

CITOLISIS NATURAL EN SUJETOS INFECTADOS POR VIH-1. ALTERACION DE LA ACTIVACION DE LAS CELULAS NATURAL KILLER.

Cecilia Sepúlveda C, Javier Puente P., Caroline Weinstein O.*.*

Unidad de Inmunología Depto. de Medicina Hospital Clínico U. de Chile y Depto. de Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas U. de Chile.

* *Bioquímico.*

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells, effector lymphocytes of natural cytolytic activity, are critical in the defense against infection. In HIV-1 infection, a decrease in NK cytolytic activity has been described; the mechanisms involved, though, are not known. The purpose of this study was to investigate the natural killer cell activity (NKCA) and the in vitro action of immunomodulators in an intent to account for this deficiency. 20 HIV-1-infected subjects (15 males and 5 females, mean age = 36) and 30 seronegative controls were analyzed. NKCA was determined by using K-562 cells radiolabeled with ^{51}Cr (sodium chromate) as target cells, and peripheral mononuclear cells as effector cells, the results being expressed as specific lysis percentage. The effect of the immunomodulators: interleukin-2 (IL-2, 25 U/ml), interferon-alpha (IFN α -, 500 U/ml), and the mixture of the calcium ionophore (A23187, 10.0 μM) plus a phorbol ester (TPA, 250 ng/ml) (Io + TPA) was analyzed in in vitro cultures. Phenotype analysis, CD16/56+, was performed by flow cytometry with fluorescent monoclonal Ab (Becton Dickison).

According to our results, a significant NKCA decrease is observed in the patients compared with controls.

This low activity was not affected by immunomodulators IL-2 and IFN- α , but significant Io+TPA-mediated enhancement was observed. This would indicate that the initial activation mechanisms of these cells would be altered in HIV-1 infection, a situation similar to the one observed in other immunodeficiencies and in severe pathologies such as polytrauma and sepsis. It is important to try to understand these mechanisms in relation to possible immunological therapies.

RESUMEN

Las células Natural Killer (cél NK), linfocitos efectores de actividad citolítica natural, son críticas en la defensa antiinfecciosa. En la infección por VIH-1 se ha descrito una disminución de la actividad citolítica NK; sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar la ACNK y la acción in vitro de inmunomoduladores para intentar explicar esta deficiencia. Se analizaron 20 individuos infectados por VIH-1 (10 asintomáticos y 10 con SIDA) y 30 individuos seronegativos como controles. La ACNK se determinó utilizando cél K-562 radiomarcadas con ^{51}Cr (cromato de sodio) como cél blanco y cél mononucleares periféricas como cél efectoras, expresándose los resultados como % de Lisis específica. En cultivos **in vitro**, se analizó el efecto de inmunomoduladores sobre la ACNK: interleuquina-2 (IL-2, 25 U/mL), interferon-alfa (IFN- α , 500 U/mL) y la acción conjunta de ionóforo de calcio A23187 (Io, 10.0 μM) más un éster de forbol (TPA, 250 ng/mL) (Io+TPA). El análisis fenotípico, CD16+/56+ se efectuó por citometría de flujo con Ac monoclonales fluorescentes (Becton Dickinson).

De acuerdo a nuestros resultados se constata una disminución significativa de la ACNK de los pacientes en relación a los controles ($3,4 \pm 3,2\%$ en asintomáticos y $6,4 \pm 5,5\%$ en SIDA, versus $19,1 \pm 15,6\%$ en controles; test t de Student $p < 0,05$). Esta baja actividad no fue alterada por los inmunomoduladores IL-2 e IFN- α , pero si se observó una significativa estimulación mediada por Io+TPA, lo que indicaría que los mecanismos de activación iniciales de estas cél se encontrarían alterados en la infección por VIH-1, situación similar a la observada en otras inmunodeficiencias y en patologías graves como politraumatismos y sepsis. Es importante intentar aclarar estos mecanismos en relación a posibles terapias inmunológicas que contribuyan al control de esta infección.

En los últimos 15 años, la infección por el virus de inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) y enfermedades asociadas, principalmente el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), han llegado a constituir uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, siendo responsables de gran mortalidad y morbilidad (1). En Chile, el primer caso de SIDA se notificó en 1984. A partir de esa fecha hasta el 30 de Diciembre de 1996, se han notificado 1.777 enfermos de SIDA y 3.143 portadores. Sin embargo, de acuerdo a diversos indicadores, se estima en alrededor de 15.000 las personas infectadas en el país (2).

Uno de los desafíos en la investigación de la infección por VIH-1 es el esclarecimiento de los mecanismos por los que esta infección viral conduce a la profunda y progresiva inmunodeficiencia que caracteriza al SIDA. Está ampliamente documentado en numerosos estudios que en ella se producen una gran variedad de alteraciones inmunológicas, de las cuales es el recuento de linfocitos T CD4+ (*helper*), la de mayor valor pronóstico en el manejo de las personas infectadas (3,4). Las células Natural Killer (cél NK), linfocitos grandes granulares que no son linfocitos T ni B, constituyen una primera línea de defensa inmune, especialmente contra ciertos virus y células tumorales, antes de la activación de mecanismos humorales y celulares específicos (5).

Aunque morfológicamente constituyen una población homogénea, las cél NK maduras son fenotípicamente heterogéneas y expresan una variedad de antígenos (Ag) de superficie. La mayoría de ellas expresan las moléculas CD16 (Receptor Fc gama-III) y CD56 (molécula de adhesión a células nerviosas)(6,7).

Existe controversia sobre si estas células disminuyen cuantitativamente en el curso de la infección por VIH-1, aunque la mayoría de los estudios coinciden en describir una función defectuosa. Los mecanismos íntimos de esta alteración son desconocidos (8,9,10).

En el estudio de estas células es necesario evaluar su número y función *in vitro*. Hay una correlación positiva significativa entre número de células NK circulantes y actividad citolítica natural (ACNK) en individuos normales; sin embargo, esta relación no siempre se encuentra (11). Es posible que las cél NK circulantes varíen en su estado de activación, siendo moduladas por diversos factores, como por ejemplo citoquinas (12,13). De otra parte, en diversas condiciones patológicas se ha observado una disminución de la función citolítica, no necesariamente asociada a cambios en el inmunofenotipo de las cél NK (14,15), por lo que es posible postular una alteración en los mecanismos iniciales de activación de estas células que implican etapas de fosforilación de proteínas y posterior generación de los segundos mensajeros inositol-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) y Ca^{2+} fundamentales para la culminación del proceso citolítico (16,17,18).

En el caso de la infección por VIH-1, no son claros los mecanismos por los cuales ocurre la disminución de esta actividad; por lo tanto, como una manera de aproximarnos a una respuesta que explique esta alteración, en el presente trabajo realizado *in vitro* en individuos adultos infectados por VIH-1, se cuantificaron las cél NK y se determinó su actividad citolítica basal y frente a los inmunomoduladores: interleukina-2 (IL-2), interferon-alfa (IFN- α) y la mezcla ionóforo de calcio-éster de forbol (Io+TPA). Esta última se caracteriza por sobrepasar la etapa inicial de activación celular al imitar parcialmente la

acción de los segundos mensajeros antes señalados.

MATERIAL Y METODO

Sujetos

Se estudiaron 20 sujetos con infección por VIH-1 confirmada por el Instituto de Salud Pública de Chile (Centro Nacional de Referencia para el diagnóstico del VIH), consultantes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Diez de ellos eran asintomáticos y diez tenían SIDA, de acuerdo a los criterios establecidos por el Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta (CDC), EEUU, en 1987 (19).

En todos los sujetos la infección se había adquirido por vía sexual, homosexual en el caso de los 15 hombres y heterosexual en el caso de las 5 mujeres. Su edad promedio fue de 36 años (rango 22-70).

El grupo control estuvo constituido por 30 sujetos seronegativos para el VIH-1, donantes del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la U. de Chile. Su edad promedio fue de 35 años (rango 25-50).

Muestras del estudio

Se tomaron muestras de sangre periférica y se procesaron de inmediato, efectuando los estudios de inmunofenotipificación y de actividad citolítica que se describen más adelante. En el caso de los 20 pacientes, estas determinaciones se efectuaron a todas las muestras. En el caso de los 30 controles seronegativos, a todas las muestras se les determinó ACNK y para las demás determinaciones se agruparon al azar, realizándose inmunofenotipificación en 20, efecto IFN- α en 24, efecto IL-2 en 11 y efecto Io+TPA en 14 de ellos.

Inmunofenotipificación

Se efectuó por citometría de flujo utilizando pares de anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína y

ficoeritrina (Becton Dickinson, Mountain View, California, EEUU). Las cél NK corresponden a las células que son CD3-/CD16+/56+, y los linfocitos T helper a las células CD3+/CD4+.

Brevemente, 100 uL de sangre total se incubaron con los pares de AcMo correspondientes, luego se lisaron los glóbulos rojos y se efectuó la lectura en FACscan Becton Dickinson. Se incluyeron controles de isotipo y de calibración con partículas calibradoras de Becton Dickinson (20).

Los resultados se expresaron en porcentaje y números absolutos por uL.

Ensayo de la actividad citolítica de las células NK (ACNK):

El método utilizado ha sido descrito previamente por nosotros(21,22). En breve, se separan las células mononucleares periféricas en gradiente de Ficoll-Hypaque, posteriormente se lavan las células en amortiguador fosfato-salino pH 7,4 y finalmente se resuspenden en medio completo RPMI-1640+10% de suero fetal de bovino. Las células blanco K-562 (5×10^4 /mL), correspondientes a una eritroleucemia humana, se incuban por 1 h con 100 uCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Comisión Chilena de Energía Nuclear) y se lavan seguidamente con amortiguador fosfato-salino. Por último, se incuban las células mononucleares normales o patológicas (controles basales, o pre-tratadas con los inmunomoduladores, ver más abajo) con las células blanco radiomarcadas en un cultivador celular (37° , 5% CO_2) por 4 h en una relación final efector :blanco (E:B) de 30:1 en placas de microtitulación de fondo curvo. Se estudiaron otras relaciones E:B; sin embargo, la relación 30:1 fue la que mejor reflejó los efectos estimuladores. Finalmente, en una alícuota del sobrenadante, se determina en cada caso, la radioactividad liberada en un contador gamma Packard. Las determinaciones se efectuaron al menos en triplicado, expresándose los resultados como promedios del % de lisis específica + DS(23).

Efecto in vitro de inmunomoduladores

Se utilizaron como inmunomoduladores: interleuquina-2 (IL-2 recombinante humana, Genzyme, EEUU); interferón-alfa (IFN-a, Roferon, Roche); ionóforo de calcio A23187(Io) y éster de forbol, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) de Sigma Chemical Co, EEUU. Las concentraciones y tiempos de preincubación con las células efectoras utilizados se obtuvieron en base a curvas dosis respuestas establecidas y publicadas previamente por nosotros (14,24), y a datos específicos de concentraciones utilizadas descritos en la literatura (25-27). En cada caso, los inmunomoduladores se pre-incubaron de la siguiente manera con las células efectoras, previo al ensayo de citólisis: IL-2 25 U/mL, 30 min (24,25); IFN-a 500 U/mL, 2 h (24); Io 10.0 uM + TPA 250 ng/mL, 30 min (14,25,26,27). Posteriormente se lavan las células en medio RPMI 1640 y se procede al ensayo de citólisis ya descrito.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectuó por test t pareado de Student, considerando significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados de la inmunofenotipificación por citometría de flujo se presentan en la **Tabla 1**. Se puede apreciar una disminución significativa de los linfocitos T helper en los pacientes asintomáticos y con SIDA, tanto en porcentaje como en números absolutos, en comparación con los controles ($19,5\% \pm 8,7$ y $269,8 \pm 174,3$ cél/uL; $4,6\% \pm 4,1$ y $60,1 \pm 134,3$ cél/uL; $42,6\% \pm 6,9$ y $948,5 \pm 393,3$ cél/uL, respectivamente); test t de Student $p < 0,05$. En los casos asintomáticos esta disminución es menos marcada; siendo tanto el porcentaje como el número absoluto de células significativamente más altos en los asintomáticos que en los casos de SIDA; test t de Student $p < 0,05$. En cuanto a las células NK, no hubo diferencias significativas en el porcentaje obtenido en ambos grupos de pacientes, en relación al grupo control ($10,4\% \pm 9,4$; $14,3\% \pm 9,7$ y $14,8\% \pm 6,4$;

respectivamente). Ambos grupos de pacientes tenían; sin embargo recuentos absolutos de células NK más bajos que los de los controles, aunque sólo en los pacientes con SIDA esta disminución alcanzó una significación estadística ($137,8 \pm 87,6$ cél/uL; $91,1 \pm 98,3$ cél/uL y $331,5 \pm 266,5$ cél/uL, respectivamente); test t de Student $p < 0,05$.

En lo que se refiere a la actividad citolítica de las células NK, los resultados se muestran en las **Figuras 1 y 2**. En los individuos normales la ACNK basal promedio es de un $19,1\% \pm 15,6$; obteniéndose un aumento con los tres inmunomoduladores, siendo estadísticamente significativos con IFN-a y Io+TPA (test t de Student $p < 0,05$). En cambio, en los grupos de pacientes estudiados, ya sea asintomáticos o con SIDA, se observa una ACNK muy disminuida ($3,4 \pm 3,2$ y $6,4 \pm 5,5$; respectivamente) y además una respuesta nula o escasa frente a los inmunomoduladores IL-2 e IFN-a. Sin embargo, se observa una importante recuperación de la ACNK en respuesta a Io+TPA en ambos grupos de pacientes, estimulación que fue estadísticamente significativa en relación a los controles basales ($27,6 \pm 33,7$ y $31,4 \pm 15,2$; respectivamente); test t de Student $p < 0,05$.

Tanto la ACNK basal como la observada con Io+TPA fueron independientes del inmunofenotipo, en los pacientes y en los controles.

DISCUSION

Las células NK son células que lisan células tumorales, células alogeneicas, y células infectadas por virus. De gran importancia en la vigilancia inmunológica normal, su rol en la defensa anti-VIH-1 puede ser significativo, a través de la ACNK y a través de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) (10,28).

Hay evidencias que líneas de células CD4+ infectadas con VIH-1 son susceptibles a la citólisis mediada por células NK y también se ha demostrado que células NK lisan células infectadas con patógenos y eliminan patógenos que pueden activar la infectividad del VIH-1 (29).

Tabla 1.
INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRIA DE FLUJO EN CONTROLES NORMALES Y EN SUJETOS INFECTADOS POR VIH-1 ASINTOMATICOS Y CON SIDA

	LINFOCITOS CD4+		CELULAS CD16+/56+	
	%	cél/uL	%	cél/uL
controles normales	42,6±6,9	948,5±393,3	14,8±6,4	331,5±266,5
asintomáticos	19,5±8,7*	269,8±174,3*	10,4±9,4	137,8±87,6
SIDA	4,6±4,1*	60,1±134,3*	14,3±9,7	91,1±98,3*

Los resultados se expresan como promedios + DS

* $p < 0,05$ por test *t* de Student

Por otra parte, la ACNK *in vitro* contra células tumorales, disminuye con la progresión de la infección por VIH-1 hacia el SIDA (30), habiéndose propuesto este ensayo como un marcador pronóstico (31).

Los resultados de nuestros estudios inmunofenotípicos en individuos infectados por VIH-1 asintomáticos y con SIDA muestran que el porcentaje de estas células no difiere mayormente del de la población normal en las diferentes etapas de la infección por VIH-1; sin embargo, el número de estas células está significativamente disminuido en los pacientes con SIDA. En este sentido, nuestros resultados son concordantes con lo reportado por algunos autores (8,9) y difieren de otros (28,29,30). Es posible que esto se deba, en parte, a que se han usado diferentes marcadores y metodologías en la identificación fenotípica de estas células. En este sentido, de gran interés son los resultados obtenidos por citometría de flujo utilizando tres AcMo marcados con fluorocromos, que muestran una depleción selectiva precoz de un subgrupo de células NK que son CD16+/CD56+/CD8+, en individuos infectados por VIH-1 con recuentos de células CD4+ inferiores a 500 por uL, los autores sugieren que la ACNK disminuida en los sujetos infectados por VIH-1 es multifactorial y que uno de los factores involucrados puede ser una alteración cuantitativa

del compartimiento de células NK (31).

En el presente trabajo es posible también apreciar una significativa disminución de la ACNK tanto en pacientes con infección por VIH-1 asintomáticos como en aquellos con diagnóstico de SIDA, en relación a los controles normales. Además, no se observaron cambios en la ACNK de ambos grupos de pacientes en respuesta a la acción de IL-2 e IFN- α , dos importantes estimuladores de esta actividad citolítica *in vivo* e *in vitro*, lo que implicaría una alteración en la activación de las células NK. La acción de la IL-2 sobre las células NK ha sido una de las más estudiadas y se puede explicar por la expresión constitutiva de las subunidades del receptor para IL-2 beta y gama, que dan cuenta del efecto directo de esta citoquina (32,33). Para la generación de células killer activadas con linfoquinas (cél LAK) se requiere la inducción de la subunidad alfa, formándose así el receptor complejo de alta afinidad. El hecho de no encontrar respuesta a IL-2 en las muestras patológicas refuerza una posible alteración en la activación de estas células; sin embargo, en una acción *in vitro* a largo plazo y a concentraciones un orden de magnitud mayores a las utilizadas en este trabajo es posible generar células LAK en muestras de muy baja ACNK como es el caso de pacientes neoplásicos (34), situación que también podría esperarse en el caso del SIDA y que representa la base de la utilización

ACTIVIDAD CITOLITICA NK DE VOLUNTARIOS NORMALES. EFECTO DE INMUNOMODULADORES.

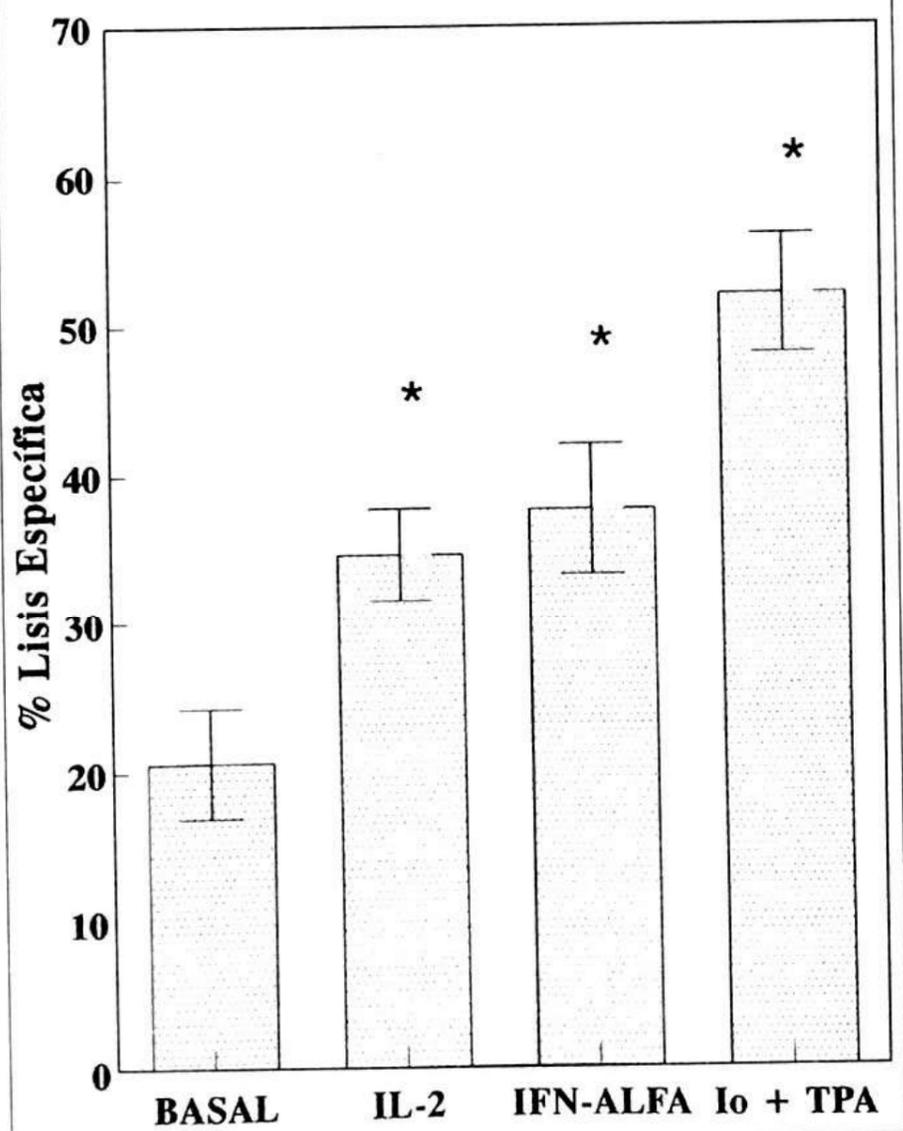


Figura 1. Efecto de los inmunomoduladores IL-2 50 U/mL, IFN- α 500 U/mL y la mezcla Io+TPA (1.0 μ M, 250 ng/mL respectivamente) sobre la ACNK de células mononucleares periféricas de controles normales (n=30). Relación E:B = 30:1. Resultados expresados como promedios + 1 DE del % de Lisis Específica.

*p < 0.05 en relación a basal.

de la IL-2 como tratamiento en esta patología (35).

La ACNK es un proceso complejo, aún poco conocido, que comprende varias fases como reconocimiento y unión a la célula blanco, activación de la célula citolítica, descarga del contenido de sus gránulos, y finalmente lisis de la célula blanco (5).

En la infección por VIH-1 la unión de la cél NK a la célula blanco sería normal, pero la actividad citolítica está disminuida a pesar de la presencia de una maquinaria lítica normal en esta célula, como lo demuestra su capacidad de mediar ADCC normal-

ACNK DE INDIVIDUOS CON INFECCION POR VIH-1 ASINTOMATICOS Y SIDA

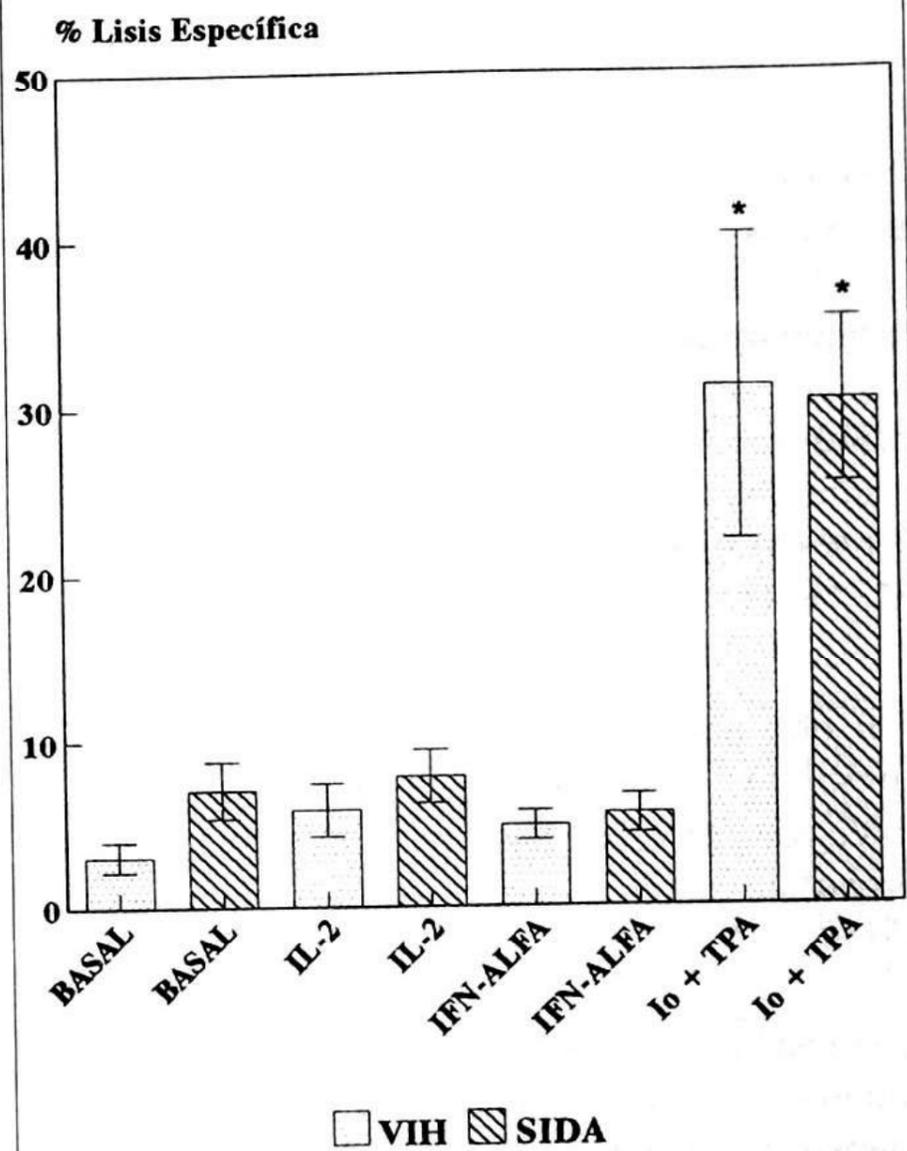


Figura 2. Efecto de inmunomoduladores IL-2 50 U/mL, IFN- α 500 U/mL y la mezcla Io+TPA (1.0 μ M, 250 ng/mL respectivamente) sobre la ACNK de individuos infectados por VIH-1 asintomáticos (n = 10) y con diagnóstico de SIDA (n = 10). Relación E:B = 30:1. Resultados expresados como promedios + 1 DE del % de Lisis Específica.

*p < 0.05 en relación a basal respectivo.

mente in vitro (10).

Una situación similar a la descrita se observa en otras diversas situaciones patológicas como shock séptico(21,22), politraumatismos y quemaduras graves (24,25), en las que se aprecia una notable alteración funcional, de cél NK o de linfocitos T, sin cambios significativos en el inmunofenotipo, postulándose para estos casos una deficiencia en el proceso de activación celular y más específicamente, en la generación de segundos mensajeros (14,15). En estas circunstancias, la utilización de la mezcla Io+TPA cobra especial importancia, pues este agente

tiene la propiedad de sobrepasar la etapa de activación, que implica la generación de los segundos mensajeros inositol-tris-fosfato, Ca^{2+} y diacilglicerol, éste último activador de la proteína quinasa C (PK-C), una de las enzimas fundamentales en el desarrollo de la activación de los linfocitos (16,17).

A través del ionóforo de calcio ingresan Ca^{2+} al interior de la célula y el éster de forbol TPA, el cual puede activar la PK-C y a su vez inducir la liberación del contenido de los gránulos de las células NK (36,37). Como es posible apreciar en las Fig 1 y 2, sólo a través de esta mezcla Io+TPA fue posible estimular la ACNK de los grupos de pacientes estudiados. Esto nos permite postular que en la infección por VIH-1 ocurriría una alteración en los mecanismos iniciales de activación de las células NK, situación que está actualmente en estudio en nuestro laboratorio.

Nuestros resultados tienden a descartar un rol relevante al déficit de IL-2 que es posible encontrar en la infección por VIH-1, lo cual ha sido sugerido por otros autores como explicación del defecto de la ACNK (38). La alteración funcional de las células NK en la infección por VIH-1 podría deberse a un efecto directo supresivo del virus, ya que la exposición de estas células a péptidos virales suprime su función (39). También es posible que el déficit de IL-12 que se ha reportado en sujetos infectados por VIH-1 juegue un rol importante, ya que se ha descrito que esta citoquina es capaz de aumentar la ACNK in vitro (40).

El conocimiento a nivel molecular de los mecanismos involucrados en la disfunción de las células NK en la infección por VIH-1, podría dar pautas para el diseño de nuevas estrategias farmacológicas para tratar esta alteración y así contribuir a mantener la infección bajo control.

REFERENCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Global Programme on AIDS. The HIV/AIDS pandemic: overview. 1996.
2. COMISION NACIONAL DEL SIDA. Chile. Ministerio de Salud: Informe de la Situación Epidemiológica de la Epidemia VIH/SIDA en Chile al 31 de Diciembre de 1996.
3. Fahey J, Taylor J, Detels R, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type-1. *N Eng J Med* 1990; 322: 166-72.
4. Stein DS, Korvick JA, Vermund SH. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis* 1992; 165: 352-63.
5. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376.
6. Ritz J, Schmidt RE, Michon J, et al. Characterization of functional surface structures on human killer cells. *Adv Immunol* 1988; 42:181-211.
7. Lanier LL, Le AM, Civin CI, et al. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4480-86.
8. Creemers PC, Stark DF, Boyko WJ. Evaluation of natural killer cell activity in patients with persistent generalized lymphadenopathy and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 36:141-50.
9. Mansour I, Doinel C, Rouger P. CD16+ NK cells decrease in all stages of HIV infection through a selective depletion of the CD16+ CD8+ CD3-subset. *AIDS Res Human Retrovir* 1990; 6:1451-1547.
10. Katz JD, Mitsuyasu R, Gottlieb MS, et al. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex.

- II. Normal antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by effector cells defective in natural killer (NK) cytotoxicity. *J Immunol* 1987; 137:55-60.
11. Whiteside TL. Natural Killer Activity in the Diagnosis of Immune Dysfunction. *Clin Immunol* 1991; 11: 27-31.
 12. London L, Perussia B, Trinchieri G. Response of resting human peripheral blood natural killer cells: IL-2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells but only a minor subset of low density cells. *J Immunol* 1986; 137: 3845-54.
 13. Naume B, Espevik T. Immunoregulatory effects of cytokines on natural killer cells. *Scand J Immunol* 1994; 40:128-134.
 14. Puente J, Carvajal T, Parra S et al. Enhancement of natural killer cell activity in septic shock patients by a mixture of the calcium ionophore A23187 and the phorbol ester TPA: in vitro studies. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1994; 32:19-23.
 15. Faist E, Schinkel C, Zimmer S et al. Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling. *J Trauma* 1993; 34:846-54.
 16. Jondal M, Maj-Britt A. A direct induction of lymphocytes killing by Ca ionophore and phorbol ester treatment cell. *Cell Immunol* 1987; 105:23-32.
 17. Windebank K, Abraham R, Powis G et al. Signal transduction during human natural killer cell activation: inositol phosphate generation and regulation by cyclic AMP. *J Immunol* 1988; 141:3951-57.
 18. Vély F, Vivier E. Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK. *Médecine/sciences* 1996; 44:458-64.
 19. Centers for Disease Control: Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR* 1987; 36:1-15.
 20. Landay A, Muirhead K. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;52: 48-60.
 21. Puente J, Miranda D, Gaggero et al. Defectos inmunológicos en el shock séptico. Deficiencia de células natural killer y de linfocitos T. *Rev Méd Chile* 1991; 119:142-5.
 22. Maturana P, Puente J, Miranda D et al. Natural killer cell activity in patients with septic shock. *J Crit Care* 1991; 6:42-45.
 23. Bender BS, Chrest FJ, Adler WH. Phenotypic expression of natural killer cells associated membrane antigens and cytolytic function of peripheral blood cells from different aged humans. *J Clin Lab Immunol* 1986;21:31-6.
 24. Puente J, Carvajal T, Parra S et al. In vitro studies of natural killer cell activity in septic shock patients. Response to a challenge with alpha-interferon and interleukin-2. *Int J Clin Phar Ther Toxicol* 1993;31:271-75.
 25. Bender BS, Winchurch RA, Thupari JN et al. Depressed natural killer cell function in thermally injured adults: succesful in vivo and in vitro immunomodulation and the role of endotoxin. *Clin Exp Immunol* 1988;71:120-5.
 26. Chatila T, Wong R, Young M et al. An immunodeficiency characterized by defective signal transduction in T lymphocytes. *N Eng J Med* 1989;320:696-702.
 27. Gibboney JJ, Shenoy A, Jin X et al. Signal transduction in activated natural killer cells and

-
- natural killer cells inactivated with sensitive targets. *Nat Immun* 1992;11:57-58.
28. Ljunggren K, Karlson A, Fenjö EM et al. Natural and antibody- dependant cytotoxicity in different clinical stages of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Exp Immunol* 1989; 75:184-189.
29. Sirianni MC, Tagliaferri F, Aiuti F. Pathogenesis of the natural killer cell deficiency in AIDS. *Immunol Today* 1990;11:
30. Margolick JB, Donnenberg AD, Muñoz A et al. Changes in T and non-T lymphocyte subsets following seroconversion to HIV-1: stable CD3+ and declining CD3 populations suggest regulatory responses linked to loss of CD4 lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6: 153.
31. Lucia B, Jennings Ch, Cauda R. Evidence of a selective depletion of a CD16+CD56+CD8+ Natural Killer Subset during HIV infection. *Cytometry* 1995;22:10-15.
32. Voss S, Sondel P, Robb RJ. Characterization of the interleukin-2 receptors (IL2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL2R gamma chain with the IL2R beta chain in functional intermediate-affinity IL2R. *J Exp Med* 1992;176:531-41.
33. Siegel JP, Sharon M, Smith P et al. The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK and proliferative activities. *Science* 1987;238:75-78.
34. Whiteside TL, Herberman R. Characteristics of natural killer cells and lymphokine-activated killer cells. Their role in the biology and treatment of human cancer. *Immunol Allergy Clin* 1990;10:663-702.
35. Bernstein ZP, Porter MM, Gould M, et al. Prolonged administration of low-dose interleukin-2 in human immunodeficiency virus-associated malignancy results in selective expansion of innate immune effectors without significant clinical toxicity. *Blood* 1995; 86:3287-94.
36. Atkinson EA, Gerrard JM, Hildes GE et al. Studies of the mechanism of natural killer (NK) degranulation and cytotoxicity. *J Leukocyte Biol* 1990;47:39-46.
37. Bonnema JD, Karnitz LM, Schoon RA et al. Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1994;180:1427-35.
38. Reddy MM, Chinoy P, Grieco MH. Differential effects of interferon-alpha and interleukin-2 on natural killer cell activity in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J Biol Response Mod* 1984;3:379-81.
39. Cauda R, Tumbarello M, Ortona L et al. Inhibition of normal human natural killer cell activity by human immunodeficiency virus synthetic transmembrane peptides. *Cell Immunol* 1988; 115: 57-9.
40. Chehimi J, Starr SE, Frank I et al. Natural Killer cell stimulatory factor increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and human immunodeficiency virus-infected patients. *J Exp Med* 1992; 175:789-96.
-
- Agradecimientos a las Srtas. Tecnólogos Médicos Paola Hernández P. y Soledad Ripamonti Z., por su asistencia técnica.*