de los tumores [125] y también ayuda a las células infectadas por virus a escapar del propio sistema inmune [126].

Entre las propiedades inmunosupresoras más destacadas de HLA-G (tanto de membrana como de forma soluble) se encuentran la habilidad de esta molécula para inhibir la actividad de las CD8 y células NK [127, 128] así como inhibir la proliferación de las células CD4 [129, 130] e inducir a las células T reguladoras [131]. Estos efectos dependen de las interacciones de HLA-G con sus receptores inhibidores específicos como son ILT-2/CD85j, ILT-4/CD85d and KIR2DL4 (CD158d) expresado también en células inmunes [132]. Además interleuquina-10 (IL-10) conocida por ser una citoquina antiinflamatoria induce también la expresión de HLA-G [120].

Basados en estas observaciones el papel que juega HLA-G en fenómenos antiinflamatorios y de inmunomodulación está adquiriendo en los últimos años más atención.

1. Introducción

Mario Frías Casas

Ejerce un papel protector frente a la actividad lítica llevada a cabo por las células NK de la decidua uterina, protegiendo al feto de ser rechazado por la madre y creando un estado de tolerancia [133-136] y tiene una distribución tisular restringida.

Todas las isoformas inhiben la citólisis de células mononucleares de sangre periférica mediadas por células NK [133, 134]. Más recientemente se ha trabajado sobre la implicación de ésta molécula en otros procesos tales como los trasplantes, tumores, infecciones virales y determinados fenómenos inflamatorios.

En el caso de los trasplantes, en algunos trabajos de investigación tales como el realizado por Lila et al [123], se ha demostrado que los enfermos trasplantados de corazón con mayor expresión de HLA-G en las muestras de biopsia miocárdica presentaban menos frecuencia de rechazo agudo y una ausencia total de rechazo crónico con respecto a aquellos en los que no se expresaba dicho HLA. De modo que, consecuentemente, su expresión estaría contribuyendo a la aceptación del órgano trasplantado mediante la inhibición de la acción lítica mediada por las células NK y los linfocitos T, así como mediante la supresión de la respuesta proliferativa alogénica [133, 134, 137]

En el caso de los tumores, la alteración en los patrones de expresión de las moléculas pertenecientes al HLA de clase I y en concreto el HLA-G, podría ser una de las estrategias utilizadas por las células tumorales para escapar de la acción del sistema inmune. Así, protegería frente a la acción lítica de las células

NK y T que frecuentemente infiltran el tumor y evitaría la eliminación de las células tumorales por parte de las células efectoras [133, 138, 139]. Los tumores más estudiados a este respecto han sido el melanoma y los pulmones.

En el caso de los fenómenos inflamatorios, se ha demostrado asociación con procesos cutáneos como la psoriasis, la dermatitis atópica y las miopatías [140].

HLA-G e infección por virus

Los mecanismos de defensa del hospedador son eficientes y eliminan la mayor parte de las infecciones virales. Sin embargo, algunos virus tienen desarrolladas múltiples estrategias para subvertir al propio sistema inmune y expandirse por el organismo [141].

Algunos de estas estrategias consisten en inducir cambios en los niveles y distribución de moléculas HLA de clase I clásicas y no clásicas que protegen a las células infectadas.

Las células infectadas están protegidas contra el ataque de las células NK gracias a las moléculas clase I no clásicas, como el HLA-G. Esta molécula bien expresada en la membrana de la célula infectada o bien en forma soluble tiene la capacidad de suprimir las funciones del sistema inmune, ejerciendo una función inmunosupresora [142, 143]. Esta sería la evidencia más importante de que la molécula HLA-G está implicada en una de las estrategias adoptadas por los virus para evadir el sistema inmune.

1.7 HLA-G en la infección por VIH

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana se asocia con una severa y progresiva pérdida de la función inmune, permitiendo así un alto riesgo de infecciones oportunistas y tumores. Se sabe que el propio virus protege las células infectadas de los CTL así como las células NK induciendo un descenso en la expresión de moléculas clásicas (HLA-A y HLA-B) e induciendo también un aumento en la expresión de moléculas no clásicas como HLA-G.

Desde que se demostró que la molécula HLA-G estaba involucrada en la progresión de la infección ésta ha sido extensamente estudiada. Algunos autores incluyendo el grupo donde se ha desarrollado esta tesis, ha estudiado el papel de esta molécula en la infección por VIH-1 con el objeto de entender mejor la posible implicación de esta molécula en la evasión del virus.

Los estudios se focalizaron en la expresión de HLA-G en monocitos y en linfocitos. Los primeros son relevantes como reservorios y los linfocitos son los más susceptibles a ser infectados por el virus VIH-1. Lozano et al. [46] encontró que la mayoría de monocitos expresaban HLA-G, fenómeno que no ocurría en los individuos sanos.

Posteriormente se estudió la posibilidad de que esto fuera consecuencia de la terapia antirretroviral y se comprobó que los monocitos de personas tratadas expresaban más HLA-G que los pacientes que no recibían TARGA [144]. Ante esto se trató de analizar que fármaco podría ser el causante de dicha expresión. Se encontró que el NRTI era el principal contribuyente de los altos niveles de

HLA-G [145]. Esto hecho se corroboró cuando el número de monocitos que expresaban HLA-G disminuyó gradualmente después de que el NRTI fuera retirado. La causa del cambio de expresión en la superficie celular de HLA-G está actualmente en discusión.

Por otro lado también se comprobó que existía expresión de HLA-G en células T CD8 [146]. Estas células CD8⁺HLA-G⁺ coincidían con el fenotipo de las células T reguladoras descritas por Feger [147].

El polimorfismo de HLA-G en la infección por VIH-1 también ha sido estudiado y varios alelos de HLA-G han sido asociados con el riesgo de infección por VIH-1. Por ejemplo se ha asociado a G-0105N con protección y a G010108 con la susceptibilidad de padecer la infección [148, 149].

Ante esta relevancia demostrada de esta molécula HLA-G en la infección por VIH-1 son esenciales nuevos estudios para conocer mejor la implicación de esta molécula en los fenómenos de tolerancia inmune e inmunosupresión. Siendo observada además la influencia que el tratamiento TARGA induce en la expresión de HLA-G sería necesario comprobar también cómo dicha molécula se comporta ante nuevas inmunizaciones como es el caso de la vacuna terapéutica de células dendríticas.

1.8 Terapias del SIDA

La identificación del entramado molecular responsable del ciclo de reproducción del VIH ha permitido la elaboración de fármacos que bloquean la actividad de enzimas virales y la entrada y salida de los virus a las células hospedadoras.

Entre estas terapias destacan el uso de fármacos antirretrovirales, diversas modalidades de inmunoterapia e incluso procesos de terapia génica aún incipientes [150-152]

Antirretrovirales

Los fármacos que bloquean el ciclo vital del virus celular, han constituyen lo que se viene en denominar Terapia Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA). Éstos pueden actuar concretamente la entrada del virus a la célula, bloqueando la transcripción, integración en el ADN y en el propio ensamblaje de los nuevos viriones. Esta modalidad ha representado un importante avance terapéutico que aunque no es curativa, ya que no erradica la infección, sí disminuyen la replicación viral y retrasan la depresión inmunológica. Esto ha permitido convertir la infección por VIH en una enfermedad crónica controlada. Tienen además de positivo que con ellos se consigue bloquear el contagio de un individuo a su pareja en un 90% e impedir en casi un 100% la transmisión de madre a hijo.

Dependiendo de su mecanismo de acción sobre el ciclo vital del VIH pueden diferenciarse varios medicamentos antirretrovirales como son los inhibidores de la transcriptasa inversa, los inhibidores de la proteasa, inhibidores de entrada y los inhibidores de la integrasa.

Inhibidores de la Transcriptasa Inversa

Como su propio nombre indica, estos fármacos actúan bloqueando la enzima que convierte el ARN del virus en ADN, por lo que de esta forma el material genético del virus no sería traducido y el ciclo vital del virus quedaría completamente paralizado.

Dentro de este grupo de fármacos dependiendo de la forma que en que bloquean a la Transcriptasa Inversa pueden distinguirse tres tipos distintos como son: los análogos de los nucleósidos (ITIAN), los no análogos de nucleósidos (ITINAN) y los análogos de nucleótidos (ITIANt), siendo los ITIAN son los fármacos antirretrovirales más numerosos y son los más utilizadas en las distintas combinaciones del TARGA [153-155]

Inhibidores de la Proteasa

Este tipo de fármaco actúa sobre la enzima viral Proteasa, la cual es la encargada del ensamblaje de las distintas partes del virus que se forman una vez que el ARN ha sido transcrito a ADN por la enzima Transcriptasa Inversa [156, 157].

Desde sus inicios a mediados de los años 90 estos fármacos revolucionaron el tratamiento del VIH puesto junto con los ITI permitían atacar

1. Introducción

Mario Frías Casas

al virus en dos vías importantes de su ciclo vital por lo que los resultados que se obtuvieron en cuanto a la replicación del virus eran muy importantes.

Inhibidores de la entrada o de correceptores

Estos fármacos interfieren en el anclaje del virus a la célula que van a infectar mediante la interacción con los receptores diana que utiliza el virus para entrar en la célula e infectarla. Un ejemplo serían los fármacos que bloquean el receptor CCR5 el cual utiliza el virus para introducirse dentro de la célula hospedadora [158].

Inhibidores de la Integrasa

Esta clase de fármacos no están ampliamente desarrollados. Actúan sobre la integrasa, la cual es la responsable de la propia integración del material genético del virus ya transcrito a ADN por la Transcriptasa Inversa en el genoma de la célula hospedadora.

No son ampliamente utilizados y su uso puede limitarse a determinados pacientes que por ejemplo han desarrollado resistencias a los fármacos anteriormente mencionados [159, 160].

Inhibidores de la maduración

Al igual que los inhibidores de la integrasa no están muy desarrollados. Su mecanismo de acción es similar a la de los inhibidores de la proteasa aunque actúan de manera distinta y se utilizan como refuerzo de éstos.

Terapia combinada

Actualmente se considera que el medio más eficaz para lograr una supresión duradera de la replicación del VIH es la instauración simultánea de combinaciones de diferentes antirretrovirales, con los que el paciente no haya sido tratado previamente. Las actuales recomendaciones se centran en la utilización de una triple terapia conteniendo 2 ITIN+1 IP. Otra modalidad de terapia incluye 2 ITIN+1 ITINAN, ya que esto supone una alternativa para pacientes en los que no puede administrarse un IP o que presentan una carga viral no muy elevada.

Sin embargo, hoy sabemos que el uso de estos tratamientos tiene muchas limitaciones. Entre ellas destacan su alta toxicidad cuando el tratamiento se mantiene por un largo período de tiempo, la aparición frecuente de resistencias virales o la incapacidad de actuar sobre los virus contenido en forma de reservorios en forma de provirus [161]. Todo esto hace que, aunque las terapias antirretrovirales son esenciales en la actualidad no son una solución definitiva.

A estas limitaciones hay que añadir que el TARGA es necesario tomarlo durante toda la vida, lo que desgasta la salud del paciente y, además, supone un enorme gasto para el enfermo representando un esfuerzo imposible en países en vías de desarrollo, donde se acumula el 70% de las personas infectadas por VIH.

Estos contratiempos hacen que sea necesario y urgente por parte de la comunidad científica generar nuevos remedios, entre los cuales destacan claramente el disponer de una vacuna preventiva que evite la infección por VIH-

1. Introducción

Mario Frías Casas

l o bien una vacuna terapéutica que controle la progresión de la infección en pacientes ya infectados [162].

Vacuna preventivas

Desde el descubrimiento del VIH como causante del sida se está intentando elaborar una vacuna preventiva que enseñe al sistema inmunitario a defenderse de este virus, al igual que ha ocurrido con la viruela, la poliomielitis y otras muchas infecciones.

Las vacunas preventivas frente al VIH/SIDA, deben de estar diseñadas con un doble fin. Por una parte deben de enseñar a los linfocitos B a producir anticuerpos neutralizantes frente al virus y por otra parte que permitieran a las células T citotóxicas específicas identificar las células infectadas por el virus y destruirlas [163].

Esta vacuna además debería ser eficaz frente a todos los subtipos de VIH y tener como diana antígenos comunes para múltiples variantes del virus [164]. También debería evitar la transmisión de los virus tanto por vía hematológica como a través de mucosas. La realidad hoy es que debido a las características del VIH-1 y el escaso conocimiento sobre la inmunopatogenia de esta infección, existen serias dificultades para la consecución de una vacuna preventiva. [165, 166].

Las vacunas tradicionales se confeccionaban introduciendo los patógenos completos atenuados para que el Sistema Inmunológico pueda producir

anticuerpos y esté preparado para luchar contra la infección, una vez que ésta se produzca de manera real [167, 168]. Este sistema es válido, siempre y cuando el agente infeccioso no mute. Pero esto no ocurre en la malaria, la gripe o el SIDA.

Por ello en el caso del SIDA la mejor opción podría ser el uso de componentes aisladas del virus inyectados directamente, o bien inyectando genes virales transportados por otros virus inactivados (vectores).

Vacunas terapéuticas

Ante las dificultades arriba indicadas para disponer de una vacuna preventiva frente al VIH-1 y la expectativa de que esta no existirá hasta dentro de cierto tiempo, se ha pensado en generar vacunas de tipo terapéutico. Este tipo de vacunas complementarían a los tratamientos con antirretrovirales o incluso podrían sustituirlos en aquellos enfermos donde su tolerancia a estos tratamientos es menor.

Además debido a que la vacuna sería más económica que lo antirretrovirales, su uso estaría indicado en aquellos enfermos con dificultad por problemas presupuestarios. Sin duda esto representaría una gran ventaja debido a los efectos secundarios y el alto coste de las terapias antirretrovirales usadas y además podría permitir que el tratamiento con este tipo de vacunas llegase a toda la población necesitada, principalmente en el tercer mundo.

Con esta idea en mente se iniciaron los trabajos dirigidos a conseguir este tipo de vacuna curativa en España por el "Grupo Español de Vacunas Terapéuticas y Preventivas contra el SIDA" formado por clínicos, virólogos,

1. Introducción

Mario Frías Casas

inmunólogos y biólogos moleculares procedentes de diferentes centros e instituciones de España y el apoyo de diferentes Instituciones.

Este grupo inició, entre otras actividades, la preparación y ensayo de una vacuna terapéutica basada en células dendríticas autólogas a las que se les inyectó el virus VIH inactivado por calor.

1.9 Vacuna terapéutica basada en células dendríticas

Con la llegada de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha disminuido significativamente la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por VIH-1, incluso en aquellos pacientes afectados de patologías definitorias de SIDA. La utilización del TARGA permite una supresión muy importante de la replicación viral, una recuperación de la cifra de linfocitos CD4⁺ y de las respuestas inmunológicas de las células T frente a infecciones oportunistas.

A pesar de estos beneficios, el TARGA es incapaz de erradicar la infección por VIH y de recuperar las respuestas específicas frente a este [169, 170]. De hecho, tras la retirada del TARGA se produce en todos los casos un aumento rápido de la carga viral [171, 172], lo cual significa que para evitar la progresiva destrucción del sistema inmunitario que la replicación vírica comporta, es necesario administrar TARGA de modo indefinido para suprimir dicha replicación. La administración de por vida de TARGA, aparte del coste económico, es una opción clínicamente muy problemática, por los peligros que comporta de toxicidad a medio y largo plazo y la aparición de resistencias [173]. Ante esta situación, se considera urgente ensayar nuevas estrategias terapéuticas [169].

En concreto, dado que hay evidencias respaldando la hipótesis de que una respuesta anti-VIH-1 de tipo Th1 y CTL sostenidas puede conseguir un control de la replicación vírica, actualmente se considera urgente combinar y/o alternar el TARGA con inmunoterapias activas (vacuna terapéutica) capaces de

1. Introducción

Mario Frías Casas

restaurar/potenciar tales respuestas, para investigar si ello puede ayudar a controlar la replicación vírica en ausencia de TARGA [169, 174].

Por otro lado, es conocida la importancia de las células NK en la patogenia de la infección VIH por su acción antiviral, debido no solo a su capacidad citotóxica frente a células infectadas por VIH y secretora de citocinas [175], sino también a su capacidad secretora de CC-quimiocinas, las cuales suprimen el tropismo CCR5 en la infección HIV [42]. Todo ello regulado por receptores NK de carácter activador o inhibidor [64].

Además, algunos datos sugieren que las funciones presentadoras de antígenos (APC) de las células dendríticas (DC) se encuentran alteradas en los pacientes infectados por VIH-1 y esto podría contribuir a los defectos funcionales observados en las respuestas helper y CTL específicas frente a VIH-1 [176-178]. Además, entre las funciones de las células dendríticas destaca su papel regulador de las células NK y recíprocamente también se sabe que las células NK influyen en la actividad de las CD [58]. Por otra parte, se ha observado que las CD infectadas por VIH no presentan una adecuada maduración, lo que puede contribuir a favorecer la supresión de las respuestas T en los pacientes [179, 180].

Por lo tanto, las CD infectadas por el VIH podrían actuar no solo como un “caballo de Troya” transportando VIH a las células T lo que favorecería su infección, sino que también podría promover la tolerancia de las células T al VIH, todo ello contribuiría al defecto funcional de respuestas helper y CTL

específicas y las alteraciones funcionales y en número de las células NK [178, 181, 182].

Células dendríticas derivadas de monocitos y su utilización como adyuvante celular en inmunoterapia activa en clínica humana.

Los datos anteriores constituyen el fundamento para postular la necesidad de intentar métodos de inmunoterapia activa eficientes para inducir una respuesta anti-VIH-1 de células Th y CTL como un intento para poder lograr un control inmune de la replicación vírica en ausencia de TARGA. A pesar de formas prometedoras experimentales de vacunas terapéuticas frente a VIH-1 en animales y de que algunas de ellas se han probado en humanos no infectados, ninguna se ha demostrado que sea segura para ensayarla en pacientes infectados y a la vez óptima para inducir respuesta Th y CTL anti-VIH-1 [169, 174]. En este sentido, los conocimientos actuales indican que el uso de células dendríticas derivadas de monocitos ex vivo como adyuvante celular natural o fisiológico de antígenos del VIH-1 sería la inmunoterapia activa más potente que pueda actualmente intentarse [183-185].

Las células dendríticas mieloides (CD) son las células procesadoras y presentadoras de antígeno (APC) profesionales más potentes, y únicas por su capacidad de inducir respuestas primarias y secundarias de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ in vivo e in vitro [183-186]. Una gran variedad de datos experimentales en sistemas in vivo e in vitro han mostrado que son capaces de capturar proteínas solubles exógenas, lisados de células tumorales, así como virus inactivados y células apoptóticas infectadas por virus y presentar dichos antígenos, con una

1. Introducción

Mario Frías Casas

particular eficacia a las células T CD4 vía moléculas MHC (Major Histocompatibility Complex) de clase II, y que también los presentan a los linfocitos T CD8⁺ vía moléculas MHC-clase I [183-188]. Esta capacidad de presentar material antigénico no infeccioso capturado por la vía exógena, a linfocitos T CD8⁺ vía moléculas MHC-clase I, depende de mecanismos no bien conocidos que permiten el paso del antígeno desde la vía endosómica al compartimento citosólico para ser degradados por el proteosoma, lo que también se ha denominado “presentación cruzada” [183-186].

Recientemente el estudio de las células dendríticas mieloides humanas y su potencial utilización clínica se ha visto extraordinariamente facilitada por la capacidad de generarlas a partir de monocitos, mediante un simple cultivo de 7-8 días en presencia de IL-4 y GM-CSF [189, 190]. Existe una gran variedad de datos sobre la eficacia de las células dendríticas en sistemas experimentales para inducir inmunidad frente a tumores, y se está llevando a cabo una intensísima investigación para utilizarlas combinadas con procedimientos de modificación génica mediante vectores víricos para que expresen determinados antígenos tumorales y/o citocinas promotoras de respuestas Th1 y CTL [191-193]. Existe igualmente una gran cantidad de estudios experimentales acerca de la gran potencia de las células dendríticas autólogas pulsadas ex vivo para inducir respuesta de células T in vivo frente a patógenos intracelulares, incluidos virus inactivados y bacterias muertas [194, 195].

Actualmente la obtención de las células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM) ex vivo para su utilización en clínica humana puede hacerse en condiciones GMP de modo relativamente fácil, como se comprueba en estudios in vitro realizados en los últimos años y como otros han descrito [196-198]. Hay además, dos estudios recientes en individuos no infectados a los que se administró las CD-DM generadas y pulsadas ex vivo con toxoide tetánico, KLH y una proteína del virus de la gripe por inyección subcutánea (1-4 millones/inyección en 0'2 ml) [194]. Estos estudios han demostrado por primera vez: a) la potencia de una simple inmunización con CD-DM para conseguir una rápida expansión de la inmunidad de células Th y CTL en personas sanas frente a antígenos exógenos, y su mayor potenciación con una dosis de recuerdo; b) la ausencia de toxicidad y efectos secundarios de este procedimiento; c) la factibilidad y eficacia de una simple inyección cutánea en la parte externa del brazo, sin necesidad de procedimientos agresivos como infusión de grandes números de células por vía endovenosa o inyección intranodal, como se ha hecho en pacientes con neoplasias.

Los datos anteriores indican que la administración subcutánea de CD-DM generadas y pulsadas ex vivo con antígenos microbianos es factible y no conlleva efectos adversos ni indeseables en individuos normales y por tanto apoya el uso de este procedimiento para inducir respuesta adaptativa e innata frente al VIH-1. Como ya se ha mencionado previamente algunos datos sugieren que las funciones presentadoras de antígenos están alteradas en pacientes infectados por VIH [176-178] y que el VIH-1 se une a las células dendríticas lo que aumentaría

1. Introducción

Mario Frías Casas

su infectividad ya que las células T se infectarían cuando se produce la presentación antigénica [199]. Estos datos explicarían los defectos funcionales de las células colaboradoras o helper y CTL en los individuos infectados por VIH-1. Una vacuna terapéutica con células dendríticas autólogas generadas ex vivo y pulsadas con virus inactivados podría servir para solventar tales problemas, ya que permitiría a las células dendríticas presentar los antígenos VIH-1 en ausencia de virus infecciosos. Estudios previos del grupo del Hospital Clinic y otros grupos realizados in vitro indican que CD derivadas de monocitos de sangre periférica no están infectados [200] y que en este tipo de pacientes el rendimiento y características funcionales y fenotípicas de las CD-DM son indistinguibles de los individuos normales, y que muestran una potente capacidad para inducir respuesta de células T CD4 y CD8 en dichos enfermos, particularmente de células T CD4 [201-205].

Por todo lo anterior, se puede concluir que los estudios que mejor demuestran la capacidad de una vacuna terapéutica de incrementar la inmunidad específica de forma eficaz para el control de la replicación viral ha sido la utilización de una vacuna de células dendríticas (CD).

Los resultados obtenidos hasta ahora por el grupo DCV2/MANON07-ORVACS son los primeros resultados sobre este tipo de vacunas en pacientes infectados por VIH. Aunque son los resultados en vacunas terapéuticas más prometedores hasta la fecha, sólo significan el comienzo de una línea de

investigación que puede ser puede ser muy fructífera, tanto desde el punto de vista patogénico como clínico.

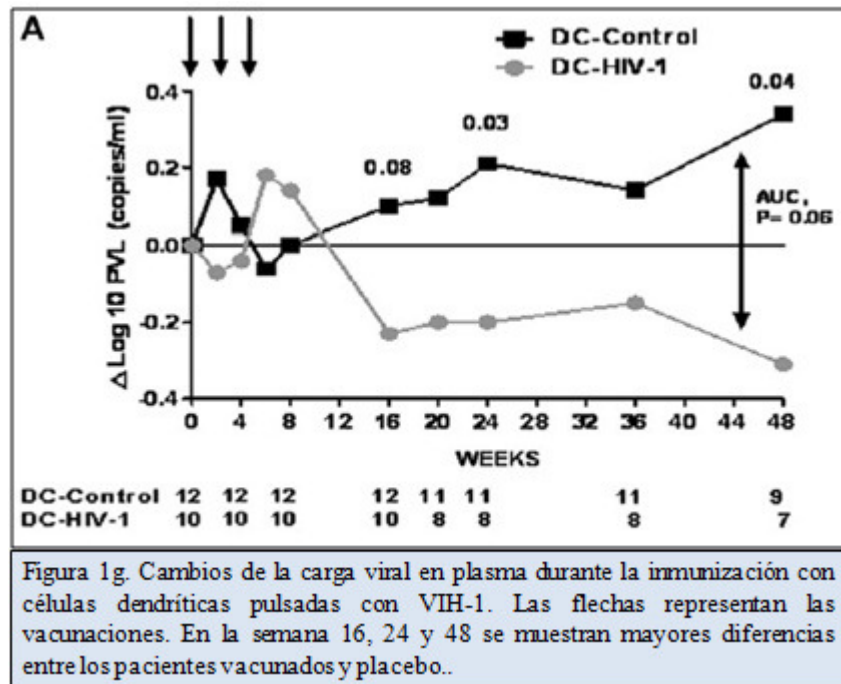
1.10 Vacuna terapéutica CD-DM: Efecto sobre la respuesta adaptativa y ausencia de estudios sobre la respuesta innata.

Ante los antecedentes muy positivos relacionados con las terapias de células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM), el grupo DCV2/MANON07-ORVACS diseñó una vacuna terapéutica basada en la administración de células dendríticas autólogas pulsadas con virus VIH inactivado por calor.

Los primeros resultados sobre esta vacuna de células dendríticas fueron publicados en la revista *Journal of Infectious Diseases* [206] y en ellos se muestran la influencia que dicha inmunización ejerce sobre parámetros importantes como son la carga viral y la respuesta específica al virus VIH-1. Ambos parámetros fueron comparados entre los pacientes que recibieron inmunizaciones con la vacuna y los pacientes que sólo recibieron placebo que consistió en administrar a estos pacientes células dendríticas sin pulsar.

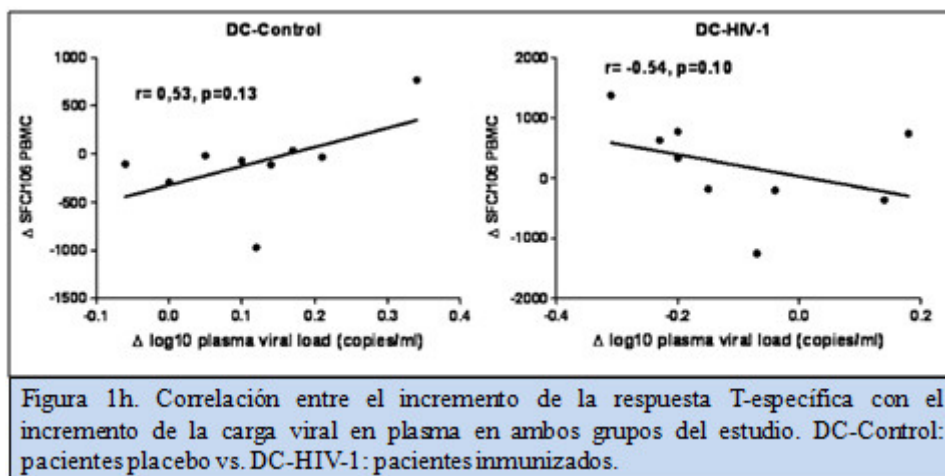
Cambios en la carga viral después de las inmunizaciones

Al comparar los valores obtenidos de carga viral de cada uno de los pacientes en ambos grupos se observó que aquellos pacientes que recibieron las inmunizaciones vieron disminuida su carga viral en plasma desde de 0.23 a 0.31 log₁₀ RNA copias/mL. Por el contrario los pacientes que recibieron el placebo vieron aumentada esta carga viral desde 0.10 a 0.34 (Figura 1).



Cambios en la respuesta VIH-1 específica después de las inmunizaciones

Después de las vacunaciones el incremento de la respuesta T-específica en el grupo inmunizado comparado con el grupo control fue mayor en la mayoría de las semanas posteriores a la vacunación con células dendríticas. Además el incremento de la respuesta T-específica fue inversamente correlacionado con el descenso de la carga viral en los pacientes vacunados. (Figure 2)



1. Introducción

Mario Frías Casas

Estos resultados demuestran que dicha vacuna fue factible, segura y bien tolerada y aunque los cambios en la carga viral son pequeños dichos cambios fueron mantenidos desde gran parte de la duración del seguimiento de 48 semanas. Además dicho descenso de la carga viral tiende a ser inversamente correlacionado con un modesto incremento de la respuesta T-específica.

Justificación para analizar el efecto de la vacuna CD-DM sobre la respuesta inmune innata

Si bien respecto a la respuesta adaptativa se han encontrado resultados positivos en la administración de esta vacuna sería de vital importancia estudiar la posible influencia que tendría dicha inmunización en una pieza esencial la respuesta inmune innata como serían las células NK.

Además, hasta ahora, no sólo en el estudio de esta vacuna, sino que tampoco en los trabajos publicados referentes a otras vacunas terapéuticas para VIH-1 no se han estudiado las células NK a pesar de que como decimos son parte fundamental de la defensa frente a infecciones virales como parte de la respuesta innata y como brazo ejecutor de la activación de la respuesta adaptativa ya que existe una importante interacción entre las células NK y las propias células dendríticas.

2. Objetivos



Objetivo principal

La respuesta inmune innata no ha sido estudiada con anterioridad en los protocolos de vacunas, a pesar de que existe una clara participación de esta respuesta inmune en la defensa frente al virus VIH. Por ello el objetivo principal ha sido:

- Comprobar si la vacuna terapéutica de células dendríticas autólogas derivadas de monocitos pulsadas con virus VIH-1 autólogo induce variaciones en la respuesta inmune innata, analizada a través de las células NK, sus receptores y la molécula HLA-G.

Objetivos concretos

Analizar los cambios:

- en la distribución de las subpoblaciones NK ($CD56^{dim}$, $CD56^{bright}$, $CD56^{neg}$) de los pacientes que han recibido la vacuna terapéutica frente al VIH.
- en la expresión de receptores en células NK específicos de moléculas HLA (CD94-NKG2A, CD94-NKG2C e ILT-2/CD85j) en los pacientes que han recibido la vacuna terapéutica frente al VIH.
- En los niveles de la molécula HLA-G soluble en plasma entre los pacientes que recibieron la vacuna.

3. Pacientes, Materiales y Métodos



3.1 Pacientes y diseño del estudio

Fueron reclutados para el estudio 22 pacientes (12 placebo y 10 vacunados) VIH-1⁺ crónicos procedentes de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic (Barcelona, España) y que no habían recibido ningún tratamiento antirretroviral en al menos dos años. Todos poseen un recuento basal de linfocitos T CD4⁺ por encima de 450/ μ L (linfocitos T nadir por encima de 350 copias/ μ L) y una carga viral plasmática (CVP) por encima de 10.000 copias ARN VIH/mL. Se excluyeron los pacientes que tuvieran algún síntoma de la categoría B o C de la clasificación de los CDC de 1993.

Los pacientes fueron seleccionados aleatoriamente para recibir a ciegas tres vacunas, en intervalos de 2 semanas, con un mínimo de 8×10^6 células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM) pulsadas con virus autólogo inactivado por calor (109 copias/dosis) exceptuando a los pacientes placebo que recibían la misma vacuna pero con las CD-DM sin pulsar. Las muestras de sangre se obtuvieron en las semanas -2, -1, 1, 3, 16, 24 y 48 para las determinaciones inmunológicas referentes a las células NK y sus receptores reguladores de la citotoxicidad (Figura 3a). La semana -1 se consideró siempre como punto basal exceptuando en aquellos pacientes que no poseían muestras de esa semana en los que se tomó como punto basal la semana -2. Los objetivos y otros aspectos del estudio fueron explicados a los pacientes en detalle, y todos dieron por escrito su consentimiento informado antes de participar en el mismo.

3. Materiales y métodos

Mario Frías Casas

El estudio fue aprobado por la junta de revisión ética institucional del Hospital Clinic de Barcelona y por las autoridades reguladoras españolas.

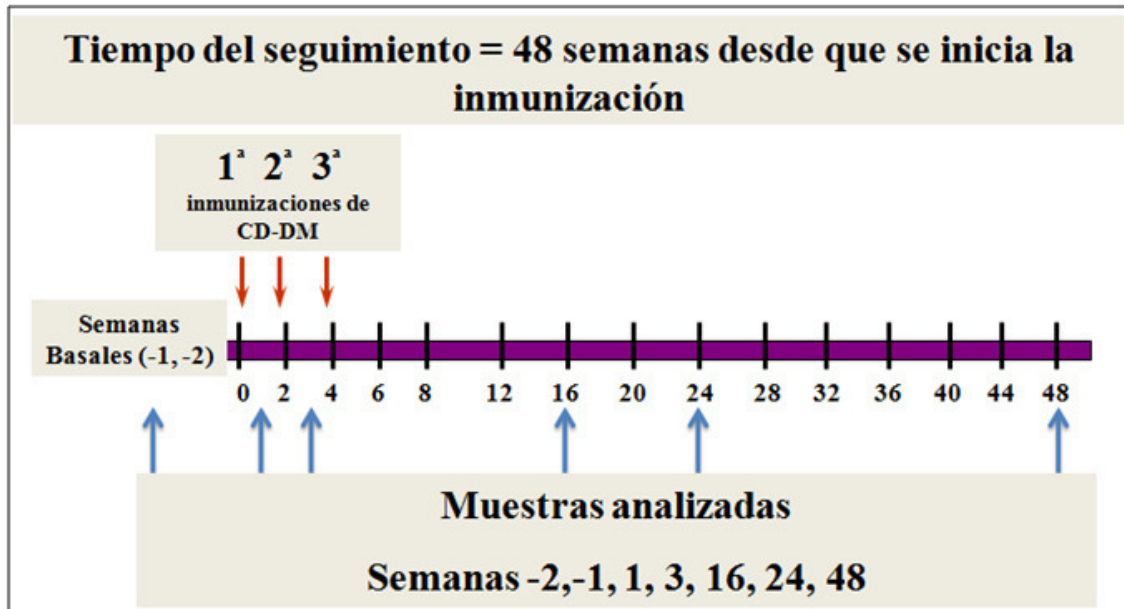


Figura 3a: Esquema representativo del diseño del estudio detallando las semanas de inmunización, las semanas de duración del seguimiento y las semanas analizadas.

3.2 Metodología

Aislamiento y congelación de Leucocitos de la sangre periférica.

Células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron aisladas de muestras de 150 ml de sangre venosa con EDTA mediante centrifugación estándar por gradiente de Ficoll en los 23 pacientes VIH-1. Las células fueron congeladas a -80°C durante una semana y posteriormente criopreservadas en nitrógeno líquido a -200°C para su transporte y procesamiento. Las PBMC criopreservadas se descongelaron y lavaron con PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 1% y 2 mM EDTA (tampón FACS). Nuestro laboratorio recibió muestras de PBMC de las semanas -2,-1, 3, 16, 24 y 48.

Muestras de plasma

La sangre total se recogió en tubos EDTA de los cuales se obtuvo el plasma centrifugando a 1800 rpm recogiendo la fracción soluble. Posteriormente se almacenaron en criotubos a una temperatura de -80°C . A nuestro laboratorio les fueron asignadas las muestras de plasma de las semanas -1, 16 y 24.

Análisis de las células NK por citometría de flujo

Para la adquisición de las células NK se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) de 4 colores, calibrando los distintos

3. Materiales y métodos

Mario Frías Casas

parámetros con fluoroesferas para calibración (Calli-Brite Beads Becton Dickinson) según el programa Facs comp. 4.0.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células mononucleares previamente aisladas fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales a 4°C en oscuridad durante 20 minutos. Las muestras se lavaron con 1 ml de PBS estéril (1500rpm 5 minutos), se resuspendieron en 500µl de Facs Flow y se fijaron con paraformaldehído al 4%. En todos los casos, controles de isotipo se incluyeron en los experimentos.

Panel de anticuerpos monoclonales

El panel de anticuerpos utilizado en el ensayo de inmunofluorescencia estaba compuesto por cuatro tubos cuya combinación de anticuerpos se distribuyó de la siguiente manera:

- 1) Controles isotipo: (FITC¹) + (PE²) + (PerCp³) + (APC⁴)
- 2) CD94 (FITC) + NKG2A (PE) + CD3 (PerCp) + CD56 (APC)
- 3) CD94 (FITC) + NKG2C (PE) + CD3 (PerCp) + CD56 (APC)
- 4) CD16 (FITC) + CD85j (PE) + CD4 (PerCp) + CD56 (APC)

¹ Fluorescein isothiocyanate

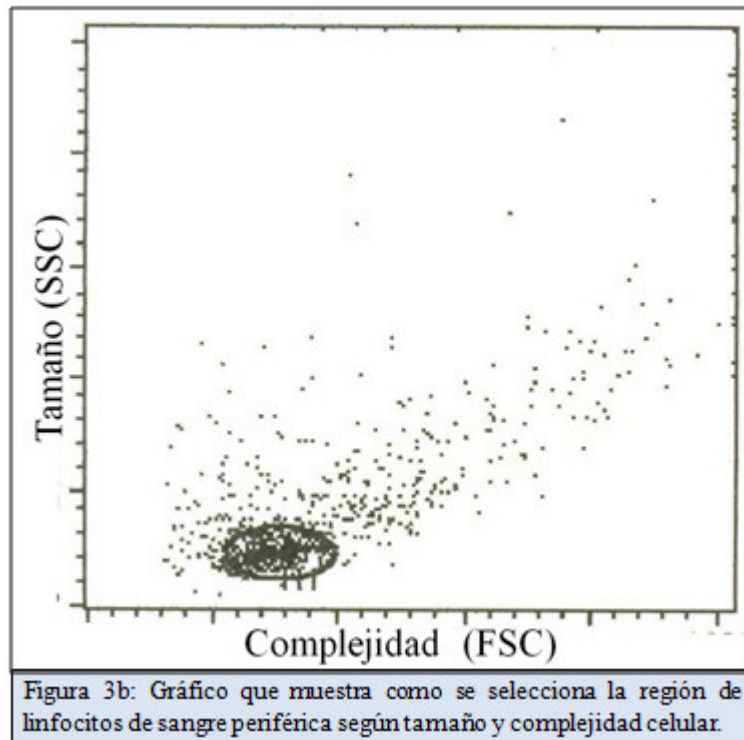
² Phycoerythrin

³ Peridinin chlorophyll

⁴ Allophycocyanin

Delimitación de la región linfocitaria

Una vez marcadas las células se adquirieron unas 50000 células por tubo por el citómetro de flujo FACScalibur y se seleccionaron los linfocitos de sangre periférica según los parámetros de tamaño y complejidad (Figura 3b).

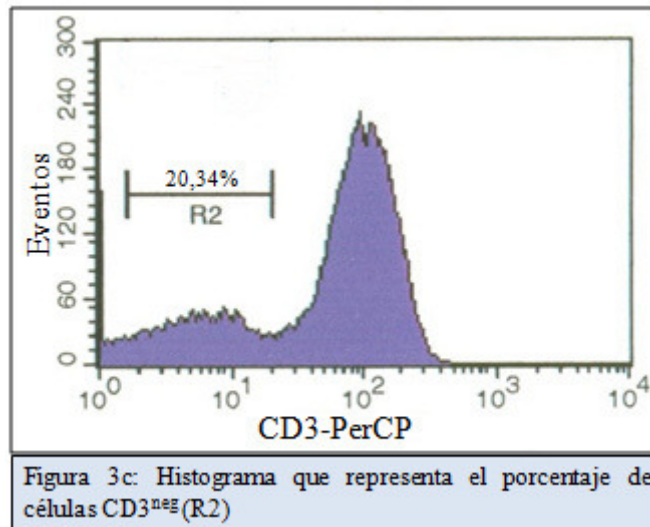


Determinación de subpoblaciones NK

Las subpoblaciones de células NK fueron definidas en función de la expresión de los marcadores de superficie CD3, CD16 y CD56. En primer lugar con los linfocitos seleccionados según tamaño y complejidad se seleccionaron las células CD3^{neg} mediante un histograma (Figura 3c).

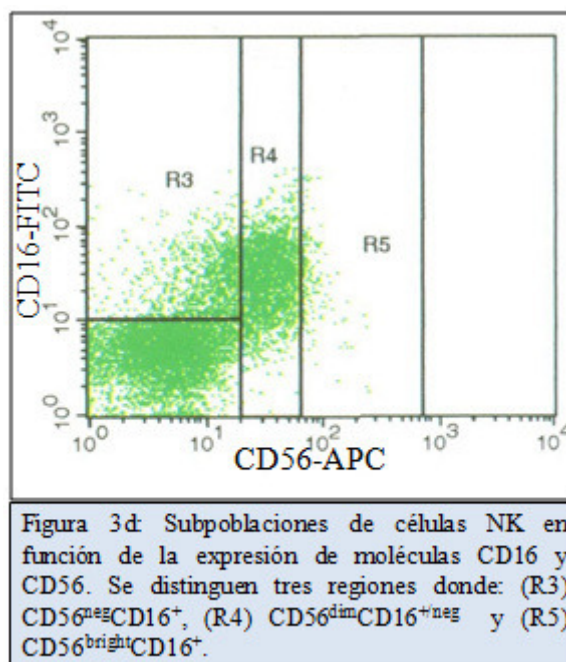
3. Materiales y métodos

Mario Frías Casas



Una vez seleccionadas las células CD3^{neg} se pasó a determinar cada una de las subpoblaciones NK.

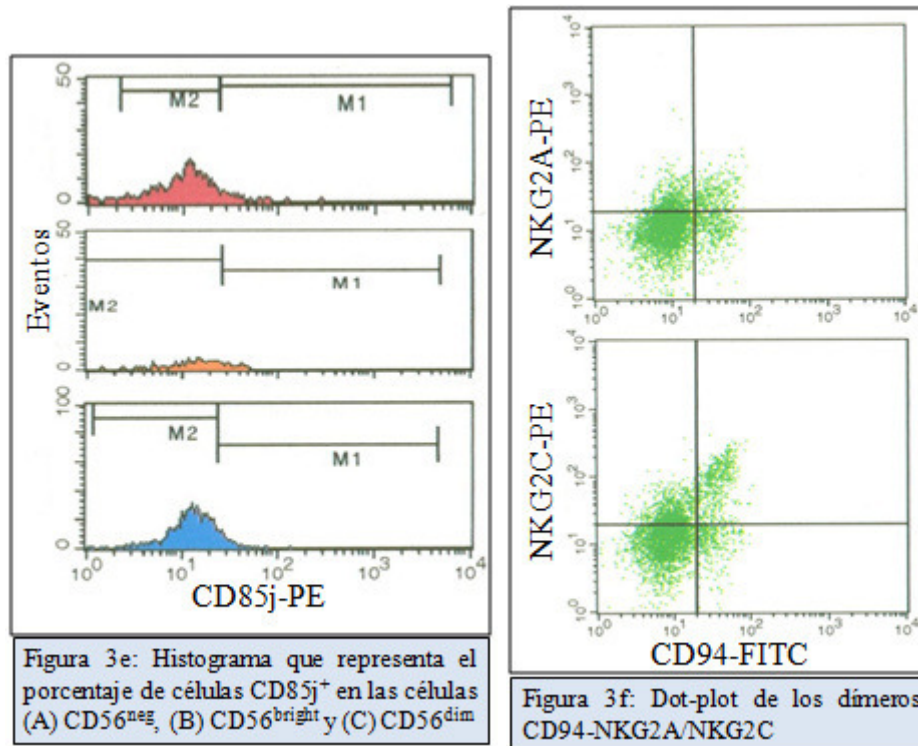
Las células CD56^{bright} se clasificaron como CD3^{neg} CD16^{pos/neg} CD56⁺⁺⁺, la subpoblación NK CD56^{dim} como CD3^{neg} CD16^{pos} CD56⁺ y por último se consideró como NK CD56^{neg} aquellas que poseían un fenotipo CD3^{neg} CD16^{pos} CD56^{neg} (Figura 3d).



Determinación de la expresión de receptores NK

A continuación se midió el porcentaje de células que expresan receptores reguladores de la citotoxicidad ILT-2/CD85j (Figura 3e), y los dímeros CD94-NKG2A y CD94-NKG2C (Figura 3f).

Estas mediciones se hicieron en cada una de subpoblaciones de células NK determinadas previamente.



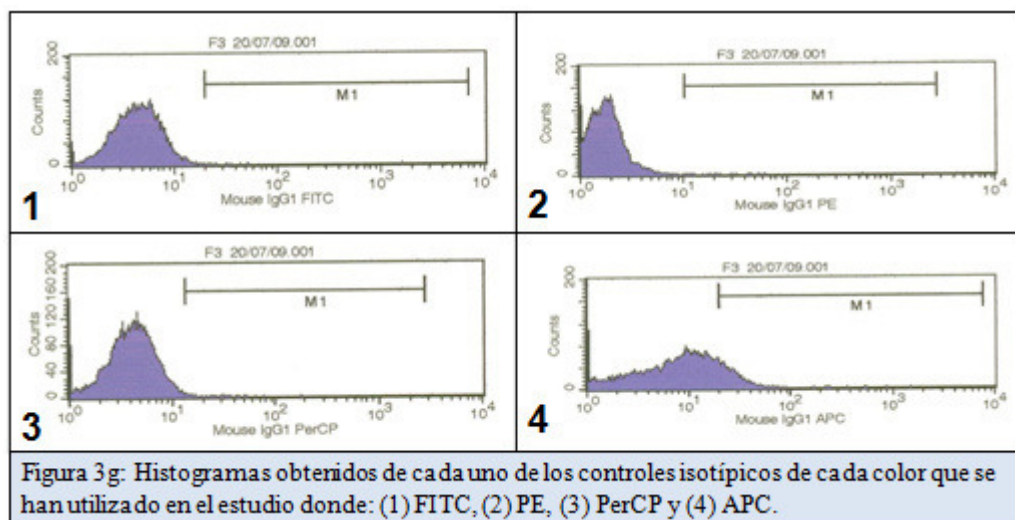
Para los tubos 2 y 3 no se pudo determinar la expresión de los dímeros CD94-NKG2A y CD94-NKG2C en la subpoblación CD56^{neg} debido a la imposibilidad de utilizar más de 4 colores en el citómetro.

3. Materiales y métodos

Mario Frías Casas

Controles isotípicos

En todas las mediciones realizadas para cada paciente se realizaron controles isotípicos (Figura 3g). La finalidad de estos controles isotípicos no es otra que evitar el posible sesgo que puede existir en cuanto a las posibles uniones inespecíficas de cada uno de los anticuerpos utilizados en el estudio.



Software de análisis

Los datos de citometría de flujo fueron procesados utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.). Todos los resultados obtenidos de este análisis, relacionado con las subpoblaciones celulares y sus receptores, se expresan como porcentajes.

Cuantificación de la molécula soluble HLA-G

La cuantificación de HLA-G soluble se realizó mediante ELISA en una placa de 96 pocillos previamente marcada con el anticuerpo MEMG-9, el cual reconoce las isoformas solubles de HLA-G como son G1 y G5. Para el diseño de

la curva de calibración se reconstituyó la proteína standard en una solución de stock de la que posteriormente se realizaron sucesivas diluciones (Tabla 3a).

Volumen del Standard	Tampón dilución	Concentración
Solución Stock	--	625,0 U/ml
100 µl Stock	400 µl	125,0 U/ml
250 µl de 125,0 U/ml	250 µl	62,50 U/ml
250 µl de 62,50 U/ml	250 µl	31,25 U/ml
250 µl de 31,25 U/ml	250 µl	15,63 U/ml
250 µl de 15,63 U/ml	250 µl	7,81 U/ml
250 µl de 7,81 U/ml	250 µl	3,91 U/ml

Tabla 3a: Se muestran las diluciones de la solución stock para el diseño de la curva standard.

Estudio estadístico

El análisis estadístico se realizó a través del software estadístico IBM SPSS (versión 18.0.0). Se utilizó el test Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de las variables. En el caso de variables con distribución normal se compararon con el test T de Student. Cuando las variables no presentaban una distribución se compararon con el test no paramétrico de U de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

3. Materiales y métodos

Mario Frías Casas

3.3 Materiales

Soluciones

- Tampón fosfato salino pH 7.3 (Phosphate buffer saline; PBS)
- Solución de lavado FACS Flow (Becton Dickinson) utilizada para la adquisición de las muestras por citometría de flujo.
- Solución fijadora: Paraformaldehído (Sigma) diluida al 1 % en PBS.

Controles de fluorescencia

- Control isotipo IgG2a de ratón conjugado con FITC/PE
- Control isotipo IgG2a de ratón conjugado con PerCP
- Control isotipo IgG1 de ratón conjugado con APC

Anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo

- Anticuerpos para determinación de subpoblaciones NK: anti-CD3-PerCP (clon SK7), anti-CD16-FITC (3G8 clon) y anti-CD56-APC (B159 clon), todos ellos obtenidos de Becton Dickinson (San Jose, CA, EE.UU.)
- Anticuerpos para determinación de receptores NK: anti-CD85j-PE (GHI/75 clon), anti-CD94-FITC (clon HP-3D9) obtenidos de Becton Dickinson (San Jose, CA, EE.UU.) y anti-NKG2A -PE (clon 131 411), anti-NKG2C-PE (clon 134 591) obtenidos de R & D Systems, Inc. (Minneapolis, EE.UU.).

Placa ELISA

- Placa de 96 pocillos (RD194070100R) tipo sandwich para la cuantificación de HLA-G soluble. Anticuerpo: MEM G-9. (Exbio, Praga, Rep.Checa).

3. Materiales y métodos

Mario Frías Casas

3.4 Creación de la vacuna terapéutica de células dendríticas autólogas en el Hospital Clinic.

Preparación del virus autólogo pulsado en MD-DC autólogas

Se preparó un stock de virus VIH-1 autólogos inactivados para cada paciente según las buenas prácticas de fabricación (GMP) y cumpliendo con las especificaciones predeterminadas en el expediente de investigación de productos médicos (IMPD).

La principal cepa de cada paciente se obtuvo por co-cultivo alogénico de células CD4^{pos} enriquecido con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tanto de individuos infectados por VIH-1 como de donantes sanos durante 21 días en X-Vivo 20 media, 10% de AB suero humano e IL-2.

El virus presente en el sobrenadante del cultivo fue recogido e inactivado por calor dos veces a 56°C durante 30 minutos. Éste fue concentrado por ultrafiltración a un volumen final de 1 mL, para posteriormente alicuotarlo en 0,2 mL 5 veces para su posterior almacenamiento en frío (-80°C) antes de proceder a la pulsación de las CD-DM.

La reducción de la infectividad del VIH-1 después de la inactivación térmica se evaluó por titulación viral en cultivos de células PBMC durante 11 días. Esta infectividad fue determinada por ELISA mediante la detección del antígeno p24 de VIH-1. Se mostró una alta reducción de la infectividad después de la inactivación por calor.

Generación ex-vivo de células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM)

Las CD-DM se generaron frescas sin criopreservación. Para su obtención, una semana antes de cada vacunación, se partió de monocitos presentes en las PBMC de una muestra de 150 ml de sangre venosa extraída con anticoagulante fisiológico de banco de sangre. Las PBMC se obtuvieron por gradiente standard de Ficoll. Para aislar los monocitos por adherencia al plástico, las PBMC resuspendidas (4 millones/ml) en medio de cultivo libre de suero GMP suplementado con 1 % de suero autólogo inactivado, se dispensaron (10 ml) en frascos (de 50 ml) de cultivo celular de poliestireno apirogénico con tapón de cierre total, provisto de filtro para esterilizar el aire, y se incubaron en posición horizontal durante 2 horas a 37 °C en incubador de cultivos celulares. La capa de monocitos adheridos al fondo se lavaron (2x) cuidadosamente con agitación suave por rotación horizontal con medio de cultivo GMP pre-calentado a 37 °C para eliminar linfocitos contaminantes residuales. A continuación, para inducir la diferenciación de los monocitos hacia CD inmaduras, se añadió al frasco con los monocitos adheridos en su fondo, 10 ml de medio de cultivo GMP suplementado con un 1% de suero autólogo inactivado, 1 microM de AZT (para impedir la posibilidad de replicación del VIH presente en los monocitos) y las citocinas humanas recombinantes GM-CSF e IL-4 (1000 UI/ml de cada una) , así como Gentamicina (50 microg/ml) y Fungizone (2,5 microg/ml), y se cultivó en posición horizontal durante cinco días en un incubador de cultivos celulares

3. Materiales y métodos

Mario Frías Casas

(37°C, en atmósfera húmeda y aire con 5% de CO₂). Tras 5 días de cultivo, los monocitos se han convertido ya en células dendríticas (CD) inmaduras que se caracterizan por ser de tamaño muy superior al de los monocitos, flotar ligeramente en el medio y presentar características morfológicas e inmunofenotípicas de células dendríticas. Estas CD-DM inmaduras de 5 días son especialistas en la captura de antígeno y están en condiciones de ser pulsadas con el VIH.

Pulsado de las CD-DM inmaduras autólogas con el VIH-1 autólogo inactivado y su maduración y administración por vía subdérmica al paciente

Para cada vacunación, se utilizaron como mínimo $1,2 \times 10^7$ CD-DM inmaduras. Estas se lavaron (2x) en medio GMP y se resuspendieron en 1 ml de medio GMP completo que contendrá la alícuota de VIH-1 autólogo inactivado (109 viriones/vacuna) así como GM-CSF+ IL-4 (1000UI/ml de cada una), y tras agitación suave se mantuvo en incubador de cultivo de tejidos 3 horas, momento en que se añadió al cultivo un coctel de citocinas humanas recombinantes (TNF- α +IL-6+IL-1) inductoras de la maduración de las CD-DM obtenidas en condiciones GMP (CellGro-cellGenix), y el cultivo se prolongó hasta las 40 horas. Posteriormente las CD-DM se lavaron con medio de cultivo GMP y se resuspendieron en 0.4 ml de suero salino fisiológico farmacéutico suplementado con 1% de suero autólogo inactivado y libre de VIH-1. Posteriormente se

cargaron en dos jeringuillas de insulina (0,2 ml con $0,5 \times 10^7$ /jeringuilla), e inmediatamente se administró al paciente en sendas inyecciones subdérmicas.

4. Resultados



4.1 Distribución de las subpoblaciones NK

En primer lugar se determinó el porcentaje de cada una de las subpoblaciones de células NK en los pacientes incluidos en el estudio en cada uno de los puntos del seguimiento (semana basales y semanas 1, 3, 16, 24 y 48). Se tomó como punto basal a la semana -1 (semana previa a la primera inmunización) o en su defecto se tomó la semana -2. Mediante citometría de flujo (Figura 3d) y en función de la expresión de los marcadores CD16 y CD56 se distinguieron tres subclases de células NK: $CD16^{+/-}CD56^{dim}$, $CD16^{+}CD56^{bright}$, $CD16^{+}CD56^{neg}$. (Ver 8.Anexo de tablas)

Una vez realizadas las determinaciones por citometría se procedió a analizar los porcentajes de cada subpoblación NK en cada uno de los puntos de seguimiento comparándolo posteriormente con el punto basal mediante el cálculo del porcentaje de cambio o incremento. Este porcentaje de cambio se calcula restando el porcentaje de las semanas basales antes de la vacuna al porcentaje de cada una de las semanas de seguimiento. (Ejemplo; Semana Basal: 74%, Semana 1: 24%, Δ % cambio en Semana 1 = $24-74 = -50\%$).

De esta forma para ver las posibles diferencias en cuanto a la distribución de las subpoblaciones de células NK como consecuencia de la inmunización con la vacuna se comparó la mediana de los porcentajes de cambio entre los pacientes que recibieron placebo y los que recibieron vacuna (Tabla 4.a).

4. Resultados

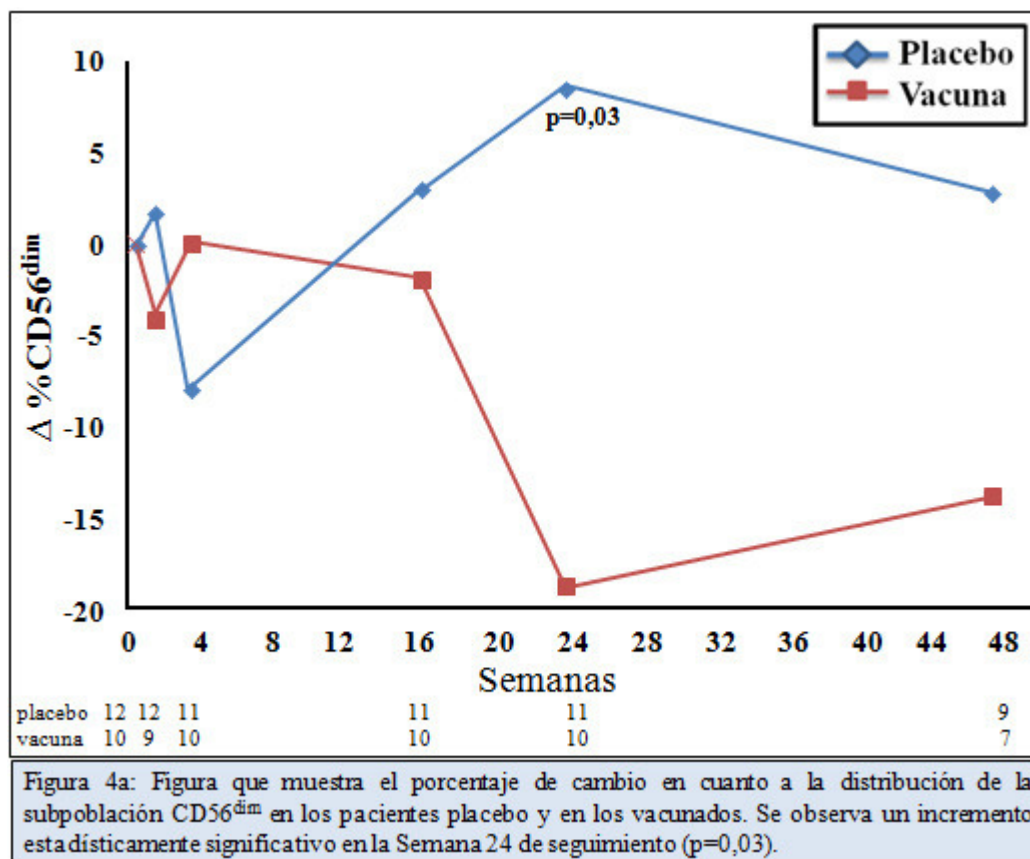
Mario Frías Casas

Porcentaje de cambio de las Subpoblaciones NK									
	NK CD56 ^{dim}			NK CD56 ^{bright}			NK CD56 ^{neg}		
Semana	P	Placebo	Vacuna	P	Placebo	Vacuna	P	Placebo	Vacuna
1	0.83	1.71	-4.10	0.13	-0.08	0.09	0.35	-8.95	4.34
3	0.14	-7.87	0.08	0.96	-0.07	0.02	0.66	2.44	-0.99
16	0.56	3.06	-1.83	0.67	0.06	-0.27	0.89	0.54	2.22
24	0.04	8.49	-18.64	0.87	0.05	-0.84	0.03	-8.75	10.62
48	0.49	2.84	-13.72	0.82	-1.11	-0.04	0.69	-6.87	10.80

Tabla 4a: Tabla que refleja el porcentaje de incremento de cada una de las subpoblaciones NK de los pacientes incluidos en el estudio. Los valores corresponden a la mediana del cambio en cada semana para cada grupo. (Placebo n=12, Vacuna n=10)

Niveles de la subpoblación CD56^{dim}

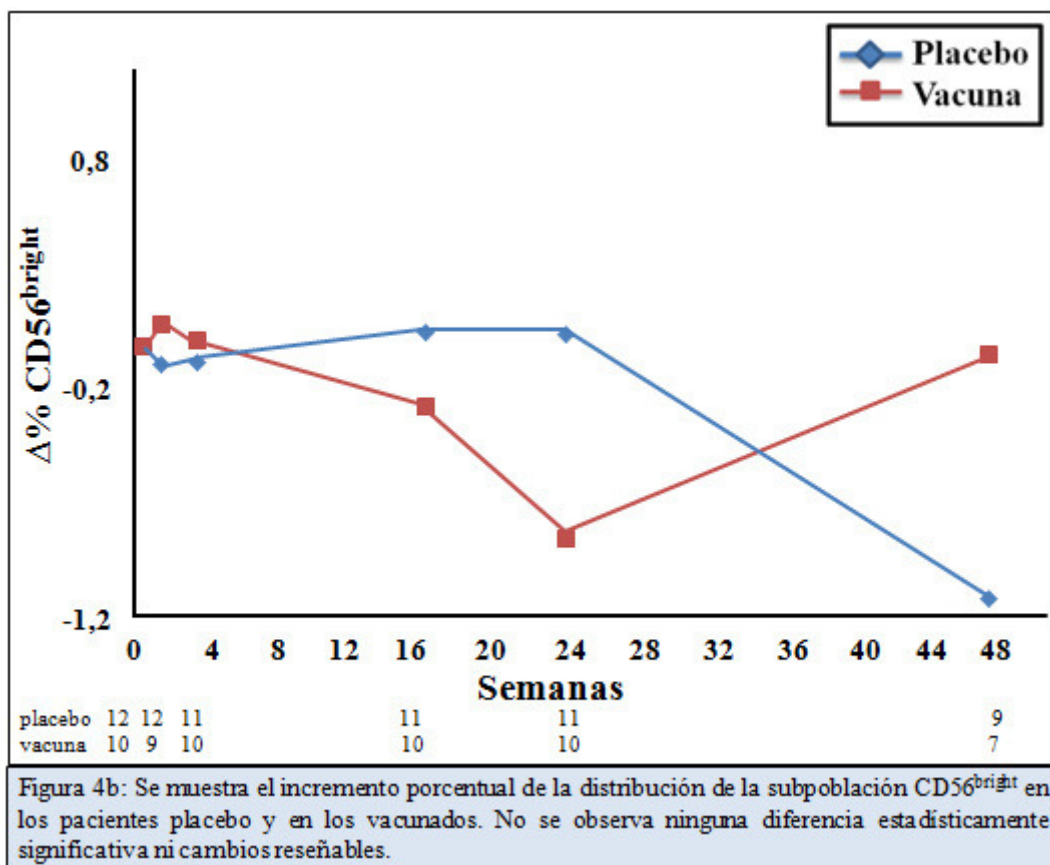
Se observó una tendencia decreciente de los pacientes vacunados. Exceptuando la semana 3, en el resto, los pacientes vacunados tienen un incremento negativo de esta subpoblación (Figura 4a).



Dicha deferencia se hace estadísticamente significativa ($p=0,04$) en la semana 24 del seguimiento.

Niveles en la subpoblación CD56^{bright}

Para las células CD56^{bright} no se obtuvieron diferencias siendo prácticamente similar el porcentaje de cambio durante todo el seguimiento en ambos grupos del estudio. (Figura 4b).



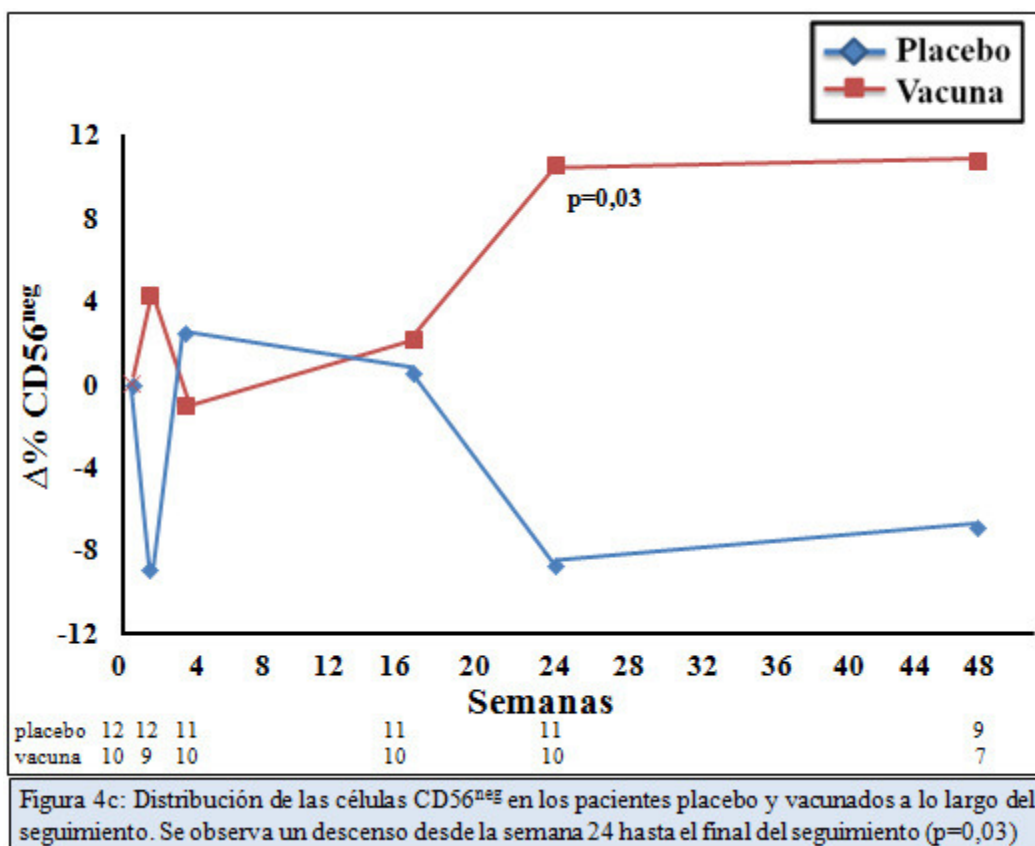
Niveles en la subpoblación CD56^{neg}

En el caso de los niveles de la subpoblación CD56^{neg} se observa que los cambios son significativamente mayores ($p= 0,003$) en pacientes inmunizados en

4. Resultados

Mario Frías Casas

la semana 24 al igual que ocurría en la subpoblación CD56^{dim} (Tabla 4a). Si bien en las primeras semanas el porcentaje de esta subpoblación es similar, a partir de la semana 24 empiezan a existir diferencias entre ambos grupos manteniéndose dicha diferencia hasta el último punto del seguimiento (semana 48) (Figura 4c).



4.2 Expresión de receptores específicos de HLA en células NK

Al igual que en el caso de la determinación de las subpoblaciones, los receptores de células NK se midieron mediante citometría de flujo. Se comprobó el porcentaje de cambio de células NK que expresan ILT-2/CD85j, CD94-NKG2A y CD94-NKG2C desde la semana 1 hasta la semana 48 momento en el que finaliza el seguimiento (Tabla 4b). En el caso de estos dos últimos, al ser un dímero no disponíamos de canales suficientes en el citómetro para conocer la expresión de estos en la subpoblación CD16⁺CD56^{neg}.

Porcentaje de cambio de los receptores NK										
	Semana	NK CD56 ^{dim}			NK CD56 ^{bright}			NK CD56 ^{neg}		
		P	Placebo	Vacuna	P	Placebo	Vacuna	P	Placebo	Vacuna
CD85j/ILT2	S1	0.04	-1.98*	-9.63*	0.04	-0.74*	-6.19*	0.70	-1.84	-4.68
	S3	0.19	-4.57	-8.47	0.01	-1.07*	-6.25*	0.49	-6.03	-7.55
	S16	0.01	1.03*	-11.16*	0.01	0.50*	-5.45*	0.21	2.27	-12.45
	S24	0.10	-3.28	-13.30	0.06	-1.99	-5.10*	0.96	-9.07	-16.14
	S48	0.11	-6.04	-15.54	0.05	-0.82*	-5.97*	0.91	-10.35	-8.29
CD94-NKG2A	S1	0.04	10.98*	-0.27*	0.47	1.97	1.90			
	S3	0.16	2.73	-0.34	0.46	2.47	-4.06			
	S16	0.43	-4.42	-0.80	0.43	-13.17	-2.12			
	S24	0.34	-3.42	2.03	0.06	-3.73	8.38			
	S48	0.43	-6.40	-1.81	0.87	-5.55	-14.69			
CD94-NKG2C	S1	0.22	3.75	-1.06	0.19	3.68	-4.22			
	S3	1.00	-1.79	1.82	0.65	0.57	0.94			
	S16	0.70	2.53	-2.91	0.73	1.77	3.13			
	S24	0.26	-1.35	3.18	0.74	-2.35	-1.49			
	S48	0.85	1.29	-4.04	0.85	3.69	0.88			

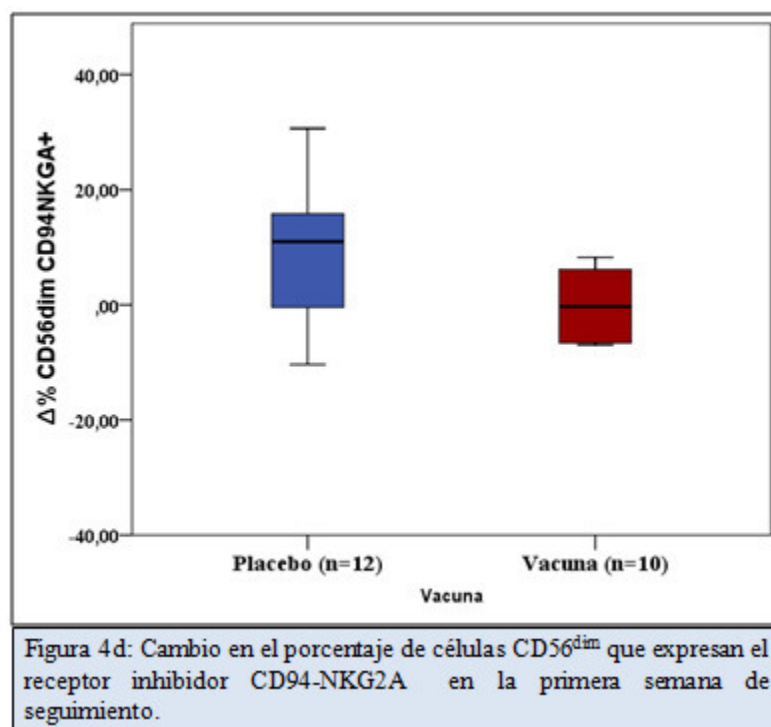
Tabla 4b: Porcentaje de expresión de los receptores NK durante todo el seguimiento en cada una de las subpoblaciones existentes. Los valores corresponden a la mediana del incremento en cada semana para cada grupo. (Placebo n=12, Vacuna n=10)

4. Resultados

Mario Frías Casas

Expresión del receptor CD94-NKG2A

Una vez calculados los porcentajes de expresión de este receptor en las células CD56^{dim} observamos en la Semana 1 justo después de la primera inmunización una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,04$). Es llamativo como precisamente en esta semana los pacientes vacunados presentaban un incremento negativo de células CD56^{dim} que expresan este receptor dímero inhibidor (Figura 4d). En las semanas posteriores no se observan cambios en la expresión de este receptor en ambos grupos, vacunados y placebo.



Cuando estudiamos las diferencias de expresión del dímero CD94-NKG2A en células CD56^{bright} a pesar de que no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa observamos como en las semanas 1, 3 y 48 los

pacientes vacunados tenían menos células CD56^{bright} que expresaban dicho dímero. (Tabla 4b)

Expresión del receptor CD94-NKG2C

En el caso de este dímero y receptor activador de las células NK no se encontraron diferencias de expresión del mismo en ninguna de las subpoblaciones estudiadas, se encontró el mismo porcentaje de cambio tanto en los pacientes placebo como en los inmunizados.

Expresión del receptor ILT-2/CD85j

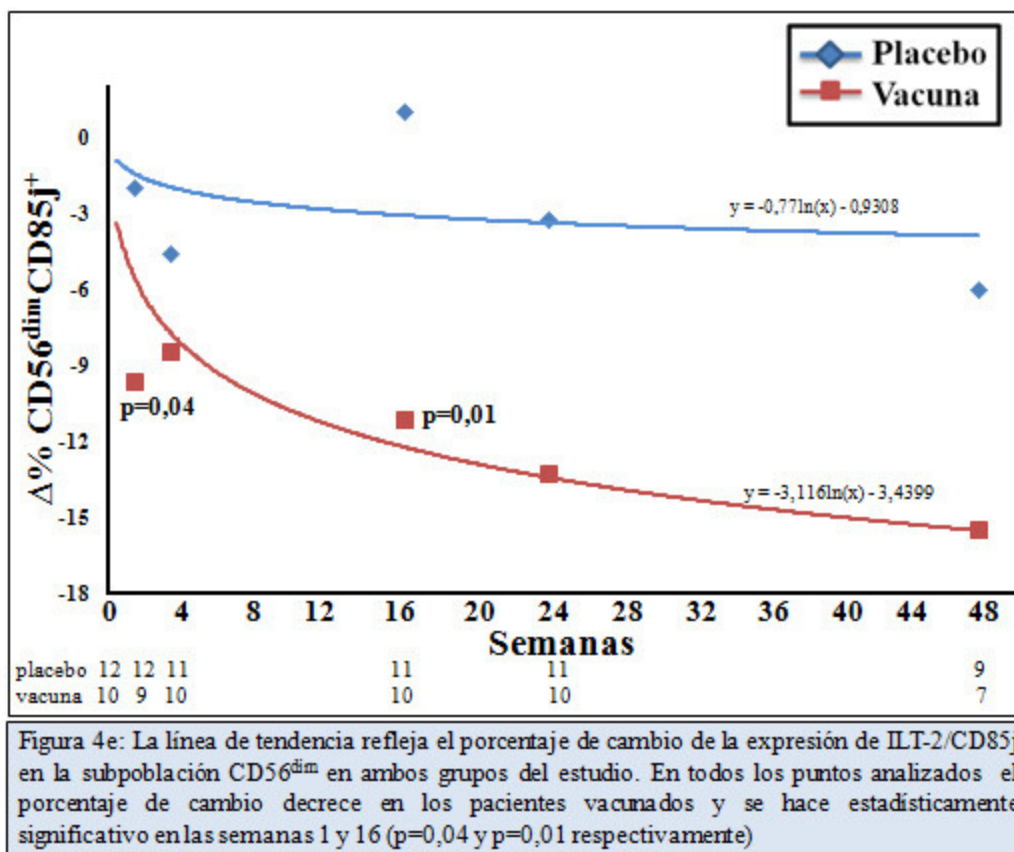
Cuando se estudió la expresión del receptor ILT-2/CD85j en NK se encontraron diferencias tanto en la subpoblación CD56^{dim} como en la subpoblación CD56^{bright} en pacientes vacunados cuando comparamos dicha expresión con el placebo.

En el caso de las células CD56^{dim}, se produce un descenso en el porcentaje de células que expresan ILT-2/CD85j en pacientes vacunados que es estadísticamente significativo en las Semanas 1 ($p=0,04$) y 16 ($p=0,017$) al compararlo con el porcentaje de los individuos placebo (Figura 4e y Tabla 4b).

4. Resultados

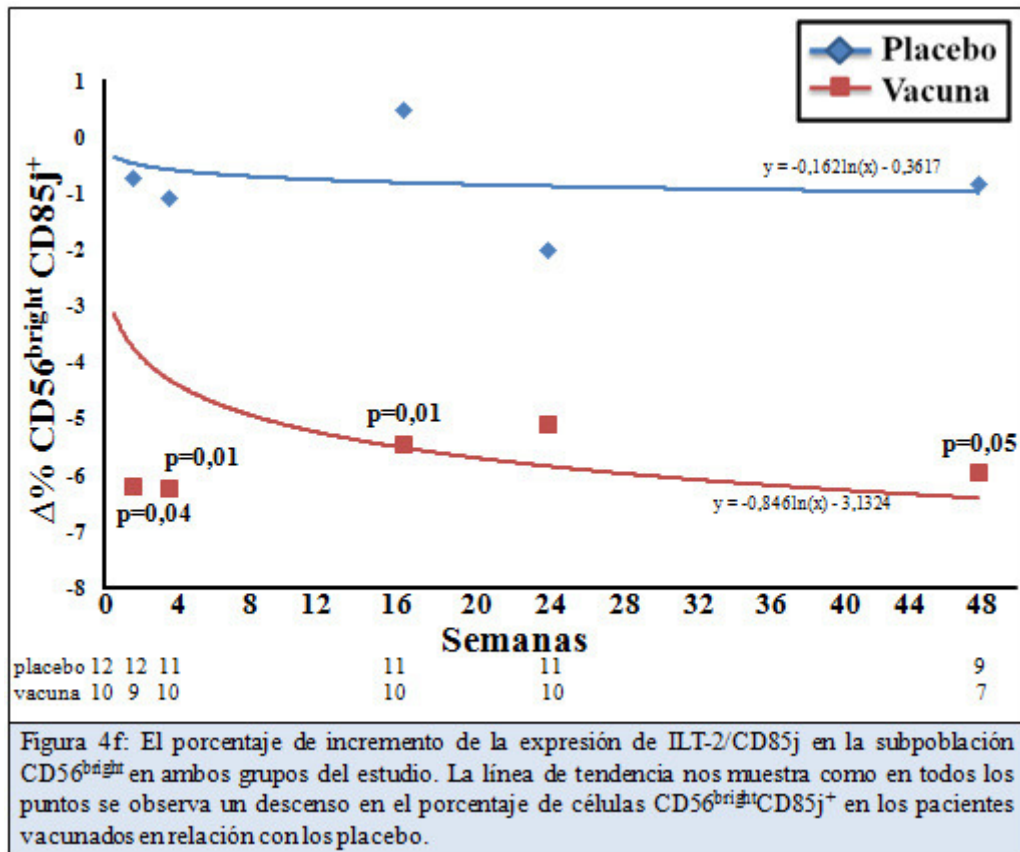
Mario Frías Casas

A pesar de que sólo en esas semanas mencionadas encontramos diferencias significativas, a lo largo de todo el seguimiento los pacientes vacunados poseen un porcentaje menor de células que expresan el receptor ILT-2/CD85j.



En lo que se refiere a la subpoblación CD56^{bright} y al igual que pasaba con la subpoblación CD56^{dim} la expresión del receptor ILT-2/CD85j decrece en pacientes inmunizados a lo largo de todo el seguimiento.

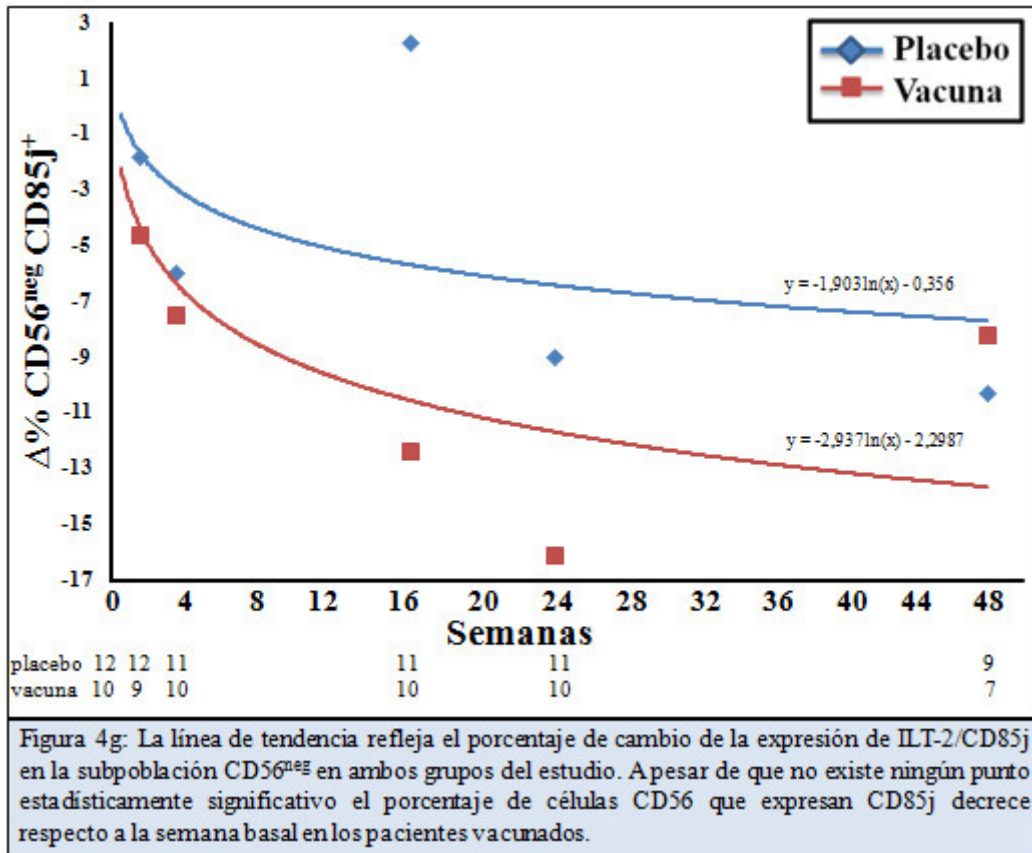
Dicha diferencia es estadísticamente significativa en las semanas 1, 3, 16 y 48 del seguimiento ($p = 0,004$, $p = 0,01$, $p = 0,009$ y $p = 0,05$ respectivamente) (Figura 4f y Tabla 4b).



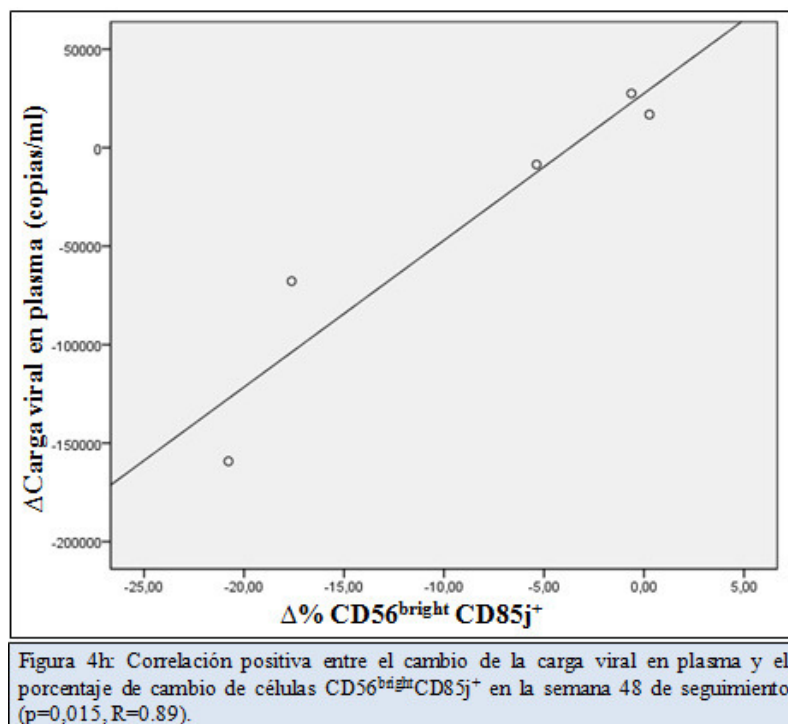
Por el contrario no se observaron cambios significativos de este receptor en la subpoblación de células CD56^{neg}, sin embargo como en el caso de las subpoblaciones NK vistas anteriormente los pacientes vacunados expresan menos ILT-2/CD85j en esta subpoblación desde que se inicia la inmunización con células dendríticas (Figura 4g y Tabla 4b).

4. Resultados

Mario Frías Casas



Finalmente, cuando enfrentamos el cambio de la carga viral en plasma con la expresión del receptor ILT-2/CD85j en las células CD56^{bright} (Figura 4h),



observamos que existe una leve correlación positiva de ambos factores en la *Semana 48* del seguimiento ($p=0,015$, $R=0.89$).

4. Resultados

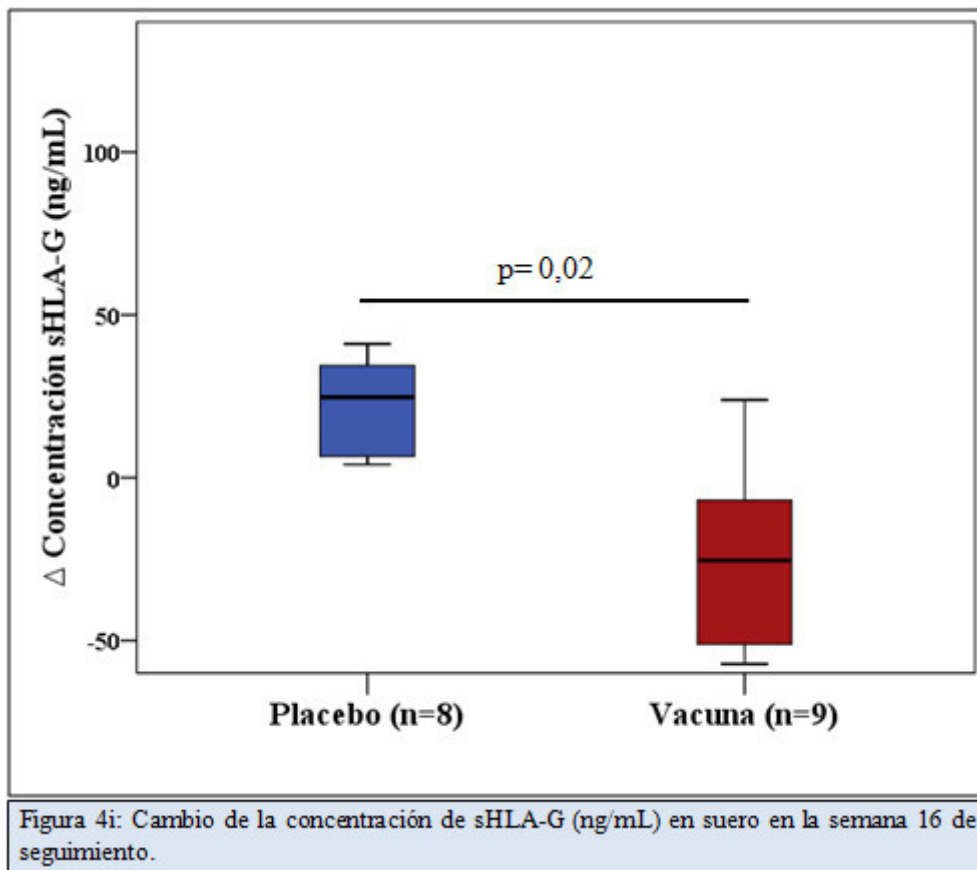
Mario Frías Casas

4.3 Concentración de HLA-G soluble

Al igual que se realizó con la determinación de los porcentajes de expresión de los distintos marcadores celulares y receptores mediante citometría, en el caso de la determinación de la concentración de HLA-G soluble en plasma, se calculó el incremento de esta concentración restando los niveles (ng/mL) de esta molécula en la Semana 16 y 24 de seguimiento a los niveles de sHLA-G en la Semana Basal. Se utilizó como punto basal a la Semana -1 o en su defecto Semana -2.

Cuando se comparó la mediana de la concentración sHLA-G antes y después de la inmunización, se observó que aquellos pacientes que habían recibido la vacunación con células dendríticas vieron reducida la concentración de sHLA-G respecto al punto basal (Figura 4i).

Por otro lado, los pacientes placebo vieron incrementada la expresión de esta molécula.



5. Discusión



El tratamiento antirretroviral (TARGA) ha supuesto un importante avance en el tratamiento de los pacientes con infección por VIH. Como consecuencia de ello durante los últimos años en los países que tienen acceso a este tipo de tratamiento se ha producido un importante descenso en la mortalidad y en la incidencia de enfermedades oportunistas en estos pacientes [207].

Sin embargo este tipo de terapia es incapaz de erradicar por completo la presencia del virus en los individuos infectados [208-209]. Por ello, el tratamiento se debe mantener de forma indefinida con lo cual sólo se consigue una inhibición sostenida de la replicación viral pero no la desaparición completa del virus [210].

Ante esta situación se han venido desarrollando nuevas terapias, incluidas las vacunas terapéuticas, que aunque en principio no sustituyen al TARGA, sí podrían al menos disminuir su uso y así paliar sus efectos secundarios.

En este sentido es por lo que desde el Grupo de Vacunas del Sida (RISVAC03) se está haciendo un esfuerzo para encontrar nuevas vacunas terapéuticas que activen el sistema inmune de estos enfermos y así contribuir a su mejora. En concreto, en nuestro grupo hemos venido trabajando en una terapia basada en la administración de células dendríticas autólogas pulsadas con virus VIH-1 autólogo inactivado por calor que se ha visto que induce un efecto en la respuesta inmune adaptativa favoreciendo la reducción de la carga viral de los pacientes inmunizados [206]. Sin embargo, no existen datos de cómo la vacuna modula la respuesta inmune innata en estos sujetos.

5. Discusión

Mario Frías Casas

Por tanto, nuestro objetivo fue comprobar si esta vacuna modifica induce algún tipo de cambio en la respuesta inmune innata, especialmente en la inmunobiología de las células NK y la concentración de la molécula inmunotolerogénica HLA-G. En esta tesis se recogen los estudios sobre los niveles de las subpoblaciones NK, los receptores de éstas y algunos factores solubles como el sHLA-G analizados en el plasma de estos pacientes.

La posible influencia de la vacuna en estos pacientes sobre los diferentes aspectos estudiados en las células NK, puede llevarnos a comprender qué tipo de influencia tiene esta inmunización respecto a la respuesta innata.

Esta acción de la vacuna puede traducirse en una posible redistribución de las subpoblaciones NK, una normalización del balance entre receptores activadores/inhibidores y un descenso de factores solubles inmunosupresoras que explicarían el efecto beneficioso de la vacuna en lo que respecta a la respuesta inmune innata.

Subpoblaciones de células NK

Diversos estudios sugieren que el papel que juegan las células NK en el curso de la infección por VIH es más que relevante. Así se ha observado una relación directa entre la progresión a SIDA y el número y/o función (capacidad secretora y citolítica) de las células NK [73, 211].

En concreto, la infección por VIH-1 se ha asociado con alteraciones en el porcentaje de las subpoblaciones CD56^{dim}, CD56^{bright} y con claro aumento en la

subpoblación de células CD56^{neg} [102]. También se ha observado una desregulación en la actividad citolítica directa [89], la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) [63, 212-213] y en la producción de citocinas [73, 214].

En nuestro caso, el objetivo de este trabajo fue analizar en profundidad si el balance de las subpoblaciones de células NK en pacientes infectados por VIH-1 se altera o modifica cuando estos son inmunizados o vacunados con células dendríticas pulsadas con VIH-1 autólogo.

Esto podría ayudarnos a conocer los mecanismos por los que la vacuna actuaría en estos pacientes VIH-1⁺ [102, 215-216] y también nos ayudaría a saber si esa modificación es relevante induciendo los cambios observados para mejorar la respuesta inmune innata en estos pacientes.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que los niveles de la subpoblación NK CD56^{neg} se incrementan en los pacientes vacunados, coincidiendo a su vez con un ligero descenso de la proporción de las células CD56^{dim} desde la semana 24 al final del tratamiento. Sin embargo no se observaron diferencias entre los porcentajes de las subpoblaciones de células NK CD56^{bright} en los pacientes vacunados en comparación con individuos placebo, lo cual indica que la vacuna no debe de tener efecto en esta subpoblación.

El aumento de la subpoblación NK CD56^{neg} en los pacientes vacunados podría ser la consecuencia de la pérdida de las células NK CD56^{pos} descrito inicialmente por Brunetta, E et al. [101], que podrían ser, al menos en parte, transformadas en células NK CD56^{neg}. Esto es corroborado por los resultados

5. Discusión

Mario Frías Casas

obtenidos en este trabajo, ya que el aumento de la subpoblación CD56^{neg} coincide con el descenso de las células CD56^{dim} en las mismas semanas de seguimiento (semana 24, en adelante) por lo que podríamos deducir que esas células CD56^{dim} podrían perder la molécula CD56 pasando a formar parte de la subpoblación NK CD56^{neg}, dentro de un fenómeno global de redistribución de las subpoblaciones NK.

Los datos expuestos anteriormente son la base de un modelo en el que las células NK CD56^{neg} han perdido, o no tienen, la capacidad de producir citocinas y la destrucción de células infectadas. Sin embargo, estas células conservan la capacidad de liberación de quimiocinas proinflamatorias.

Se puede interpretar que el aumento de la subpoblación NK CD56^{neg} observado después de la vacuna, puede ser de especial relevancia en el bloqueo de la progresión de la infección por el VIH en los individuos vacunados. Estos efectos inmunológicos de la vacuna se basan en las características biológicas de estas células, pudiendo actuar las mismas a través de su capacidad citotóxica o de producción de IFN- γ [100]. Por este motivo, las células NK podrían interferir con la progresión de la infección a través de la subpoblación de células CD56^{neg} y su capacidad para producir y secretar quimiocinas, como CCL3, CCL4 y CCL5 [217-218], las cuales no sólo tienen la capacidad de actuar como proteínas proinflamatorias, facilitando una inflamación crónica [100], sino que también interfieren con la entrada del VIH-1 en las células huésped [219-220]. En efecto, se ha descrito ampliamente que estas tres quimiocinas tienen la capacidad de

unirse al receptor de quimiocinas CCR5, que actúa como correceptor del VIH [221]. Así, las células CD56^{neg} son capaces de inhibir la entrada del virus VIH-1 en las células CD4^{pos} y otras células diana para el VIH-1 [221] y posteriormente, suprimir la replicación del VIH-1 [217, 222].

Partiendo de la base que las células NK CD56^{neg} han perdido su capacidad de producción de citocinas y la actividad citolítica pero a pesar de ello conservan la capacidad de liberación de quimiocinas proinflamatorias [100] podríamos concluir que el aumento significativo observado de esta subpoblación después de la vacunación podría inducir una respuesta inflamatoria mediada por las quimiocinas producidas por las células NK CD56^{neg}. Sin embargo, este potencial efecto beneficioso de la vacuna a través de las células NK CD56^{neg} debe ser estudiado más extensamente en el futuro.

Receptores de células NK

La infección por VIH se caracteriza por una alteración en el balance de los receptores que normalmente expresan las células NK en individuos sanos. En concreto en los enfermos VIH⁺ se observa un incremento en la expresión de ciertos receptores NK inhibidores y un descenso de los receptores que favorecerían la actividad de las células NK [73, 90].

Como ya hemos expuesto anteriormente, al analizar los niveles de los receptores NK CD94, NKG2A y NKG2C basalmente y en los diferentes puntos de corte casi no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo

5. Discusión

Mario Frías Casas

placebo y los pacientes vacunados, lo cual podría indicar que la vacuna no tiene efecto sobre la expresión de estos receptores. Sin embargo en la semana 1 justo después de la primera inmunización se observa como la expresión del dímero CD94-NKG2A en las células CD56^{dim} es ligeramente menor en los pacientes vacunados respecto al placebo.

Este hecho podría significar que la vacuna estaría produciendo un efecto muy temprano, a corto plazo, a la vez que muy débil sobre la expresión de este dímero en estas células lo que podría traducirse como efecto biológico beneficioso ya que este dímero actúa como inhibidor de la respuesta NK.

Por otro lado cuando se analizaron los niveles del receptor inhibidor CD85j/ILT-2, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio.

Concretamente, nuestros datos muestran una disminución en los niveles de expresión del receptor inhibidor CD85j/ILT-2 en ciertas subpoblaciones de células NK. En concreto, cuando se analizaron las subpoblaciones de células NK, CD56^{bright} y CD56^{dim}, se encontró en ambas una disminución en el porcentaje de células que expresaban CD85j/ILT-2 en los pacientes vacunados, mientras que no se observaron cambios en el grupo placebo.

Teniendo en cuenta que el receptor CD85j/ILT-2 está involucrado en el proceso de inhibición de las funciones de las células NK [64, 223-226], esta disminución podría facilitar la actividad citolítica en el caso de las células NK CD56^{dim} y la función secretora en las células NK CD56^{bright} como consecuencia

de la vacuna. Esto en términos generales se traduciría como un incremento de la citotoxicidad y de la capacidad secretora de las células NK en los pacientes inmunizados con CD-DM. Por lo tanto este hecho también podría ser beneficioso, ya que el mismo receptor CD85j/ILT-2 tiene un efecto tolerogénico en la producción de IL-15 e IL-12 por las células dendríticas. Así mismo, también inhibe la adhesión de las células NK a las células diana.

Numerosos autores han estudiado el aumento en la expresión del receptor CD85j/ILT-2 en situaciones de interrupción de la terapia HAART [73, 211]. Sin embargo, en este estudio se muestra que en los pacientes vacunados se produce una reversión de este hecho, mediante la reducción del nivel de expresión de este receptor. Para conocer la implicación de la menor expresión del receptor CD85j/ILT-2 observada tras la vacunación con células dendríticas en individuos VIH-1 seropositivos y su influencia en el efecto inhibitor de las células NK y otras células inmunorreactivas serán necesarios más estudios encaminados a dicho objetivo.

Nuestros datos sugieren una correlación positiva entre los niveles de CD56^{bright} que expresan ILT-2 y la carga viral en la semana 48 de seguimiento. Actualmente permanece en discusión el posible interés biológico de estos datos, así como el hecho de que se produzca en un momento determinado de la evolución y no en los otros puntos de seguimiento tanto en las células cd56dim como en las CD56^{neg} que expresan dicho receptor.

5. Discusión

Mario Frías Casas

Estos resultados referentes a las células NK y sus receptores podrían ser de gran relevancia clínica, puesto que hasta ahora se desconocía el papel de éstas células y sus ligandos en la infección por VIH, a pesar de la gran importancia estas células en la respuesta innata.

Esto podría ser también relevante en el fenómeno descrito como "cross-talk" observado entre células NK y células dendríticas que son precisamente las células utilizadas como vector de inmunización en este trabajo [54, 227]

En cualquier caso, futuros estudios funcionales ayudarían a clarificar la hipótesis sugerida en esta tesis y facilitarían la comprensión de los cambios encontrados en las células NK y sus receptores en los pacientes que han sido inmunizados.

HLA-G soluble en plasma

Cada familia de virus desarrolla mecanismos propios a través de los cuales intenta evitar su destrucción por parte del sistema inmune [228-230]. En el caso del VIH, éste consigue generar una alta diversidad viral, establecer la infección en los reservorios antes de que el hospedador genere una respuesta inmune específica, permanecer en estado de latencia de forma rápida y masiva generando nuevos viriones antes de que se inicie la destrucción por parte del sistema inmune, ocultar los dominios proteicos implicados en la unión a los correceptores, infectar a los linfocitos activados destruyéndolos de forma preferente y hacer de determinados tipos celulares el lugar ideal en el que

perpetuar la infección. De este modo consigue escapar de la acción del sistema inmune.

En este contexto y, como se ha referido con anterioridad, resulta de especial interés la molécula HLA-G. Este interés deriva de la capacidad que posee dicha molécula para inducir tolerancia y de la asociación ya establecida con diferentes patologías.

Existen pocos datos publicados sobre la expresión de HLA-G en pacientes infectados por el VIH. En estudios previos de nuestro grupo, se demuestra que existe un aumento de la expresión de ésta molécula en los monocitos de sangre periférica de los pacientes infectados por el VIH con respecto a controles sanos, habiéndose especulado con la posibilidad de que fuese un efecto directo del propio virus para evitar su erradicación de los reservorios [46]. Se sugiere por tanto, que podría ser de utilidad como estrategia terapéutica frente a la infección, el conseguir bloquear la expresión del HLA-G en los monocitos de sangre periférica de los pacientes infectados por el VIH. Así mismo, en esta tesis, se subraya la importancia de confirmar estos hallazgos y determinar los factores que pudieran justificar el efecto observado.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que gran parte de la acción inmunosupresora de la molécula HLA-G tiene lugar a través de su estrecha relación con uno de sus receptores, ILT-2/CD85j [132, 225, 231].

Basándose en esto y para explicar los resultados obtenidos en los pacientes vacunados respecto al receptor ILT-2/CD85j consideramos de gran utilidad

5. Discusión

Mario Frías Casas

determinar si la vacuna induce algún cambio en lo que respecta a uno de los ligandos más importantes de este receptor [64] como es HLA-G.

Para ello se analizó mediante enzimo-inmunoensayo (ELISA) el nivel de sHLA-G en el plasma de todos los pacientes para comprobar si existían diferencias entre los pacientes inmunizados y placebo.

Se observó como en la semana 16 de seguimiento la concentración de sHLA-G (ng/ml) disminuyó respecto al punto basal en el grupo de pacientes que recibieron la vacuna de células dendríticas pulsadas.

Las diferencias de concentración de sHLA-G en ese punto se coinciden con los resultados obtenidos respecto a ILT-2/CD85j en esa misma semana 16 de seguimiento que incluso es en este punto donde se observan las mayores diferencias de expresión de este receptor entre los dos grupos de pacientes. De esto, se podría deducir que el propio virus VIH-1 podría actuar a través de la vía HLA-G/ILT-2 para inhibir la respuesta citotóxica y/o secretora de las células NK.

Este hecho podría confirmar aún más la influencia que tiene la vacuna sobre la respuesta inmune innata, especialmente sobre los receptores inhibidores, no sólo reduciendo el porcentaje de células NK que los expresan en los pacientes vacunados sino también disminuyendo los niveles de la molécula HLA-G, que como se sabe, está claramente asociada a fenómenos de inmunotolerancia en infecciones crónicas, especialmente en VIH [232] y estrechamente relacionada con el receptor ILT-2/CD85j, como hemos podido comprobar en nuestro caso,

así como con la regulación de otras moléculas estrechamente relacionadas con HLA-G como la ILT-4 y IL-10.

En cualquier caso, se requieren estudios adicionales para clarificar la hipótesis aquí planteada y entender mejor los cambios que se producen en las células NK, receptores, ligandos y en general en la funcionalidad de la respuesta inmune innata ante las nuevas terapias contra el VIH que van poco a poco implementándose como alternativa y/o complemento del TARGA.

6. Conclusiones



CONCLUSIONES

La vacuna de células dendríticas derivada de monocitos en pacientes VIH⁺ tiene la capacidad de influir beneficiosamente en la respuesta inmune innata a través de los cambios observados en la población linfocitaria NK, sus receptores y la molécula HLA-G después de su administración. Concretamente:

1. Existe una redistribución de las subpoblaciones NK, observándose un aumento en el porcentaje de la subpoblación NK CD56^{neg} en los pacientes vacunados respecto a los placebo.
2. Los pacientes vacunados presentan un menor porcentaje de células NK^{dim} que expresan el receptor inhibitor ILT-2/CD85j.
3. El porcentaje de células NK^{bright} que expresaban el receptor ILT-2/CD85j también disminuyó en los pacientes vacunados.
4. En los pacientes vacunados disminuyen los niveles de HLA-G soluble en plasma respecto a los placebo.

7. Bibliografía



1. Hellerstein, M., *HIV tropism and CD4+ T-cell depletion*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 537-8.
2. Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, A.E. Sousa, R.M. Victorino, and W.E. Paul, *CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause?* Nat Med, 2002. **8**(4): p. 319-23.
3. Cloyd, M.W., J.J. Chen, P. Adeqboyega, and L. Wang, *How does HIV cause depletion of CD4 lymphocytes? A mechanism involving virus signaling through its cellular receptors*. Curr Mol Med, 2001. **1**(5): p. 545-50.
4. Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier, *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
5. Sarngadharan, M.G., M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach, and R.C. Gallo, *Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 506-8.
6. Salahuddin, S.Z., J.E. Groopman, P.D. Markham, M.G. Sarngadharan, R.R. Redfield, M.F. McLane, M. Essex, A. Sliski, and R.C. Gallo, *HTLV-III in symptom-free seronegative persons*. Lancet, 1984. **2**(8417-8418): p. 1418-20.
7. Marx, J.L., *More about the HTLV's and how they act*. Science, 1985. **229**(4708): p. 37-8.
8. Marx, J.L., *A virus by any other name*. Science, 1985. **227**(4693): p. 1449-51.
9. Marx, J.L., *AIDS virus genomes*. Science, 1985. **227**(4686): p. 503.
10. Coffin, J., A. Haase, J.A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al., *What to call the AIDS virus?* Nature, 1986. **321**(6065): p. 10.
11. Nutting, W.B., H. Beerman, L.C. Parish, and J.A. Witkowski, *Retrovirus (HIV). Transfer, potential vectors, and biomedical concerns*. Int J Dermatol, 1987. **26**(7): p. 426-33.
12. Carstens, E.B., *Working virologists and the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Arch Virol, 2001. **146**(12): p. 2493-5.
13. Coffin, J.M., *Genetic diversity and evolution of retroviruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **176**: p. 143-64.
14. Gelderblom, H.R., E.H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M.A. Koch, *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins*. Virology, 1987. **156**(1): p. 171-6.
15. Masuda, M., *[HIV replication and host cell cycle]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2007. **52**(10 Suppl): p. 1161-7.
16. Ferguson, M.R., D.R. Rojo, J.J. von Lindern, and W.A. O'Brien, *HIV-1 replication cycle*. Clin Lab Med, 2002. **22**(3): p. 611-35.
17. Zack, J.A., *The role of the cell cycle in HIV-1 infection*. Adv Exp Med Biol, 1995. **374**: p. 27-31.
18. Watts, J.M., K.K. Dang, R.J. Gorelick, C.W. Leonard, J.W. Bess, Jr., R. Swanstrom, C.L. Burch, and K.M. Weeks, *Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome*. Nature, 2009. **460**(7256): p. 711-6.
19. Eberle, J. and L. Gurtler, *HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies*. Intervirology, 2012. **55**(2): p. 79-83.

7. Referencias

Mario Frías Casas

20. Matsushita, S., K. Yoshimura, K. Takatsuki, and K. Shiozaki, [*Genetic variability in HIV*]. Nihon Rinsho, 1993. **51 Suppl**: p. 83-7.
21. Dalgleish, A.G., *HIV types and testing*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(4): p. 543-6.
22. Hoffman, N.G., F. Seillier-Moiseiwitsch, J. Ahn, J.M. Walker, and R. Swanstrom, *Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3852-64.
23. Najera, R., *SIDA: de la Biomedicina a la Sociedad*. Ed. Eudema, 1990.
24. D'Souza, M.P. and B.J. Mathieson, *Early phases of HIV type 1 infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1996. **12**(1): p. 1-9.
25. Tomaras, G.D. and B.F. Haynes, *HIV-1-specific antibody responses during acute and chronic HIV-1 infection*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(5): p. 373-9.
26. Trono, D., C. Van Lint, C. Rouzioux, E. Verdin, F. Barre-Sinoussi, T.W. Chun, and N. Chomont, *HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals*. Science, 2010. **329**(5988): p. 174-80.
27. Chung, A., E. Rollman, S. Johansson, S.J. Kent, and I. Stratov, *The utility of ADCC responses in HIV infection*. Curr HIV Res, 2008. **6**(6): p. 515-9.
28. Ahmad, A., R. Morisset, R. Thomas, and J. Menezes, *Evidence for a defect of antibody-dependent cellular cytotoxic (ADCC) effector function and anti-HIV gp120/41-specific ADCC-mediating antibody titres in HIV-infected individuals*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1994. **7**(5): p. 428-37.
29. Chung, A.W., G. Isitman, M. Navis, M. Kramski, R.J. Center, S.J. Kent, and I. Stratov, *Immune escape from HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) pressure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(18): p. 7505-10.
30. Mellors, J.W., A. Munoz, J.V. Giorgi, J.B. Margolick, C.J. Tassoni, P. Gupta, L.A. Kingsley, J.A. Todd, A.J. Saah, R. Detels, J.P. Phair, and C.R. Rinaldo, Jr., *Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection*. Ann Intern Med, 1997. **126**(12): p. 946-54.
31. Levy, J.A., B. Ramachandran, E. Barker, J. Guthrie, and T. Elbeik, *Plasma viral load, CD4+ cell counts, and HIV-1 production by cells*. Science, 1996. **271**(5249): p. 670-1.
32. Operskalski, E.A., J.W. Mosley, M.P. Busch, and D.O. Stram, *Influences of age, viral load, and CD4+ count on the rate of progression of HIV-1 infection to AIDS*. Transfusion Safety Study Group. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **15**(3): p. 243-4.
33. Douek, D.C., J.M. Brenchley, M.R. Betts, D.R. Ambrozak, B.J. Hill, Y. Okamoto, J.P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D.A. Price, M. Connors, and R.A. Koup, *HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 95-8.
34. McCune, J.M., *The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 974-9.
35. Sprent, J. and D. Tough, *HIV results in the frame. CD4+ cell turnover*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 194; author reply 198.
36. Betts, M.R., M.C. Nason, S.M. West, S.C. De Rosa, S.A. Migueles, J. Abraham, M.M. Lederman, J.M. Benito, P.A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, and

- R.A. Koup, *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. *Blood*, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
37. Nazari, R. and S. Joshi, *CCR5 as target for HIV-1 gene therapy*. *Curr Gene Ther*, 2008. **8**(4): p. 264-72.
38. Baum, L.L., *Role of humoral immunity in host defense against HIV*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2010. **7**(1): p. 11-8.
39. De Milito, A., A. Nilsson, K. Titanji, R. Thorstensson, E. Reizenstein, M. Narita, S. Grutzmeier, A. Sonnerborg, and F. Chiodi, *Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2180-6.
40. Skokanova, V., J. Kaminkova, Z. Vacek, and M. Stankova, *[Immunologic study in HIV-positive patients. Hypergammaglobulinemia in HIV infection]*. *Cas Lek Cesk*, 1993. **132**(12): p. 369-72.
41. Nolting, A., A.S. Dugast, S. Rihn, R. Luteijn, M.F. Carrington, K. Kane, S. Jost, I. Toth, E. Nagami, G. Faetkenheuer, P. Hartmann, M. Altfeld, and G. Alter, *MHC class I chain-related protein A shedding in chronic HIV-1 infection is associated with profound NK cell dysfunction*. *Virology*, 2010. **406**(1): p. 12-20.
42. Kottlilil, S., K. Shin, J.O. Jackson, K.N. Reitano, M.A. O'Shea, J. Yang, C.W. Hallahan, R. Lempicki, J. Arthos, and A.S. Fauci, *Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions*. *J Immunol*, 2006. **176**(2): p. 1107-14.
43. Nowak, M., *HIV mutation rate*. *Nature*, 1990. **347**(6293): p. 522.
44. Matreyek, K.A., I. Oztop, E.O. Freed, and A. Engelman, *Viral latency and potential eradication of HIV-1*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2012. **10**(8): p. 855-7.
45. Apps, R., Y. Qi, J.M. Carlson, H. Chen, X. Gao, R. Thomas, Y. Yuki, G.Q. Del Prete, P. Goulder, Z.L. Brumme, C.J. Brumme, M. John, S. Mallal, G. Nelson, R. Bosch, D. Heckerman, J.L. Stein, K.A. Soderberg, M.A. Moody, T.N. Denny, X. Zeng, J. Fang, A. Moffett, J.D. Lifson, J.J. Goedert, S. Buchbinder, G.D. Kirk, J. Fellay, P. McLaren, S.G. Deeks, F. Pereyra, B. Walker, N.L. Michael, A. Weintrob, S. Wolinsky, W. Liao, and M. Carrington, *Influence of HLA-C expression level on HIV control*. *Science*, 2013. **340**(6128): p. 87-91.
46. Lozano, J.M., R. Gonzalez, J.M. Kindelan, N. Rouas-Freiss, R. Caballos, J. Dausset, E.D. Carosella, and J. Pena, *Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule*. *AIDS*, 2002. **16**(3): p. 347-51.
47. Trinchieri, G., *Biology of natural killer cells*. *Adv Immunol*, 1989. **47**: p. 187-376.
48. Smyth, M.J., D.I. Godfrey, and J.A. Trapani, *A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(4): p. 293-9.
49. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta, *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 197-223.
50. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 225-74.
51. Moretta, A., C. Bottino, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta, *What is a natural killer cell?* *Nat Immunol*, 2002. **3**(1): p. 6-8.
52. Cerwenka, A. and L.L. Lanier, *Natural killer cells, viruses and cancer*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(1): p. 41-9.

7. Referencias

Mario Frías Casas

53. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
54. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M.A. Caligiuri, *NK cell and DC interactions*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(1): p. 47-52.
55. Nagler, A., L.L. Lanier, S. Cwirla, and J.H. Phillips, *Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells*. *J Immunol*, 1989. **143**(10): p. 3183-91.
56. Caligiuri, M.A., A. Zmuidzinis, T.J. Manley, H. Levine, K.A. Smith, and J. Ritz, *Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors*. *J Exp Med*, 1990. **171**(5): p. 1509-26.
57. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
58. Degli-Esposti, M.A. and M.J. Smyth, *Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(2): p. 112-24.
59. Moretta, A., *Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(12): p. 957-64.
60. Zitvogel, L., *Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. F9-14.
61. Brenner, B.G., A. Dascal, R.G. Margolese, and M.A. Wainberg, *Natural killer cell function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related diseases*. *J Leukoc Biol*, 1989. **46**(1): p. 75-83.
62. Ahmad, A. and J. Menezes, *Defective killing activity against gp120/41-expressing human erythroleukaemic K562 cell line by monocytes and natural killer cells from HIV-infected individuals*. *AIDS*, 1996. **10**(2): p. 143-9.
63. Brenner, B.G., C. Gryllis, and M.A. Wainberg, *Role of antibody-dependent cellular cytotoxicity and lymphokine-activated killer cells in AIDS and related diseases*. *J Leukoc Biol*, 1991. **50**(6): p. 628-40.
64. Borrego, F., J. Kabat, D.K. Kim, L. Lieto, K. Maasho, J. Pena, R. Solana, and J.E. Coligan, *Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells*. *Mol Immunol*, 2002. **38**(9): p. 637-60.
65. Karre, K., *Natural killer cell recognition of missing self*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 477-80.
66. Karre, K., *NK cells, MHC class I molecules and the missing self*. *Scand J Immunol*, 2002. **55**(3): p. 221-8.
67. Colonna, M., H. Nakajima, and M. Cella, *Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells*. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(5): p. 718-22.
68. Colonna, M., *Immunoglobulin superfamily inhibitory receptors: from natural killer cells to antigen-presenting cells*. *Res Immunol*, 1997. **148**(3): p. 169-71.
69. Colonna, M., *Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors*. *Immunol Rev*, 1997. **155**: p. 127-33.
70. Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, and M.L. Hsu, *A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules*. *Immunity*, 1997. **7**(2): p. 273-82.

71. Navarro, F., M. Llano, P. Garcia, and M. Lopez-Botet, *NK cell mediated recognition of HLA class Ib molecules: role of CD94/NKG2 receptors*. J Reprod Immunol, 1999. **43**(2): p. 167-73.
72. Navarro, F., M. Llano, T. Bellon, M. Colonna, D.E. Geraghty, and M. Lopez-Botet, *The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 277-83.
73. Mavilio, D., J. Benjamin, M. Daucher, G. Lombardo, S. Kottlilil, M.A. Planta, E. Marcenaro, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and A.S. Fauci, *Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15011-6.
74. Ince, M.N., B. Harnisch, Z. Xu, S.K. Lee, C. Lange, L. Moretta, M. Lederman, and J. Lieberman, *Increased expression of the natural killer cell inhibitory receptor CD85j/ILT2 on antigen-specific effector CD8 T cells and its impact on CD8 T-cell function*. Immunology, 2004. **112**(4): p. 531-42.
75. Lichtenfeld, M., D.G. Kavanagh, K.L. Williams, B. Moza, S.K. Mui, T. Miura, R. Sivamurthy, R. Allgaier, F. Pereyra, A. Trocha, M. Feeney, R.T. Gandhi, E.S. Rosenberg, M. Altfeld, T.M. Allen, R. Allen, B.D. Walker, E.J. Sundberg, and X.G. Yu, *A viral CTL escape mutation leading to immunoglobulin-like transcript 4-mediated functional inhibition of myelomonocytic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2813-24.
76. O'Connor, G.M., A. Holmes, F. Mulcahy, and C.M. Gardiner, *Natural Killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function*. Clin Immunol, 2007. **124**(3): p. 277-83.
77. Anfossi, N., J.M. Doisne, M.A. Peyrat, S. Ugolini, O. Bonnaud, D. Bossy, V. Pitard, P. Merville, J.F. Moreau, J.F. Delfraissy, J. Dechanet-Merville, M. Bonneville, A. Venet, and E. Vivier, *Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7223-9.
78. Lazetic, S., C. Chang, J.P. Houchins, L.L. Lanier, and J.H. Phillips, *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4741-5.
79. Brooks, A.G., P.E. Posch, C.J. Scorzelli, F. Borrego, and J.E. Coligan, *NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor*. J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 795-800.
80. Carretero, M., C. Cantoni, T. Bellon, C. Bottino, R. Biassoni, A. Rodriguez, J.J. Perez-Villar, L. Moretta, A. Moretta, and M. Lopez-Botet, *The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules*. Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 563-7.
81. Lopez-Botet, M. and T. Bellon, *Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(3): p. 301-7.
82. Bellon, T., A.B. Heredia, M. Llano, A. Minguela, A. Rodriguez, M. Lopez-Botet, and P. Aparicio, *Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3996-4002.

7. Referencias

Mario Frías Casas

83. Borrego, F., M. Ulbrecht, E.H. Weiss, J.E. Coligan, and A.G. Brooks, *Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis.* J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 813-8.
84. Thomas, R., H.Z. Low, K. Kniesch, R. Jacobs, R.E. Schmidt, and T. Witte, *NKG2C deletion is a risk factor of HIV infection.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2012. **28**(8): p. 844-51.
85. Zhang, R., J. Xu, K. Hong, L. Yuan, H. Peng, H. Tang, P. Ma, Y. Zhang, H. Xing, Y. Ruan, and Y. Shao, *Increased NKG2A found in cytotoxic natural killer subset in HIV-1 patients with advanced clinical status.* AIDS, 2007. **21 Suppl 8**: p. S9-17.
86. Puppo, F., S. Brenci, O. Bosco, L. Lanza, S. Barocci, A. Nocera, M. Ghio, P. Contini, M. Setti, M. Scudeletti, and F. Indiveri, *Downregulation of HLA class I antigen expression in CD4+ T lymphocytes from HIV type 1-infected individuals.* AIDS Res Hum Retroviruses, 1997. **13**(17): p. 1509-16.
87. Kerkau, T., R. Schmitt-Landgraf, A. Schimpl, and E. Wecker, *Downregulation of HLA class I antigens in HIV-1-infected cells.* AIDS Res Hum Retroviruses, 1989. **5**(6): p. 613-20.
88. Kottlilil, S., *Natural killer cells in HIV-1 infection: role of NK cell-mediated non-cytolytic mechanisms in pathogenesis of HIV-1 infection.* Indian J Exp Biol, 2003. **41**(11): p. 1219-25.
89. Kottlilil, S., T.W. Chun, S. Moir, S. Liu, M. McLaughlin, C.W. Hallahan, F. Maldarelli, L. Corey, and A.S. Fauci, *Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function.* J Infect Dis, 2003. **187**(7): p. 1038-45.
90. Kottlilil, S., K. Shin, M. Planta, M. McLaughlin, C.W. Hallahan, M. Ghany, T.W. Chun, M.C. Sneller, and A.S. Fauci, *Expression of chemokine and inhibitory receptors on natural killer cells: effect of immune activation and HIV viremia.* J Infect Dis, 2004. **189**(7): p. 1193-8.
91. Hu, P.F., L.E. Hultin, P. Hultin, M.A. Hausner, K. Hirji, A. Jewett, B. Bonavida, R. Detels, and J.V. Giorgi, *Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995. **10**(3): p. 331-40.
92. Lucia, B., C. Jennings, R. Cauda, L. Ortona, and A.L. Landay, *Evidence of a selective depletion of a CD16+ CD56+ CD8+ natural killer cell subset during HIV infection.* Cytometry, 1995. **22**(1): p. 10-5.
93. Tarazona, R., J.G. Casado, O. Delarosa, J. Torre-Cisneros, J.L. Villanueva, B. Sanchez, M.D. Galiani, R. Gonzalez, R. Solana, and J. Pena, *Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals.* J Clin Immunol, 2002. **22**(3): p. 176-83.
94. Ahmad, R., S.T. Sindhu, E. Toma, R. Morisset, J. Vincelette, J. Menezes, and A. Ahmad, *Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection.* J Clin Immunol, 2001. **21**(3): p. 227-33.
95. Parato, K.G., A. Kumar, A.D. Badley, J.L. Sanchez-Dardon, K.A. Chambers, C.D. Young, W.T. Lim, S. Kravcik, D.W. Cameron, and J.B. Angel,

- Normalization of natural killer cell function and phenotype with effective anti-HIV therapy and the role of IL-10.* AIDS, 2002. **16**(9): p. 1251-6.
96. Sirianni, M.C., F. Ensoli, C. Alario, V. Fiorelli, G. Sacco, S. Topino, F. Iebba, I. Mezzaroma, and F. Aiuti, *Distribution of the natural killer-related receptor for HLA-C during highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection.* Hum Immunol, 2001. **62**(12): p. 1328-34.
 97. Ahmad, R., S.T. Sindhu, P. Tran, E. Toma, R. Morisset, J. Menezes, and A. Ahmad, *Modulation of expression of the MHC class I-binding natural killer cell receptors, and NK activity in relation to viral load in HIV-infected/AIDS patients.* J Med Virol, 2001. **65**(3): p. 431-40.
 98. Scott-Algara, D., F. Vuillier, A. Cayota, and G. Dighiero, *Natural killer (NK) cell activity during HIV infection: a decrease in NK activity is observed at the clonal level and is not restored after in vitro long-term culture of NK cells.* Clin Exp Immunol, 1992. **90**(2): p. 181-7.
 99. Scott-Algara, D. and P. Paul, *NK cells and HIV infection: lessons from other viruses.* Curr Mol Med, 2002. **2**(8): p. 757-68.
 100. Bjorkstrom, N.K., H.G. Ljunggren, and J.K. Sandberg, *CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease.* Trends Immunol, 2010. **31**(11): p. 401-6.
 101. Brunetta, E., K.L. Hudspeth, and D. Mavilio, *Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes.* J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1119-30.
 102. Mavilio, D., G. Lombardo, J. Benjamin, D. Kim, D. Follman, E. Marcenaro, M.A. O'Shea, A. Kinter, C. Kovacs, A. Moretta, and A.S. Fauci, *Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2886-91.
 103. Della Chiesa, M., S. Sivori, R. Castriconi, E. Marcenaro, and A. Moretta, *Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells.* Trends Microbiol, 2005. **13**(3): p. 128-36.
 104. Tasca, S., G. Tambussi, S. Nozza, B. Capiluppi, M.R. Zocchi, L. Soldini, F. Veglia, G. Poli, A. Lazzarin, and C. Fortis, *Escape of monocyte-derived dendritic cells of HIV-1 infected individuals from natural killer cell-mediated lysis.* AIDS, 2003. **17**(16): p. 2291-8.
 105. Raulet, D.H., *Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response.* Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 996-1002.
 106. Ishitani, A. and D.E. Geraghty, *Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 3947-51.
 107. Kovats, S., E.K. Main, C. Librach, M. Stubblebine, S.J. Fisher, and R. DeMars, *A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts.* Science, 1990. **248**(4952): p. 220-3.
 108. Raffel, L.J., J.A. Noble, and J.I. Rotter, *HLA on chromosome 6: the story gets longer and longer.* Diabetes, 2008. **57**(3): p. 527-8.
 109. Breuning, M.H., E.M. van den Berg-Loonen, L.F. Bernini, J.B. Bijlsma, E. van Loghem, P. Meera Khan, and L.E. Nijenhuis, *Localization of HLA on the short arm of chromosome 6.* Hum Genet, 1977. **37**(2): p. 131-9.

7. Referencias

Mario Frías Casas

110. Shiina, T., H. Inoko, and J.K. Kulski, *An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004*. Tissue Antigens, 2004. **64**(6): p. 631-49.
111. Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R.C. Lovering, E.A. Bruford, V.K. Khodiyar, M.J. Lush, S. Povey, C.C. Talbot, Jr., M.W. Wright, H.M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler, and S. Beck, *Gene map of the extended human MHC*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(12): p. 889-99.
112. Paul, P., F.A. Cabestre, E.C. Ibrahim, S. Lefebvre, I. Khalil-Daher, G. Vazeux, R.M. Quiles, F. Bermond, J. Dausset, and E.D. Carosella, *Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells*. Hum Immunol, 2000. **61**(11): p. 1138-49.
113. Carosella, E.D., P. Moreau, J. Lemaoult, and N. Rouas-Freiss, *HLA-G: from biology to clinical benefits*. Trends Immunol, 2008. **29**(3): p. 125-32.
114. LeMaoult, J., M. Le Discorde, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, C. Menier, J. McCluskey, and E.D. Carosella, *Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness*. Tissue Antigens, 2003. **62**(4): p. 273-84.
115. Ellis, S.A., M.S. Palmer, and A.J. McMichael, *Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule*. J Immunol, 1990. **144**(2): p. 731-5.
116. Mallet, V., A. Blaschitz, L. Crisa, C. Schmitt, S. Fournel, A. King, Y.W. Loke, G. Dohr, and P. Le Bouteiller, *HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein*. Int Immunol, 1999. **11**(6): p. 889-98.
117. Le Discorde, M., P. Moreau, P. Sabatier, J.M. Legeais, and E.D. Carosella, *Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue*. Hum Immunol, 2003. **64**(11): p. 1039-44.
118. Ito, T., N. Ito, M. Saathoff, B. Stampachiachiere, A. Bettermann, S. Bulfone-Paus, M. Takigawa, B.J. Nickoloff, and R. Paus, *Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(6): p. 1139-48.
119. Menier, C., M. Rabreau, J.C. Challier, M. Le Discorde, E.D. Carosella, and N. Rouas-Freiss, *Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3153-60.
120. Moreau, P., F. Adrian-Cabestre, C. Menier, V. Guiard, L. Gourand, J. Dausset, E.D. Carosella, and P. Paul, *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 803-11.
121. Carosella, E.D., B. Favier, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, and J. Lemaoult, *Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule*. Blood, 2008. **111**(10): p. 4862-70.
122. Rizzo, R., L. Melchiorri, M. Stignani, and O.R. Baricordi, *HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy*. Hum Immunol, 2007. **68**(4): p. 244-50.
123. Lila, N., C. Amrein, R. Guillemain, P. Chevalier, C. Latremouille, J.N. Fabiani, J. Dausset, E.D. Carosella, and A. Carpentier, *Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1949-54.
124. Pistoia, V., F. Morandi, X. Wang, and S. Ferrone, *Soluble HLA-G: Are they clinically relevant?* Semin Cancer Biol, 2007. **17**(6): p. 469-79.

125. Paul, P., N. Rouas-Freiss, I. Khalil-Daher, P. Moreau, B. Riteau, F.A. Le Gal, M.F. Avril, J. Dausset, J.G. Guillet, and E.D. Carosella, *HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4510-5.
126. Onno, M., C. Pangault, G. Le Friec, V. Guilloux, P. Andre, and R. Fauchet, *Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6426-34.
127. Rouas-Freiss, N., R.E. Marchal, M. Kirszenbaum, J. Dausset, and E.D. Carosella, *The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5249-54.
128. Fournel, S., M. Aguerre-Girr, X. Huc, F. Lenfant, A. Alam, A. Toubert, A. Bensussan, and P. Le Bouteiller, *Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6100-4.
129. Lila, N., N. Rouas-Freiss, J. Dausset, A. Carpentier, and E.D. Carosella, *Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12150-5.
130. Le Rond, S., C. Azema, I. Krawice-Radanne, A. Durrbach, C. Guettier, E.D. Carosella, and N. Rouas-Freiss, *Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3266-76.
131. LeMaoult, J., J. Caumartin, M. Daouya, B. Favier, S. Le Rond, A. Gonzalez, and E.D. Carosella, *Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2040-8.
132. LeMaoult, J., K. Zafaranloo, C. Le Danff, and E.D. Carosella, *HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 662-4.
133. Torres, M.I., M. Le Discorde, P. Lorite, A. Rios, M.A. Gassull, A. Gil, J. Maldonado, J. Dausset, and E.D. Carosella, *Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease*. Int Immunol, 2004. **16**(4): p. 579-83.
134. Rizzo, R., L. Melchiorri, L. Simone, M. Stignani, A. Marzola, S. Gullini, and O.R. Baricordi, *Different production of soluble HLA-G antigens by peripheral blood mononuclear cells in ulcerative colitis and Crohn's disease: a noninvasive diagnostic tool?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(1): p. 100-5.
135. Hviid, T.V., S. Hylenius, C. Rorbye, and L.G. Nielsen, *HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels*. Immunogenetics, 2003. **55**(2): p. 63-79.
136. Glas, J., H.P. Torok, L. Tonenchi, M. Wetzke, V. Beynon, M.Y. Teshome, S. Cotofana, U. Schiemann, T. Griga, W. Klein, J.T. Epplen, C. Folwaczny, M. Folwaczny, T. Mussack, and E.H. Weiss, *The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease*. Int Immunol, 2007. **19**(5): p. 621-6.

7. Referencias

Mario Frías Casas

137. Torres, M.I., M.A. Lopez-Casado, J. Luque, J. Pena, and A. Rios, *New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G*. *Int Immunol*, 2006. **18**(5): p. 713-8.
138. Aractingi, S., N. Briand, C. Le Danff, M. Viguiet, H. Bachelez, L. Michel, L. Dubertret, and E.D. Carosella, *HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells?* *Am J Pathol*, 2001. **159**(1): p. 71-7.
139. Borghi, A., E. Fogli, M. Stignani, L. Melchiorri, E. Altieri, O. Baricordi, R. Rizzo, and A. Virgili, *Soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels in plasma of psoriatic patients: preliminary study on a possible correlation between generalized immune status, treatments and disease*. *Arch Dermatol Res*, 2008. **300**(10): p. 551-9.
140. Feuchtenberger, M., S. Muller, P. Roll, A. Waschbisch, A. Schafer, C. Kneitz, H. Wiendl, and H.P. Tony, *Frequency of regulatory T cells is not affected by transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis*. *Open Rheumatol J*, 2008. **2**: p. 81-8.
141. Alcami, A. and U.H. Koszinowski, *Viral mechanisms of immune evasion*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(9): p. 410-8.
142. Carosella, E.D., K.Y. HoWangYin, B. Favier, and J. LeMaout, *HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance*. *Hum Immunol*, 2008. **69**(11): p. 700-7.
143. Tripathi, P. and S. Agrawal, *The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection*. *AIDS*, 2007. **21**(11): p. 1395-404.
144. Cabello, A., A. Rivero, M.J. Garcia, J.M. Lozano, J. Torre-Cisneros, R. Gonzalez, G. Duenas, M.D. Galiani, A. Camacho, M. Santamaria, R. Solana, C. Montero, J.M. Kindelan, and J. Pena, *HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals*. *Hum Immunol*, 2003. **64**(11): p. 1045-9.
145. Rivero, A., J.M. Lozano, R. Gonzalez, G. Garcia-Jurado, A. Camacho, J. Torres-Cisneros, and J. Pena, *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors are able and protease inhibitors unable to induce the tolerogenic molecule HLA-G1 on monocytes from HIV-1 infected patients*. *Hum Immunol*, 2007. **68**(4): p. 303-6.
146. Lozano, J.M., R. Gonzalez, J. Luque, M. Frias, A. Rivero, and J. Pena, *CD8(+)/HLA-G(+) regulatory T cells are expanded in HIV-1-infected patients*. *Viral Immunol*, 2009. **22**(6): p. 463-5.
147. Feger, U., E. Tolosa, Y.H. Huang, A. Waschbisch, T. Biedermann, A. Melms, and H. Wiendl, *HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation*. *Blood*, 2007. **110**(2): p. 568-77.
148. Matte, C., J. Lajoie, J. Lacaille, L.S. Zijenah, B.J. Ward, and M. Roger, *Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women*. *AIDS*, 2004. **18**(3): p. 427-31.
149. Lajoie, J., J. Hargrove, L.S. Zijenah, J.H. Humphrey, B.J. Ward, and M. Roger, *Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1*. *J Infect Dis*, 2006. **193**(2): p. 298-301.
150. Hoxie, J.A. and C.H. June, *Novel cell and gene therapies for HIV*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(10).

151. Shankar, E.M., V. Velu, R. Vignesh, S. Vijayaraghavalu, D.V. Rukumani, and N.S. Sabet, *Recent advances targeting innate immunity-mediated therapies against HIV-1 infection*. Microbiol Immunol, 2012. **56**(8): p. 497-505.
152. Pett, S.L., *Immunotherapies in HIV-1 infection*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(3): p. 188-93.
153. Barreiro, P., T. Garcia-Benayas, A. Rendon, S. Rodriguez-Novoa, and V. Soriano, *Combinations of nucleoside/nucleotide analogues for HIV therapy*. AIDS Rev, 2004. **6**(4): p. 234-43.
154. Temesgen, Z. and A.J. Wright, *Antiretrovirals*. Mayo Clin Proc, 1999. **74**(12): p. 1284-301.
155. Vivet-Boudou, V., J. Didierjean, C. Isel, and R. Marquet, *Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(2): p. 163-86.
156. Eron, J.J., Jr., *HIV-1 protease inhibitors*. Clin Infect Dis, 2000. **30 Suppl 2**: p. S160-70.
157. Sommadossi, J.P., *HIV protease inhibitors: pharmacologic and metabolic distinctions*. AIDS, 1999. **13 Suppl 1**: p. S29-40.
158. Cooley, L.A. and S.R. Lewin, *HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy*. J Clin Virol, 2003. **26**(2): p. 121-32.
159. Kravchenko, A.V., *[Raltegravir is the first HIV integrase inhibitor as part of antiretroviral treatment regimens]*. Ter Arkh, 2010. **82**(11): p. 27-32.
160. Neamati, N., *Structure-based HIV-1 integrase inhibitor design: a future perspective*. Expert Opin Investig Drugs, 2001. **10**(2): p. 281-96.
161. Oxenius, A., D.A. Price, H.F. Gunthard, S.J. Dawson, C. Fagard, L. Perrin, M. Fischer, R. Weber, M. Plana, F. Garcia, B. Hirschel, A. McLean, and R.E. Phillips, *Stimulation of HIV-specific cellular immunity by structured treatment interruption fails to enhance viral control in chronic HIV infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13747-52.
162. Barouch, D.H., *Challenges in the development of an HIV-1 vaccine*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 613-9.
163. Letvin, N.L., *Strategies for an HIV vaccine*. J Clin Invest, 2002. **110**(1): p. 15-20.
164. Letvin, N.L., *Virology. Moving forward in HIV vaccine development*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1196-8.
165. Virgin, H.W. and B.D. Walker, *Immunology and the elusive AIDS vaccine*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 224-31.
166. Kaiser, J., *AIDS research. Review of vaccine failure prompts a return to basics*. Science, 2008. **320**(5872): p. 30-1.
167. Burton, D.R. and R.A. Weiss, *AIDS/HIV. A boost for HIV vaccine design*. Science, 2010. **329**(5993): p. 770-3.
168. Fauci, A.S., M.I. Johnston, C.W. Dieffenbach, D.R. Burton, S.M. Hammer, J.A. Hoxie, M. Martin, J. Overbaugh, D.I. Watkins, A. Mahmoud, and W.C. Greene, *HIV vaccine research: the way forward*. Science, 2008. **321**(5888): p. 530-2.
169. Letvin, N.L. and B.D. Walker, *Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 861-6.
170. Plana, M., F. Garcia, T. Gallart, J.M. Miro, and J.M. Gatell, *Lack of T-cell proliferative response to HIV-1 antigens after 1 year of highly active antiretroviral treatment in early HIV-1 disease. Immunology Study Group of Spanish EARTH-1 Study*. Lancet, 1998. **352**(9135): p. 1194-5.

7. Referencias

Mario Frías Casas

171. Garcia, F., M. Plana, C. Vidal, A. Cruceta, W.A. O'Brien, G. Pantaleo, T. Pumarola, T. Gallart, J.M. Miro, and J.M. Gatell, *Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy*. AIDS, 1999. **13**(11): p. F79-86.
172. Carcelain, G., R. Tubiana, A. Samri, V. Calvez, C. Delaugerre, H. Agut, C. Katlama, and B. Autran, *Transient mobilization of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4 T-helper cells fails to control virus rebounds during intermittent antiretroviral therapy in chronic HIV type 1 infection*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 234-41.
173. Martinez, E., A. Mocroft, M.A. Garcia-Viejo, J.B. Perez-Cuevas, J.L. Blanco, J. Mallolas, L. Bianchi, I. Conget, J. Blanch, A. Phillips, and J.M. Gatell, *Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study*. Lancet, 2001. **357**(9256): p. 592-8.
174. Autran, B., P. Debre, B. Walker, and C. Katlama, *Therapeutic vaccines against HIV need international partnerships*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(6): p. 503-8.
175. Eger, K.A. and D. Unutmaz, *Perturbation of natural killer cell function and receptors during HIV infection*. Trends Microbiol, 2004. **12**(7): p. 301-3.
176. Donaghy, H., B. Gazzard, F. Gotch, and S. Patterson, *Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4505-11.
177. Chehimi, J., D.E. Campbell, L. Azzoni, D. Bacheller, E. Papasavvas, G. Jerandi, K. Mounzer, J. Kostman, G. Trinchieri, and L.J. Montaner, *Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4796-801.
178. Steinman, R.M. and M. Pope, *Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy*. J Clin Invest, 2002. **109**(12): p. 1519-26.
179. Kawamura, T., H. Gatanaga, D.L. Borris, M. Connors, H. Mitsuya, and A. Blauvelt, *Decreased stimulation of CD4+ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4260-6.
180. Granelli-Piperno, A., A. Golebiowska, C. Trumfheller, F.P. Siegal, and R.M. Steinman, *HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(20): p. 7669-74.
181. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.
182. Dhodapkar, M.V. and R.M. Steinman, *Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans*. Blood, 2002. **100**(1): p. 174-7.
183. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka, *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
184. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
185. Larsson, M., J.F. Fonteneau, and N. Bhardwaj, *Cross-presentation of cell-associated antigens by dendritic cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2003. **276**: p. 261-75.

186. Ardavin, C., S. Amigorena, and C. Reis e Sousa, *Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy*. *Immunity*, 2004. **20**(1): p. 17-23.
187. Serrano-Gomez, D., A. Dominguez-Soto, J. Ancochea, J.A. Jimenez-Heffernan, J.A. Leal, and A.L. Corbi, *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of Aspergillus fumigatus conidia by dendritic cells and macrophages*. *J Immunol*, 2004. **173**(9): p. 5635-43.
188. Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, G. de la Rosa, A. Puig-Kroger, J. Garcia-Bordas, D. Martin, N. Longo, A. Cuadrado, C. Cabanas, A.L. Corbi, P. Sanchez-Mateos, and J.L. Rodriguez-Fernandez, *Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells*. *Blood*, 2004. **104**(3): p. 619-25.
189. Ardavin, C., *Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(7): p. 582-90.
190. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia, *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 389-400.
191. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R.M. Steinman, *The use of dendritic cells in cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(2): p. 138-47.
192. Celluzzi, C.M., J.I. Mayordomo, W.J. Storkus, M.T. Lotze, and L.D. Falo, Jr., *Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity*. *J Exp Med*, 1996. **183**(1): p. 283-7.
193. Berard, F., P. Blanco, J. Davoust, E.M. Neidhart-Berard, M. Nouri-Shirazi, N. Taquet, D. Rimoldi, J.C. Cerottini, J. Banchereau, and A.K. Palucka, *Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(11): p. 1535-44.
194. Dhodapkar, M.V., J. Krasovsky, R.M. Steinman, and N. Bhardwaj, *Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans without foreign helper epitopes*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(6): p. R9-R14.
195. Filgueira, L., F.O. Nestle, M. Rittig, H.I. Joller, and P. Groscurth, *Human dendritic cells phagocytose and process Borrelia burgdorferi*. *J Immunol*, 1996. **157**(7): p. 2998-3005.
196. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler, *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability*. *J Immunol Methods*, 1996. **196**(2): p. 137-51.
197. Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R.M. Steinman, and N. Bhardwaj, *Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood*. *J Immunol Methods*, 1996. **196**(2): p. 121-35.
198. Bender, A., M. Sapp, M. Feldman, A. Reddy, R. Seder, G. Schuler, R.M. Steinman, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells as immunogens for human CTL responses*. *Adv Exp Med Biol*, 1997. **417**: p. 383-7.
199. Kwon, D.S., G. Gregorio, N. Bitton, W.A. Hendrickson, and D.R. Littman, *DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection*. *Immunity*, 2002. **16**(1): p. 135-44.
200. Sapp, M., J. Engelmayer, M. Larsson, A. Granelli-Piperno, R. Steinman, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients*

7. Referencias

Mario Frías Casas

- are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunol Lett*, 1999. **66**(1-3): p. 121-8.
201. Chougnet, C., S.S. Cohen, T. Kawamura, A.L. Landay, H.A. Kessler, E. Thomas, A. Blauvelt, and G.M. Shearer, *Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy*. *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1666-73.
 202. Fan, Z., X.L. Huang, L. Zheng, C. Wilson, L. Borowski, J. Liebmann, P. Gupta, J. Margolick, and C. Rinaldo, *Cultured blood dendritic cells retain HIV-1 antigen-presenting capacity for memory CTL during progressive HIV-1 infection*. *J Immunol*, 1997. **159**(10): p. 4973-82.
 203. Garcia, F., M. Lejeune, N. Climent, C. Gil, J. Alcamí, V. Morente, L. Alos, A. Ruiz, J. Setoain, E. Fumero, P. Castro, A. Lopez, A. Cruceta, C. Piera, E. Florence, A. Pereira, A. Libois, N. Gonzalez, M. Guila, M. Caballero, F. Lomena, J. Joseph, J.M. Miro, T. Pumarola, M. Plana, J.M. Gatell, and T. Gallart, *Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection*. *J Infect Dis*, 2005. **191**(10): p. 1680-5.
 204. Larsson, M., J.F. Fonteneau, M. Lirvall, P. Haslett, J.D. Lifson, and N. Bhardwaj, *Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus*. *AIDS*, 2002. **16**(10): p. 1319-29.
 205. Zhao, X.Q., X.L. Huang, P. Gupta, L. Borowski, Z. Fan, S.C. Watkins, E.K. Thomas, and C.R. Rinaldo, Jr., *Induction of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD8(+) and CD4(+) T-cell reactivity by dendritic cells loaded with HIV-1 X4-infected apoptotic cells*. *J Virol*, 2002. **76**(6): p. 3007-14.
 206. Garcia, F., N. Climent, L. Assoumou, C. Gil, N. Gonzalez, J. Alcamí, A. Leon, J. Romeu, J. Dalmau, J. Martinez-Picado, J. Lifson, B. Autran, D. Costagliola, B. Clotet, J.M. Gatell, M. Plana, and T. Gallart, *A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection*. *J Infect Dis*, 2011. **203**(4): p. 473-8.
 207. Palella, F.J., Jr., K.M. Delaney, A.C. Moorman, M.O. Loveless, J. Fuhrer, G.A. Satten, D.J. Aschman, and S.D. Holmberg, *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(13): p. 853-60.
 208. Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L.M. Carruth, C. Buck, R.E. Chaisson, T.C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D.D. Ho, D.D. Richman, and R.F. Siliciano, *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1295-300.
 209. Wong, J.K., M. Hezareh, H.F. Gunthard, D.V. Havlir, C.C. Ignacio, C.A. Spina, and D.D. Richman, *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia*. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1291-5.
 210. Miro, J.M., A. Antela, J. Arrizabalaga, B. Clotet, J.M. Gatell, L. Guerra, J. Antonio Iribarren, F. Laguna, S. Moreno, F. Parras, R. Rubio, J.M. Santamaria, and P. Viciano, *[Recommendations of GESIDA (Grupo de Estudio de SIDA)/National Plan on AIDS with respect to the anti-retroviral treatment in adult patients infected with the human immunodeficiency virus in the year 2000 (II)]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2000. **18**(8): p. 396-412.
 211. Luque, J., J.M. Lozano, G. Garcia-Jurado, N. Soriano-Sarabia, R. Gonzalez, A. Vallejo, M. Leal, and J. Pena, *NK-associated regulatory receptors in a*

- structured HAART interruption of HIV-1-positive individuals. AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008. **24**(8): p. 1037-42.
212. Sirianni, M.C., I. Mezzaroma, F. Aiuti, and A. Moretta, *Analysis of the cytolytic activity mediated by natural killer cells from acquired immunodeficiency syndrome patients in response to phytohemagglutinin or anti-CD16 monoclonal antibody. Eur J Immunol*, 1994. **24**(8): p. 1874-8.
 213. Ahmad, A. and J. Menezes, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. FASEB J*, 1996. **10**(2): p. 258-66.
 214. Lin, S.J., R.L. Roberts, B.J. Ank, Q.H. Nguyen, E.K. Thomas, and E.R. Stiehm, *Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on activated natural killer (ANK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in HIV infection. J Clin Immunol*, 1998. **18**(5): p. 335-45.
 215. Alter, G. and M. Altfeld, *NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. J Intern Med*, 2009. **265**(1): p. 29-42.
 216. Hong, H.S., J.M. Eberhard, P. Keudel, B.A. Bollmann, F. Ahmad, M. Ballmaier, N. Bhatnagar, M. Zielinska-Skowronek, R.E. Schmidt, and D. Meyer-Olson, *Phenotypically and functionally distinct subsets contribute to the expansion of CD56-/CD16+ natural killer cells in HIV infection. AIDS*, 2010. **24**(12): p. 1823-34.
 217. Oliva, A., A.L. Kinter, M. Vaccarezza, A. Rubbert, A. Catanzaro, S. Moir, J. Monaco, L. Ehler, S. Mizell, R. Jackson, Y. Li, J.W. Romano, and A.S. Fauci, *Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. J Clin Invest*, 1998. **102**(1): p. 223-31.
 218. Bluman, E.M., K.J. Bartynski, B.R. Avalos, and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. J Clin Invest*, 1996. **97**(12): p. 2722-7.
 219. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 657-700.
 220. Berger, E.A., *HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. AIDS*, 1997. **11 Suppl A**: p. S3-16.
 221. Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P.D. Ponath, L. Wu, C.R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski, *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. Cell*, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
 222. Fehniger, T.A., G. Herbein, H. Yu, M.I. Para, Z.P. Bernstein, W.A. O'Brien, and M.A. Caligiuri, *Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6433-8.
 223. Monsivais-Urenda, A., P. Nino-Moreno, C. Abud-Mendoza, L. Baranda, E. Layseca-Espinosa, M. Lopez-Botet, and R. Gonzalez-Amaro, *Analysis of expression and function of the inhibitory receptor ILT2 (CD85j/LILRB1/LIR-1) in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). J Autoimmun*, 2007. **29**(2-3): p. 97-105.
 224. Banham, A.H., M. Colonna, M. Cella, K.J. Micklem, K. Pulford, A.C. Willis, and D.Y. Mason, *Identification of the CD85 antigen as ILT2, an inhibitory MHC class I receptor of the immunoglobulin superfamily. J Leukoc Biol*, 1999. **65**(6): p. 841-5.

7. Referencias

Mario Frías Casas

225. Favier, B., J. Lemaoult, E. Lesport, and E.D. Carosella, *ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse*. FASEB J, 2010. **24**(3): p. 689-99.
226. Morel, E. and T. Bellon, *HLA class I molecules regulate IFN-gamma production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2368-81.
227. Fernandez, N.C., C. Flament, F. Crepineau, E. Angevin, E. Vivier, and L. Zitvogel, *Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk*. Eur Cytokine Netw, 2002. **13**(1): p. 17-27.
228. Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens, and T.P. Salazar-Mather, *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
229. McMichael, A.J. and S.L. Rowland-Jones, *Cellular immune responses to HIV*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 980-7.
230. Alcami, A. and U.H. Koszinowski, *Viral mechanisms of immune evasion*. Immunol Today, 2000. **21**(9): p. 447-55.
231. Shiroishi, M., K. Tsumoto, K. Amano, Y. Shirakihara, M. Colonna, V.M. Braud, D.S. Allan, A. Makadzange, S. Rowland-Jones, B. Willcox, E.Y. Jones, P.A. van der Merwe, I. Kumagai, and K. Maenaka, *Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8856-61.
232. Fainardi, E., M. Castellazzi, M. Stignani, F. Morandi, G. Sana, R. Gonzalez, V. Pistoia, O.R. Baricordi, E. Sokal, and J. Pena, *Emerging topics and new perspectives on HLA-G*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(3): p. 433-51.

8. Anexo



8.1 Abreviaturas

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

NK: Natural Killer

CD-DM: Células dendríticas derivadas de monocitos

CD: Células dendríticas

APC: Células presentadoras de antígenos

TARGA: Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad

CD4: Linfocitos colaboradores

CTL: Linfocitos citotóxicos

CD8: Linfocitos citotóxicos

IFN: Interferón

HLA: Human Leukocyte Antigen

ILT: Immunoglobulin-like transcripts

NKG2: killer cell lectin-like receptor subfamily C

IL-10: Interleuquina 10

FITC: Fluorescein isothiocyanate

PE: Phycoerythrin

PerCP: Peridinin chlorophyll

APC: Allophycocyanin

PBMC: Células Mononucleares de sangre periférica

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

PBS: Tampón fosfato salino

8.Anexo

Mario Frías Casas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CCR5: CC-Chemokine receptor-5

8.2 Grupos de Pacientes

Paciente	Grupo
DCV01	Placebo
DCV02	Placebo
DCV04	Placebo
DCV05	Placebo
DCV06	Vacuna
DCV07	Vacuna
DCV08	Placebo
DCV09	Placebo
DCV10	Vacuna
DCV11	Vacuna
DCV13	Vacuna
DCV15	Placebo
DCV16	Placebo
DCV18	Placebo
DCV19	Placebo
DCV20	Vacuna
DCV22	Placebo
DCV23	Vacuna
DCV24	Vacuna
DCV25	Vacuna
DCV26	Vacuna
DCV27	Placebo

8.3 Tablas con porcentajes de Citometría

	% de células CD56^{dim} en cada una de los puntos de seguimiento						
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	73,91	96,55	36,07	40,53	55,05	37,05	29,85
DCV02	59,38	62,28	57,05	40,21	42,5		
DCV04	6,92	17,07	33,88	20,72	25,71	22,1	
DCV05	26,43	25,51	38,67	26,38	37,34	26,47	33,36
DCV06	12,36	31,64		9,17	15,71	19,94	16
DCV07	22,44	22,39	20,18	18,24	39,46		
DCV08	22,09	26,03	41,16	48,01		33,23	
DCV09		59,86	54,32	55,88	43,16		28,61
DCV10	5,87	16,9	12,67	9,14	5,2	12,92	24,76
DCV11	56,43	31,23	37,84	60,04	57,5		
DCV13	36,77	37,62	35,62	33,39	43,38	22,3	22,15
DCV15		49,06	21,76	29,17	34,38	35,17	37,8
DCV16	43,09	21,71	42,14	24,53	29,29		64,14
DCV18	69,63	40,81	59,96		77,48	63,71	71,55
DCV19	55,54	31,36	42,14	24,53	29,29	64,14	46,29
DCV20	38,97	57,07	40,89	22,4	27,94	41,54	43,31
DCV22	46,04	52,78	72,25	74,68	57,59	76,05	54,92
DCV23		51,84	48,91	56,45	58,49	22,57	37,14
DCV24	47,71	54,8	53,02	51,16	53,53	50,57	
DCV25	49,33	16,07	20,3	32,97	26,75	10,64	19,96
DCV26	32,41		27,13	35,19	20,46	13,77	
DCV27		47,51	65,64	31,89	76,89	80,36	15,56

% de células CD56^{bright} en cada una de los puntos de seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	4,76	3,44	0,51	2,64	2,9	2,34	0,79
DCV02	2,94	2,17	3,75	4,78	1,09		
DCV04	1,06	0,79	2,51	0,46	3,08	1,75	
DCV05	2,03	1,67	1,8	0,92	2,87	1,61	1,54
DCV06	1,67	2,81		0,38	0,83	1,54	1,45
DCV07	0,97	0,67	1,01	0,36	2,92		
DCV08	2,05	3,27	1,93	2,98		2,25	
DCV09		13,9	15,22	15,44	6,23		1,71
DCV10	0,23	0,76	1,49	0,88	0,4	0,72	0,68
DCV11	4,16	2,44	3,43	3,21	2,73		
DCV13	5,84	2,57	5,79	16,55	19,18	3,39	4
DCV15		15,1	13,18	15,58	17,51	24,87	11,22
DCV16	12,56	3,7	11,99	9,75	11,71		18,67
DCV18	7,61	4,31	6,47		4,72	4,22	4,85
DCV19	11,79	17,6	11,99	9,75	11,71	18,67	18,73
DCV20	3,31	4,4	5,45	3,05	2,09	4,81	4,45
DCV22	18,19	15,08	8,42	5,27	6,92	3,73	5,32
DCV23		12,7	7,42	7,84	7,89	4,84	5,89
DCV24	4,42	9,29	4,71	9,2	10,85	5,43	
DCV25	8,5	9,06	14	11,6	7,89	3,38	6,75
DCV26	4,43		4,81	4,16	2,66	1,92	
DCV27		8,8	16,52	5,15	22,12	19,43	4,4

8.Anexo

Mario Frías Casas

% de células CD56^{neg} en cada una de los puntos de seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01		21,32	63,40	56,81	47,30	57,08	69,35
DCV02	37,68	35,54	39,20	55,00	56,40		
DCV04	92,84	82,48	63,61	78,81	71,21	76,13	
DCV05	71,53	72,81	59,53	72,68	59,78	71,91	65,08
DCV06	75,84	70,68	56,90	49,00		64,51	
DCV07		26,23	30,45	28,67	50,59		69,67
DCV08		35,83	65,04	68,30	48,09	39,94	50,27
DCV09	44,33	74,57	45,86	65,70	58,98		17,18
DCV10	22,74	54,87	33,55		17,79	32,05	23,59
DCV11	32,65	51,03	45,86	65,70	58,98	17,18	34,97
DCV13	35,75	32,12	19,66	19,96	34,48	20,21	39,56
DCV15		43,67	1,63	21,75	,08	,02	31,46
DCV16	85,96	65,54		90,44	83,44	78,51	82,58
DCV18	76,50	78,28	78,80	79,22	57,61		
DCV19	93,89	82,33	85,83	89,97	94,39	86,34	74,55
DCV20	39,40	66,32	58,71	36,74	39,72		
DCV22	57,37	59,80	58,57	50,04	37,42	74,29	73,84
DCV23	57,70	38,52	53,64	74,53	69,95	53,64	52,22
DCV24		35,44	43,65	35,69	33,60	72,57	56,96
DCV25	47,85	35,90	42,25	39,63	35,63	43,98	
DCV26	42,16	74,86	65,68	55,41	65,34	85,97	73,28
DCV27		63,14	67,48	60,63	76,87	84,30	

% de células CD56^{dim} que expresan CD94-NKG2A a lo largo del seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	17,29	17,06	25,92	11,33	12,75	70,75	30,88
DCV02	23,48	14,05	18,74	64,82	20,18		
DCV04	11,97	16,61	3,92	23,23	20,80	10,87	
DCV05	45,60	52,69	48,30	51,88	47,09	43,42	26,66
DCV06	35,31	13,63		10,23	4,83	5,20	6,09
DCV07	17,62	5,58	4,60	9,58	3,05		
DCV08	31,77	49,32	71,20	19,12		15,22	
DCV09		48,63	63,14	75,87	44,01		58,62
DCV10	86,61	75,31	50,85	69,47	79,27	82,39	86,90
DCV11	22,06	17,49	25,89	22,13	24,48		
DCV13	52,49	28,07	33,67	14,23	36,34	36,67	28,87
DCV15		33,21	51,84	18,12	3,39	9,14	20,82
DCV16	52,00	60,12	69,56	69,04	29,64		3,05
DCV18	14,58	14,69	10,24		8,83	11,50	8,23
DCV19	34,74	70,12	69,56	69,04	29,64	3,05	6,75
DCV20	8,74	6,17	7,18	7,65	4,02	10,09	3,41
DCV22	3,26	3,56	8,64	3,03	3,84	3,96	4,88
DCV23		3,82	11,53	11,07	4,38	16,78	4,23
DCV24	3,53	2,36	,32	2,06	3,02	2,45	
DCV25	2,36	23,54	16,75	18,01	16,36	40,25	20,97
DCV26	5,33		13,57	6,81	16,92	22,63	
DCV27		55,90	69,12	50,90	77,12	59,33	64,71

8.Anexo

Mario Frías Casas

% de células CD56 ^{bright} que expresan CD94-NKG2A a lo largo del seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	75,42	65,41	80,00	50,43	76,02	78,63	83,05
DCV02	81,36	61,84	79,40	80,56	27,91		
DCV04	27,27	66,67	44,30	54,55	50,58	53,85	
DCV05	93,10	91,67	90,36	84,06	83,93	84,43	60,73
DCV06	72,00	53,85	90,91	30,61		52,17	
DCV07		88,93	92,82	90,35	76,72		80,57
DCV08	71,43	82,86		66,67	51,52	57,14	39,47
DCV09	84,62	31,25	32,26	71,79	29,63		
DCV10	90,74	90,77	70,73	85,92	86,88	88,81	90,93
DCV11	58,85	36,84	54,66	42,24	53,91		
DCV13	79,96	63,33	55,29	31,83	54,39	63,86	50,11
DCV15		78,45	96,14	75,20	38,46	66,18	72,90
DCV16	82,25	87,94	87,07	87,57	70,03		72,75
DCV18	50,69	74,04	34,43		35,25	58,63	51,06
DCV19	84,96	77,66	87,07	87,57	70,03	72,75	75,93
DCV20	36,02	48,64	34,14	49,16	25,16	64,10	21,30
DCV22	8,52	6,16	20,36	12,65	8,01	16,43	19,03
DCV23		21,24	54,00	39,77	19,12	37,96	32,08
DCV24	7,77	3,89	1,66	2,53	5,45	5,88	
DCV25	43,32	73,56	58,35	53,22	80,77	86,64	35,15
DCV26	26,23		52,58	36,15	61,65	75,00	
DCV27		89,86	88,47	80,00	93,10	87,96	86,98

% de células CD56^{dim} que expresan CD94-NKG2C a lo largo del seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	55,57	40,66	66,50	38,49	62,41	62,74	59,14
DCV02	40,99	39,25	28,16	30,53	26,32		
DCV04	2,20	5,73	3,96	1,99	13,29	1,68	
DCV05	11,82	14,69	16,70	16,16	12,39	13,56	15,36
DCV06	40,45	37,07		51,15	60,03	57,58	30,01
DCV07	72,46	63,13	60,61	72,26	62,39		
DCV08	14,29	23,08	33,11	7,02		5,53	
DCV09		6,36	8,57	10,86	9,10		7,38
DCV10	62,41	48,98	26,40	46,79	59,02	63,85	71,41
DCV11	30,82	34,68	30,65	16,67	25,93		
DCV13	17,95	17,97	20,86	16,32	16,77	18,57	13,86
DCV15		3,75	8,31	5,40	1,13	6,33	6,75
DCV16	6,18	,21	9,70	14,94	6,14	2,77	
DCV18	20,85	25,89	27,43		16,91	16,57	14,75
DCV19	4,36	46,54	9,70	14,94	6,14	2,77	2,76
DCV20	11,39	8,67	11,73	24,11	6,59	7,47	5,11
DCV22	42,08	59,17	65,44	79,16	74,43	71,98	52,19
DCV23		37,00	35,94	40,67	27,59	42,23	33,01
DCV24	51,74	51,11	45,40	40,27	47,31	43,34	
DCV25	1,15	7,64	14,42	11,41	6,24	18,41	7,55
DCV26	7,98		13,73	7,95	5,59	9,12	
DCV27		15,30	12,16	13,51	17,83	6,45	16,15

8.Anexo

Mario Frías Casas

% de células CD56 ^{bright} que expresan CD94-NKG2C a lo largo del seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	38,57	38,24	73,10	66,52	40,18	25,40	35,90
DCV02	6,98	8,49	2,33	4,50	11,11		
DCV04	,0	14,71	12,10	6,67	18,03	5,00	
DCV05	7,46	17,72	18,75	42,50	30,14	27,85	31,61
DCV06	7,69	9,62		14,29	16,92	15,69	10,71
DCV07	13,51	40,28	18,75	18,18	39,66		
DCV08	3,03	36,36	21,74	11,11		11,93	
DCV09		6,54	9,17	13,71	10,32		16,44
DCV10	26,67	16,90	15,49	21,74	31,88	42,41	42,68
DCV11	25,42	40,00	23,75	66,67	29,41		
DCV13	22,16	10,77	19,97	18,40	17,25	12,69	12,55
DCV15		7,89	19,90	15,43	8,22	24,30	12,05
DCV16	9,35	,50	10,30	16,67	16,42		14,92
DCV18	25,94	20,69	41,58		24,02	21,47	18,81
DCV19	9,73	53,92	10,30	16,67	16,42	14,92	8,93
DCV20	33,65	33,25	40,18	24,18	38,05	27,72	19,22
DCV22	83,23	81,25	72,87	82,81	83,61	87,41	80,56
DCV23		22,70	22,33	25,65	42,06	13,04	35,22
DCV24	70,99	68,73	62,37	60,81	71,52	76,01	
DCV25	8,48	19,48	13,36	23,62	15,31	14,77	13,70
DCV26	18,67		14,45	13,80	8,41	8,15	
DCV27		8,06	4,45	4,93	8,01	2,29	11,75

% de células CD56 ^{dim} que expresan ILT-2/CD85j a lo largo del seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	21,36		6,07	13,26	44,52	1,47	8,45
DCV02	52,56	,66	36,52	3,39	2,05		
DCV04	1,49	3,65	9,73	,55	14,64	,95	
DCV05	14,89	13,18	36,28	12,74	17,46	10,71	7,99
DCV06	3,65	2,04		3,11	4,91	6,21	5,68
DCV07	,98	1,71	,98	1,00	,44		
DCV08	5,90	6,85	2,78	1,25		1,15	
DCV09		8,39	2,33	3,82	,54		,47
DCV10	16,34	27,40	12,24	7,39	3,50	10,33	,86
DCV11	9,49	7,78	4,18	2,50	,93		
DCV13	47,98	4,31	3,52	2,34	7,03	4,28	1,83
DCV15		7,14	2,54	1,65	1,87	5,00	,62
DCV16	3,36	1,55	1,34	,22	3,49		1,85
DCV18	1,19	6,07	1,42		3,20	3,16	,94
DCV19	1,35	2,33	1,34	,22	3,49	1,85	,72
DCV20	14,71	7,14	,59	2,65	1,91	1,87	,84
DCV22	,85	6,44	1,88	4,09	,68	,36	,51
DCV23		2,34	3,26	1,23	2,29	,59	,50
DCV24	15,19	48,78	20,02	16,81	5,48	9,91	
DCV25	47,79	39,92	13,17	6,49	2,26	2,08	1,06
DCV26	15,53		6,06	6,86	2,21	,46	
DCV27		16,39	,81	4,87	44,46	,82	,82

8.Anexo

Mario Frías Casas

% de células CD56 ^{bright} que expresan ILT-2/CD85j a lo largo del seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	10,05		7,69	17,30	18,72	,0	2,50
DCV02	3,54	,0	6,73	,81	,0		
DCV04	,0	5,71	5,62	,0	9,38	,0	
DCV05	14,44	8,33	23,67	13,51	16,54	8,21	13,04
DCV06	3,23	4,44	,0	,0		,0	
DCV07		,77	,0	,72	1,27		,0
DCV08	,0	,0	,0	,0	,0	,0	,0
DCV09	2,90	2,27	,36	,0	,34		,0
DCV10	,69	1,67	1,64		2,52	,65	,86
DCV11	,74	1,41	,36	,0	,34	,0	,25
DCV13	,79	5,11	1,87	1,61	,0	,96	,0
DCV15		4,43	,0	2,58	22,90	10,21	,36
DCV16	1,29	,95		2,11	3,78	1,44	1,39
DCV18	,0	1,27	,0	,0	,0		
DCV19	2,86	10,67	,0	1,41	1,03	4,12	1,39
DCV20	7,69	7,69	2,56	,0	2,38		
DCV22	44,68	3,12	4,72	3,33	12,79	3,54	3,12
DCV23	8,50	5,80	,96	,0	1,56	2,13	,57
DCV24		,63	1,02	,47	,51	,95	,0
DCV25	25,41	60,49	25,58	17,57	7,70	10,40	
DCV26	17,12	18,12	5,35	1,20	2,05	,65	,0
DCV27	5,19		1,61	3,90	,0	,0	

% de células CD56^{neg} que expresan ILT-2/CD85j a lo largo del seguimiento							
	-2	-1	1	3	16	24	48
DCV01	30,93		4,78	46,51	45,88	1,89	20,58
DCV02	70,57	2,59	57,57	21,96	9,98		
DCV04	1,59	4,88	8,24	,50	12,74	,77	
DCV05	27,70	29,41	44,24	16,47	23,92	15,99	14,53
DCV06	2,96	1,32		1,78	3,89	6,36	4,65
DCV07	1,71	2,51	,70	,13	,49		
DCV08	5,40	7,78	3,35	1,75		4,42	
DCV09	32,46		6,40	24,75	3,37		2,48
DCV10	8,52	33,37	33,17	8,00	2,54	8,99	,55
DCV11	37,14	31,98	30,12	23,98	1,49		
DCV13	45,43	9,44	4,76	2,34	9,82	4,28	2,09
DCV15	14,63		5,32	5,43	9,17	5,56	16,72
DCV16	5,51	1,22	7,59	2,27	3,49		5,76
DCV18	2,82	3,63	4,37		7,50	10,26	7,01
DCV19	9,82	6,04	7,59	2,27	3,49	5,76	3,99
DCV20	22,83	12,85	1,87	6,70	7,04	2,27	3,62
DCV22	5,76	55,72	3,41	7,73	2,05	5,88	2,90
DCV23	9,75		7,48	6,86	8,36	8,22	3,61
DCV24	20,44	38,35	11,12	15,25	12,39	6,75	
DCV25	40,59	29,47	18,65	12,11	10,38	4,64	6,53
DCV26	25,65		7,59	11,67	4,87	3,95	
DCV27	23,85		,0	10,92	50,00	,0	2,51

Effects on Innate Immunity of a Therapeutic Dendritic Cell-Based Vaccine for HIV-1 Infection

José Peña,¹ Mario Frías,¹ Laura Castro-Orgaz,¹ Rafael González,¹ Felipe García,² Teresa Gallart,² Jose María Gatell,² Montserrat Plana,² and The Dc2-Manon07 Vaccine Research Group

Abstract

Changes in natural killer (NK) cells according to their phenotype and expression of certain regulatory receptors were analyzed in a double-blind, controlled study of antiretroviral therapy (ART)-untreated HIV-seropositive patients, who had been vaccinated with monocyte-derived dendritic cells pulsed with inactivated HIV-1 autologous virus. This work extends other recently published studies of the same group of HIV-1⁺ vaccinated patients, which demonstrated that the viral load significantly decreases and correlates inversely with an increase in HIV-specific T-cell responses in vaccinated patients, but not in controls who received placebo. Our results indicate that this vaccine raises the level of the NK CD56^{neg} cell subpopulation, while levels of the NK CD56^{dim} and NK CD56^{bright} cells expressing the inhibitory receptor CD85j/ILT-2 fell in vaccinated patients. Taken together, these results suggest that this vaccine might enhance innate immunity by amplifying the inflammatory and cytolytic capacity.

Introduction

THE ADOPTION OF ANTIRETROVIRAL THERAPY (ART) IN THE TREATMENT OF HIV-1-SEROPOSITIVE PATIENTS was an important advance in the control of the progression of this infection (14,24,32). However, the clinical use of ART has several drawbacks, such as its high toxicity when treatment is continued for a prolonged period, and the occasional emergence of viral resistance in patients treated with ART (4,19).

These limitations justify the expenditure of extra effort to generate new modes of treatment for HIV-1⁺ patients (4). For this reason, several groups, including ours, are attempting to develop a vaccine based on the administration of autologous dendritic cells (DCs) pulsed with HIV-1 obtained from the same patient (25,15,36). The potential effects of these vaccines are based on the capacity of DCs to enhance HIV-1-specific immune responses due to their ability to act as “professional” antigen-presenting cells (5,6,31).

In this study, the patients selected were immunized using autologous monocyte-derived dendritic cells (MD-DCs), and their effects were analyzed by measuring viral parameters and certain components of the adaptative and innate immune response at different time points. The results related to

the viral parameters and the adaptative response have recently been published (26), showing a decrease in viral load and an increase in HIV-specific T-cell responses in vaccinated patients, but not in placebo subjects.

This article presents the results of the analyses of the natural killer (NK) cells obtained from the same cohort of patients used in our previous publication. The relevance of this study is based on the demonstration that NK cells play an essential role in the surveillance of viral infections due to their secretory (mainly CD56^{bright}) and cytolytic (mainly CD56^{dim}) functions. These cells are modulated by their regulatory receptors (11), and by their effects on the innate and adaptative responses, resulting from cross-talk between NK and dendritic cells (22,16,42,41) and T cells (48,49). Although it has been shown that NK cell dysfunction contributes to the progression of HIV-1 viral infection (3,18,20,38,41), these cells have never previously been analyzed in trials of HIV-1 vaccines.

We studied the following NK subpopulations in patients treated with three MD-DC-HIV-1 vaccines: NK CD56^{dim}, NK CD56^{bright}, and NK CD56^{neg}. We also studied the receptors CD85j/ILT-2, CD94, NKG2A, and NKG2C in the NK subpopulations, as these are known to be involved in regulating NK-cell functions (27,33,46).

¹Immunology Service, Maimonides Institute for Biomedical Research of Córdoba, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

²Infectious Diseases Department, Hospital Clinic–HIV Development Programme in Catalonia, August Pi I Sunyer Institute of Biomedical Investigation, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Materials and Methods

Patients

We recruited 22 untreated chronic HIV-1 patients who had not received ART for at least 2 y before enrollment, from the Infectious Diseases Unit of the Hospital Clinic of Barcelona. Inclusion criteria were: baseline CD4⁺ T-lymphocyte count >450/mm³ (nadir CD4⁺ T-cell count above 350 cells/mL), and a plasma viral load (PVL) >10,000 copies/mL. The procedure followed in this double-blind study has been described in detail by Garcia *et al.* (25). The objective and other aspects of the study were explained to the patients in detail, and all gave their written informed consent prior to participation. The study was approved by our respective ethical review boards and by the Spanish regulatory authorities (clinical trial NCT0042142).

Study design

MD-DC treatment. The patients were blindly randomized to receive three immunizations, at weeks 0, 2, and 4, of at least 8×10^6 MD-DCs pulsed with heat-inactivated autologous virus (DC-HIV arm, 10^9 copies/dose), or three immunizations with non-pulsed autologous MD-DCs (DC-placebo arm), according to the procedure explained in detail in Garcia *et al.* (25). Blood samples were obtained at weeks -2, -1, 1, 3, 16, 24, and 48 for immunological determinations, including NK cells and their cytotoxic regulatory receptors. The results of weeks -2 and -1 were used as baselines. Inactivated autologous viruses were prepared as previously described (26).

Cell staining and flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by standard Ficoll gradient centrifugation from 150-mL samples of EDTA-treated venous blood taken from 11

chronic HIV-1-infected patients and 11 immunized HIV-1-infected patients. Cells were frozen at -80°C for 1 wk and then cryopreserved in liquid nitrogen at -200°C for transport and processing. Cryopreserved PBMCs were thawed and washed with PBS supplemented with 1% bovine serum albumin and 2 mM EDTA (FACS buffer).

The cell subpopulations NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, and NK CD56^{neg}, defined as CD3⁻CD56^{bright}, CD3⁻CD56^{dim}, and CD3⁻CD16⁺CD56^{neg}, respectively, were measured by flow cytometry in a four-color FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA), using the fluorochrome-labeled antibodies anti-CD3-PerCP (clone SK7), anti-CD16-FITC (clone 3G8), and anti-CD56-APC (clone B159), obtained from Becton Dickinson. A representative illustration of cytometry analysis of NK cell subpopulations is shown in Fig. 1.

In each one of the NK cell subpopulations, the NK cell regulatory receptor CD85j/ILT-2 was analyzed using the fluorochrome-labeled antibody anti-CD85j-PE (clone GHI/75) obtained from Becton Dickinson. In the NK CD56^{bright} and NK CD56^{dim} subpopulations, the regulatory receptors CD94-NKG2A and CD94-NKG2C were analyzed using the fluorochrome-labeled antibodies anti-CD94-FITC (clone HP-3D9) obtained from Becton Dickinson, and anti-NKG2A-PE (clone 131411) and anti-NKG2C-PE (clone 134591), obtained from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN).

The percentage of antibody-positive cells was calculated by comparison with the appropriate isotype control antibodies. Cytometry data were analyzed using the CellQuest software package (Becton Dickinson). All the results of the analysis related to NK-cell subpopulations and their receptors are expressed as percentages of the total lymphocyte population.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS software (version 18.0.0). A *p* value <0.05 was considered to be statistically significant.

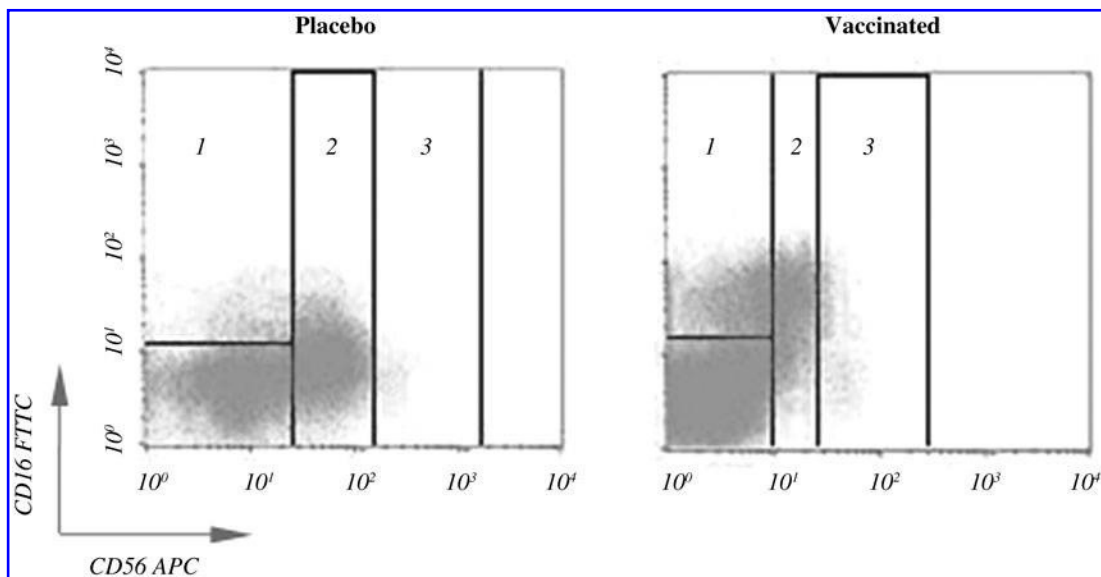


FIG. 1. Distribution of natural killer (NK) cell subsets in a representative cytometry study in placebo and vaccinated patients. Quadrants represent the individual NK cell subpopulations, NK CD56^{neg} (1) in placebo (17.79%) and vaccinated patients (50.04%); NK CD56^{dim} (2) in placebo (77.49%) and vaccinated patients (33.39%); and NK CD56^{bright} (3) in placebo (4.72%) and vaccinated patients (16.55%).

TABLE 1. PERCENT CHANGES IN LEVELS OF NATURAL KILLER (NK) CELL SUBSETS

Time	p Value	NK CD56 ^{dim}		p Value	NK CD56 ^{bright}		p Value	NK CD56 ^{neg}	
		Placebo Median	Immunized Median		Placebo Median	Immunized Median		Placebo Median	Immunized Median
W1	0.83	1.71	-4.10	0.13	-0.08	0.09	0.35	-8.95	4.34
W3	0.14	-7.87	0.08	0.96	-0.07	0.02	0.66	2.44	-0.99
W16	0.56	3.06	-1.83	0.67	0.06	-0.27	0.89	0.54	2.22
W24	0.04	8.49	-18.64	0.87	0.05	-0.84	0.03	-8.75	10.62
W48	0.49	2.84	-13.72	0.82	-1.11	-0.04	0.69	-6.87	10.80

Results

Changes in the percentages of the NK subpopulations NK CD56^{dim}, NK CD56^{bright}, and NK CD56^{neg}, and NK subsets expressing the receptors CD85j/ILT-2, CD94, NKG2A, and NKG2C, in immunized patients are shown in Tables 1 and 2.

The levels of the three types of NK subpopulations analyzed in HIV-1-immunized and placebo patients, as a percentage of the total lymphocyte counts, indicate that there were no significant differences between placebo and immunized patients in the NK CD56^{bright} cell subpopulation. However, a tendency for NK CD56^{dim} cell subpopulations to fall in immunized patients could be observed at week 24 (Table 1). Interestingly, the levels of the NK CD56^{neg} cell subpopulation rose in immunized patients from week 24 until the end of follow-up, although this difference became statistically significant only at the 24th week ($p=0.013$; Fig. 2).

When the changes in the percentages of NK CD56⁺ subpopulations expressing CD94-NKG2A and CD94-NKG2C heterodimers were analyzed, no significant differences were observed (Table 2). However, the percentages of NK subpopulations expressing CD85j/ILT-2 in NK CD56^{dim} and NK CD56^{bright} cells was lower in immunized patients than in placebo individuals.

In the case of the NK CD56^{dim} cell subpopulation, the decrease in the percentage of expression of CD85j/ILT-2 in immunized patients compared with the placebo group was statistically significant at the first ($p=0.04$) and 16th ($p=0.017$) weeks of follow-up (Fig. 3A and Table 1).

With regard to the NK CD56^{bright} cell subpopulation, the decrease in the percentage of expression of CD85j/ILT-2 in immunized patients compared to the placebo group was statistically significant at the first, third, 16th, and 48th weeks of follow-up ($p=0.004$, $p=0.01$, $p=0.009$, and $p=0.05$, respectively; Fig. 3B and Table 2). No changes in the CD56^{neg} NK cell subpopulation expressing CD85j/ILT-2 were observed (Table 2).

Finally, when we compared the values of NK cells expressing the CD85j/ILT2 receptor with plasma viral loads, no significant relationship was found between these parameters during the follow-up period, although a positive correlation was seen in the case of NK CD56^{bright} cells, which was statistically significant at the 48th week ($p=0.015$, $R=0.89$; Fig. 4).

It is noteworthy that the three vaccinated patients who best controlled their viral load as a consequence of the vaccine (data not shown), displayed greater decreases in the expression of CD85j/ILT-2 in NK CD56^{bright} cells than other patients.

TABLE 2. PERCENT CHANGES IN LEVELS OF RECEPTOR EXPRESSION IN NATURAL KILLER (NK) CELL SUBSETS

	Time	NK CD56 ^{dim}			NK CD56 ^{bright}			NK CD56 ^{neg}		
		p Value	Placebo Median	Immunized Median	p Value	Placebo Median	Immunized Median	p Value	Placebo Median	Immunized Median
CD85j/ILT2	W1	0.04	-1.98*	-9.63*	0.04	-0.74*	-6.19*	0.70	-1.84	-4.68
	W3	0.19	-4.57	-8.47	0.01	-1.07*	-6.25*	0.49	-6.03	-7.55
	W16	0.01	1.03*	-11.16*	<0.01	0.50*	-5.45*	0.21	2.27	-12.45
	W24	0.10	-3.28	-13.30	0.06	-1.99	-5.10*	0.96	-9.07	-16.14
	W48	0.11	-6.04	-15.54	0.05	-0.82*	-5.97*	0.91	-10.35	-8.29
CD94-NKG2A	W1	0.04	10.98*	-0.27*	0.47	1.97	1.90			
	W3	0.16	2.73	-0.34	0.46	2.47	-4.06			
	W16	0.43	-4.42	-0.80	0.43	-13.17	-2.12			
	W24	0.34	-3.42	2.03	0.06	-3.73	8.38			
	W48	0.43	-6.40	-1.81	0.87	-5.55	-14.69			
CD94-NKG2C	W1	0.22	3.75	-1.06	0.19	3.68	-4.22			
	W3	1.00	-1.79	1.82	0.65	0.57	0.94			
	W16	0.70	2.53	-2.91	0.73	1.77	3.13			
	W24	0.26	-1.35	3.18	0.74	-2.35	-1.49			
	W48	0.85	1.29	-4.04	0.85	3.69	0.88			

*Differences statistically significant.

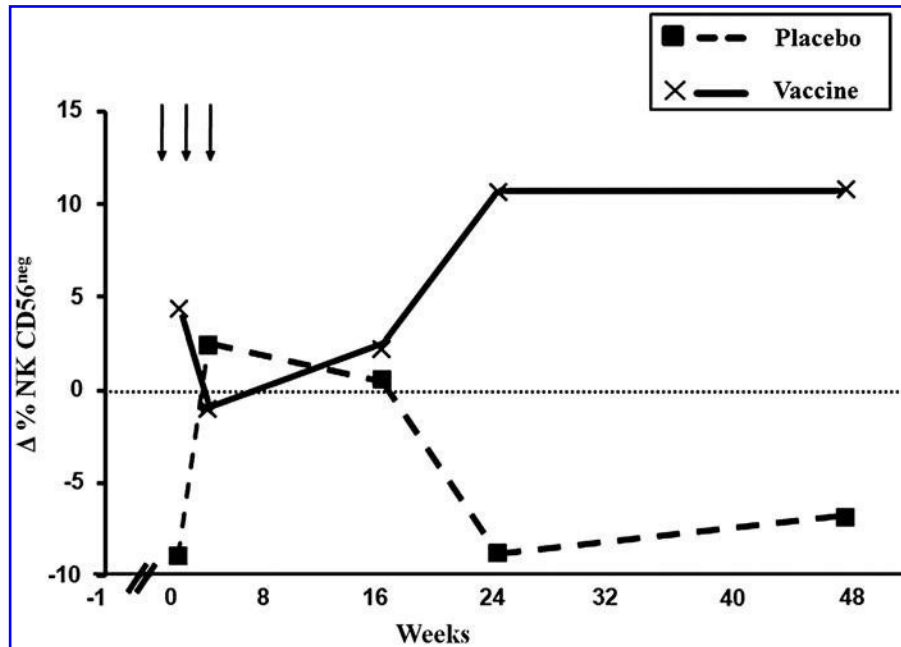


FIG. 2. Distribution of natural killer (NK) CD56^{neg} cells in HIV-1-seropositive vaccinated and placebo patients. A rise in NK CD56^{neg} cells can be observed from the 24th week to the end of the study period in HIV-1-immunized patients. The values were statistically significant at the 24th week of treatment ($p=0.013$).

Discussion

NK cell subpopulations

Recent evidence suggests that abnormalities not only in the number of the NK cells, but also in their secretory and cytolytic capacity, are relevant to the progression of HIV-1 infections (37). Specifically, in HIV-1 infection a larger subpopulation of dysfunctional NK CD56^{neg} cells (39), and an augmented expression of certain inhibitory receptors (38,30), have been observed. Defective cytolytic (29) and ADCC activity (1,12,45), and dysfunction in cytokine production have also been detected (34,38).

A further objective of this work was to determine whether the balance of NK cell subsets in HIV-1-infected patients is altered when they are vaccinated with autologous HIV-1-pulsed dendritic cells. This would tell us if the vaccine has the ability to modify NK cell distributions, as normally expressed in HIV-1-positive individuals (2,28,39), and whether any such changes are actually a consequence of the specific vaccine used.

Our results identified no large differences between the changes in percentages of NK CD56^{bright} and NK CD56^{dim} cell subpopulations in immunized patients and placebo individuals, which suggests that the vaccine probably has no effect on these subpopulations. However, we found that the level of the NK CD56^{neg} cell subpopulation rose in immunized patients from week 24 until the end of the follow-up period (Fig. 2). The rise seen in NK CD56^{neg} cells could be a consequence of the improvement in the adaptive immune response observed in vaccinated patients, as reported in the preliminary article including these same patients (26), although it does not exclude the possibility that it may be due to the effect of the vaccine on T-regulatory lymphocytes (47,35).

We do not know the reason for the rise in the NK CD56^{neg} cell subpopulation observed in the immunized patients, al-

though this may be due to the loss of NK CD56⁺ cells, as originally described by Brunetta *et al.* (13) under other conditions.

The observed increase in CD56^{neg} cells after the administration of the vaccine may be of significance as a mechanism that blocks the progression of HIV-1 infection in vaccinated individuals. Obviously, these important immunological effects of the vaccine could be based on the biological characteristics of these cells, which may act via their cytotoxic capacity, and via the production of cytokines and IFN- γ (9). However, most importantly, they could interfere with the progression of the infection, because CD56^{neg} NK cells are particularly relevant due to their capacity to produce and secrete chemokines such as CCL3, CCL4, and CCL5 (10), which are not only capable of acting as macrophage inflammatory proteins, facilitating chronic inflammation (9), but can also interfere with the entry of HIV-1 into host cells (8), and recruitment of NK cells, T cells, and macrophages to block HIV infection and reinforce the cytotoxic function of these cells.

The ability of these three chemokines to bind to CC-chemokine receptor 5 (CCR5) and to interfere with the receptor that acts as a co-ligand of HIV, has also been frequently described. NK CD56^{neg} cells are thus able to inhibit HIV-1 entry into CD4⁺ and other HIV-1 target cells (17), and subsequently to suppress HIV-1 replication (21,43). However, this potential beneficial effect of the vaccine caused by NK CD56^{neg} cell activity needs further study.

NK cell receptors

As the expression of CD94, NKG2A, and NKG2C, measured in NK CD56^{bright} and CD56^{dim} cell subpopulations displayed no statistically significant differences between placebo and immunized patients, we can conclude that the

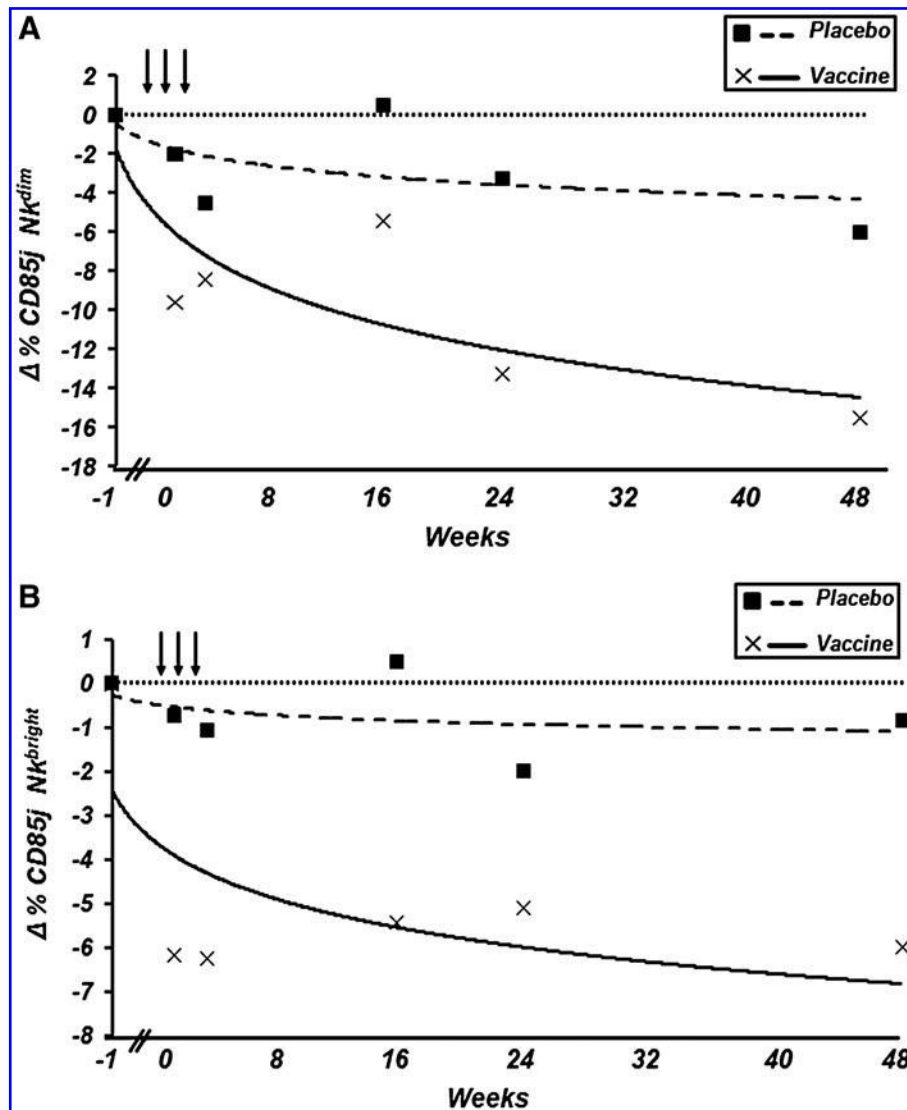


FIG. 3. Trend lines reflecting changes in the percentages of (A) natural killer (NK) CD56^{dim}- and (B) NK CD56^{bright}-expressing CD85j/ILT-2 cells in HIV-1-seropositive vaccinated and placebo individuals. (A) Trend line [equation: $y = -3.912\ln(x) - 1.7675$], which shows that changes in the percentage of NK CD56^{dim} cells expressing CD85j/ILT-2 were reduced in vaccinated patients relative to the placebo group. (B) Trend line [equation: $y = -1.341\ln(x) - 2.4406$], which shows that changes in the percentage of NK CD56^{bright} cells expressing CD85j/ILT-2 were reduced in vaccinated patients relative to the placebo group.

vaccine has no effect on these receptors. However, when the expression of the inhibitory receptor CD85j/ILT-2 was measured, we found significant changes between both groups. Our data show a statistically significant decrease in the expression of CD85j/ILT-2 in both NK cell subpopulations, NK CD56^{bright} and NK CD56^{dim}, in immunized patients, while no changes were observed in the placebo group.

Given that CD85j/ILT-2 is expressed in NK cells and in the majority of myelomonocytic cells (11), and that it binds to different forms of HLA-I, including the regulatory molecule HLA-G (44), our results should be of both biological and clinical significance. Our finding of diminished expression of this receptor, which has an inhibitory functional effect on NK cells (11), and also inhibits the adhesion of

NK cells to their target cells (23), is of importance in that its low expression in NK CD56^{dim} and NK CD56^{bright} cell subsets in immunized patients may facilitate enhanced NK cell function. Specifically, it may be that an increase in the secretory activity of NK CD56^{bright} NK cells and the cytolytic function of NK CD56^{dim} cells are consequences of the vaccine. This may have been due to a rise in the cytotoxicity and secretory capability of NK cells obtained from MD-DC-immunized patients (7). Furthermore, this effect could even be beneficial, as CD85j/ILT-2 has a tolerogenic effect on the production of IL-15 by dendritic cells, and it also inhibits the adhesion of NK cells to target cells (40).

Although an increase in NK cells expressing the CD85j/ILT-2 receptor when ART is interrupted has been reported

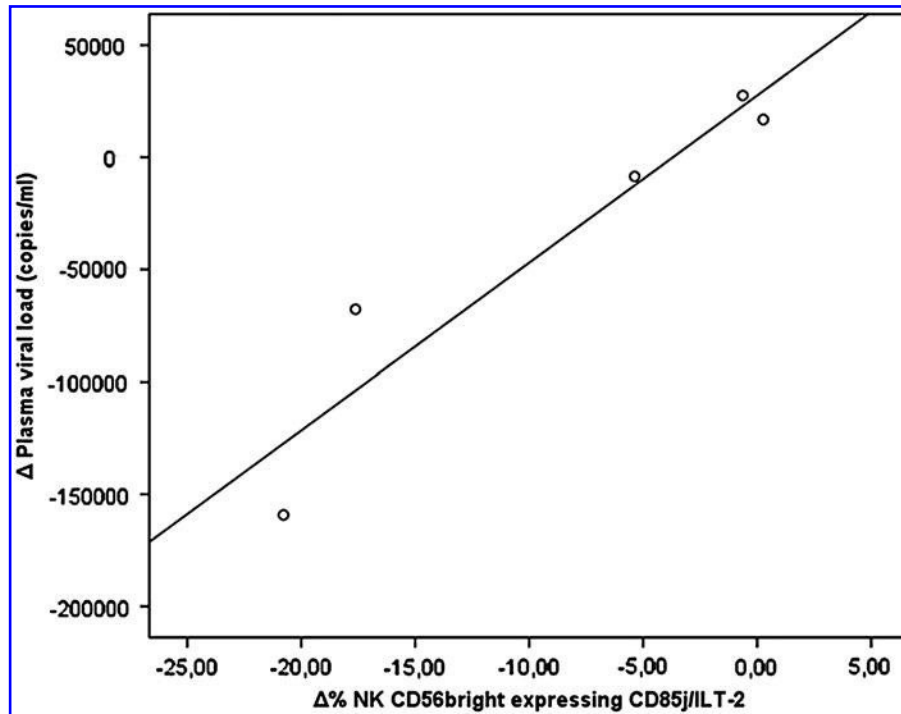


FIG. 4. Relationship between natural killer (NK) CD56^{bright} cells expressing the CD85j/ILT2 receptor and the plasma viral load found in vaccinated patients at the 48th week after the vaccinations were initiated ($p=0.015$, $R=0.89$).

(37), this study demonstrates the opposite effect in immunized patients, since even though our patients were off ART treatment, the level of expression of this receptor was reduced. Further studies are needed to extend our knowledge of the real effects of downregulating CD85j/ILT-2 expression, and its influence on the inhibition of the activity of NK cells and other immunoreactive cells as consequences of employing the DC vaccine in HIV-1-infected individuals.

The positive correlation seen between the levels of NK CD56^{bright}-expressing CD85j/ILT-2 cells and the viral load in the 48th week of follow-up (Fig. 4) could be of biological interest, although we do not know why this relationship did not appear at any other time point when both NK CD56^{dim} and NK CD56^{neg} cell subpopulations expressing the CD85j/ILT-2 receptor were analyzed.

These results regarding NK cells and their receptors could be of clinical relevance, since to our knowledge no data concerning the role of NK cells in previous therapeutic vaccines are available. It may also be of interest in view of the cross-talk described between NK cells and dendritic cells, which were used as part of the vaccine in this work (16,22,42). In any case, further functional studies to clarify the hypotheses suggested here are required to better understand the changes seen in NK cells and their receptors in vaccinated patients.

Acknowledgments

This study was partially supported by grants from the Health Research Fund (FIS-PS09/00424, 01297 and 04272, FIS-PI07/0291 and PI10/02984) of the Spanish Ministry of Health, the Ministry of Science (SAF2005-06984), the Andalusian

Department of Health (PI0293/2007), the Spanish Foundation for Research and Prevention of AIDS (FIPSE 36536/05; FIPSE is a non-profit foundation whose members include the Ministry of Health, Abbott Laboratories, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Merck Sharp & Dohme, and Roche), Red Temática Cooperativa de Grupos de Investigación en Sida del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), and Objectif Recherche Vaccin Sida (ORVACS). Dr. Felipe García was the recipient of a research grant from Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona. Dr. Montserrat Plana is a researcher at the August Pi I Sunyer Institute of Biomedical Investigation, and is supported by the Carlos III Health Institute (ISCIII), and the Department of Health of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

Centers and principal investigators of the Dc2-Manon07 vaccine research group: Carlos III Hospital (Madrid), J.M. Benito; Hivacat-Hospital Clinic (Barcelona), J.M. Gatell; Germans Trias and Pujol Hivacat-Hospital (Badalona), B. Clotet; Gregorio Marañón Hospital (Madrid), M.A. Muñoz; Reina Sofía University Hospital (Córdoba), J. Peña, A. Rivero; and Carlos III Institute of Health (Madrid), J. Alcamí.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ahmad A and Menezes J: Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J* 1996;10:258–266.
- Alter G, and Altfield M: NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med* 2009;265:29–42.

3. Altfeld M, Fadda L, Frleta D, and Bhardwaj N: DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol* 2011;11:176–186.
4. Autran B, Debre P, Walker B, and Katlama C: Therapeutic vaccines against HIV need international partnerships. *Nat Rev Immunol* 2003;3:503–508.
5. Banchereau J and Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245–252.
6. Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al.*: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
7. Bellon T, Kitzig F, Sayos J, and Lopez-Botet M: Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor. *J Immunol* 2002;168:3351–3359.
8. Berger EA: HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 1997;11(Suppl A):S3–S16.
9. Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, and Sandberg JK: CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* 2010;31:401–406.
10. Bluman EM, Bartynski KJ, Avalos BR, and Caligiuri MA: Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996;97:2722–2727.
11. Borrego F, Kabat J, Kim DK, *et al.*: Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2002;38:637–660.
12. Brenner BG, Gryllis C, and Wainberg MA: Role of antibody-dependent cellular cytotoxicity and lymphokine-activated killer cells in AIDS and related diseases. *J Leukoc Biol* 1991;50:628–640.
13. Brunetta E, Hudspeth KL, and Mavilio D: Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *J Leukoc Biol* 2010;88:1119–1130.
14. Carcelain G, Debre P, and Autran B: Reconstitution of CD4⁺ T lymphocytes in HIV-infected individuals following antiretroviral therapy. *Curr Opin Immunol* 2001;13:483–488.
15. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, and Riddler SA: Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:284–292.
16. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, and Caligiuri MA: NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 2004;25:47–52.
17. Choe H, Farzan M, Sun Y, *et al.*: The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135–1148.
18. Chung AW, Navis M, Isitman G, *et al.*: Activation of NK cells by ADCC responses during early HIV infection. *Viral Immunol* 2011;24:171–175.
19. Dorrell L: Therapeutic immunization for the control of HIV-1: where are we now? *Int J STD AIDS* 2006;17:436–441; quiz 442.
20. Fauci AS, Mavilio D, and Kotttilil S: NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol* 2005;5:835–843.
21. Fehniger TA, Herbein G, Yu H, Para MI, Bernstein ZP, O'Brien WA, and Caligiuri MA: Natural killer cells from HIV-1⁺ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol* 1998;161:6433–6438.
22. Fernandez NC, Flament C, Crepineau F, Angevin E, Vivier E, and Zitvogel L: Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk. *Eur Cytokine Netw* 2002;13:17–27.
23. Forte P, Pazmany L, Matter-Reissmann UB, Stussi G, Schneider MK, and Seebach JD: HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells. *J Immunol* 2001;167:6002–6008.
24. Garcia F, Plana M, Vidal C, *et al.*: Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999;13:F79–F86.
25. Garcia F, Lejeune M, Climent N, *et al.*: Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005;191:1680–1685.
26. Garcia F, Climent N, Assoumou L, *et al.*: A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2011;203:473–478.
27. Gonzalez VD, Falconer K, Michaelsson J, Moll M, Reichard O, Alaeus A, and Sandberg JK: Expansion of CD56- NK cells in chronic HCV/HIV-1 co-infection: reversion by antiviral treatment with pegylated IFNalpha and ribavirin. *Clin Immunol* 2008;128:46–56.
28. Hong HS, Eberhard JM, Keudel P, *et al.*: Phenotypically and functionally distinct subsets contribute to the expansion of CD56-/CD16⁺ natural killer cells in HIV infection. *AIDS* 2010;24:1823–1834.
29. Kotttilil S, Chun TW, Moir S, *et al.*: Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *J Infect Dis* 2003;187:1038–1045.
30. Kotttilil S, Shin K, Plana M, *et al.*: Expression of chemokine and inhibitory receptors on natural killer cells: effect of immune activation and HIV viremia. *J Infect Dis* 2004;189:1193–1198.
31. Larsson M, Fonteneau JF, and Bhardwaj N: Cross-presentation of cell-associated antigens by dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003;276:261–275.
32. Letvin NL and Walker BD: Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 2003;9:861–866.
33. Lima M, Almeida J, Montero AG, *et al.*: Clinicobiological, immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/ + dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol* 2004;165:1117–1127.
34. Lin SJ, Roberts RL, Ank BJ, Nguyen QH, Thomas EK, and Stiehm ER: Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on activated natural killer (ANK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in HIV infection. *J Clin Immunol* 1998;18:335–345.
35. Lozano J M, Gonzalez R, Luque J, Frias M, Rivero A, and Pena J: CD8(+)/HLA-G(+) regulatory T cells are expanded in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol* 2009;22:463–465.
36. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, and Andrieu JM: Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 2004;10:1359–1365.
37. Luque J, Lozano JM, Garcia-Jurado G, Soriano-Sarabia N, *et al.*: NK-associated regulatory receptors in a structured HAART interruption of HIV-1-positive individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:1037–1042.
38. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, *et al.*: Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15011–15016.
39. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, *et al.*: Characterization of CD56-/CD16⁺ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2886–2891.

40. Monsivais-Urenda A, Nino-Moreno P, Abud-Mendoza C, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Lopez-Botet M, and Gonzalez-Amaro R: Analysis of expression and function of the inhibitory receptor ILT2 (CD85j/LILRB1/LIR-1) in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* 2007; 29:97–105.
41. Montaner LJ, Crowe SM, Aquaro S, Perno CF, Stevenson M, and Collman RG: Advances in macrophage and dendritic cell biology in HIV-1 infection stress key understudied areas in infection, pathogenesis, and analysis of viral reservoirs. *J Leukoc Biol* 2006;80:961–964.
42. Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, and Moretta L: Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol* 2005;26:668–675.
43. Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, *et al.*: Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication *in vitro*. *J Clin Invest* 1998;102:223–231.
44. Saverino D, Ghiotto F, Merlo A, *et al.*: Specific recognition of the viral protein UL18 by CD85j/LIR-1/ILT2 on CD8+ T cells mediates the non-MHC-restricted lysis of human cytomegalovirus-infected cells. *J Immunol* 2004;172:5629–5637.
45. Sirianni MC, Mezzaroma I, Aiuti F, and Moretta A: Analysis of the cytolytic activity mediated by natural killer cells from acquired immunodeficiency syndrome patients in response to phytohemagglutinin or anti-CD16 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1994;24:1874–1878.
46. Tarazona R, DelaRosa O, Casado JG, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Galiani MD, Pena J, and Solana R: NK-associated receptors on CD8 T cells from treatment-naive HIV-infected individuals: defective expression of CD56. *AIDS* 2002;16: 197–200.
47. Terzieva V: Regulatory T cells and HIV-1 infection. *Viral Immunol* 2008;21:285–291.
48. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, and Lanier LL: Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 2004;173:3716–3724.
49. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, and Lanier LL: NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Mol Immunol* 2005;42:451–454.

Address correspondence to:

Professor José Peña

Department of Immunology

Reina Sofía University Hospital

Avda. Menéndez Pidal s/n

ES-14004 Córdoba, Spain

E-mail: fi1pemaj@uco.es.

Received June 28, 2011; accepted September 10, 2011.

