
Déficit en señales de activación y coestimulación en linfocitos T CD4⁺ de pacientes infectados con el virus de la hepatitis C

Luisa Barboza¹, María Luisa Martens¹, Siham Salmen¹, Darrell L Peterson², Henry Montes² y Lisbeth Berrueta¹.

¹Instituto de Inmunología Clínica, ²CAMIULA, Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela - Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA.

Palabras clave: Virus de la hepatitis C, activación de linfocitos T, CD28, TGF- β , CD69, CD40L, CD25.

Resumen. La infección crónica por el virus de la Hepatitis C ocurre en 80% de los casos y conduce eventualmente a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Se ha descrito que una respuesta inmunitaria adaptativa deficiente pudiera contribuir a la persistencia viral. Dicha alteración pudiera ser atribuida a defectos en señales de co-estimulación durante la activación de los linfocitos CD4⁺. En este estudio exploramos la respuesta de esta población linfoide en presencia del antígeno del core del VHC asociado con la co-estimulación vía CD28, midiendo la expresión de moléculas de superficie: CD69, CD25, CD40L y de citocinas intracitoplasmáticas tales como: IFN- γ , TGF- β e IL-10. El análisis fue realizado en individuos infectados crónicos, familiares contactos y controles sanos. El antígeno del core del VHC indujo la expresión de CD40L en los linfocitos CD4⁺ de familiares contactos, a diferencia de lo observado en paciente infectados crónicos e individuos controles sanos. Al asociar la estimulación vía CD28, los pacientes infectados con VHC incrementaron la expresión de CD69 e IFN- γ , sugiriendo un déficit en la señalización a través de esta vía de coestimulación. Adicionalmente, se observó un incremento en la producción de TGF- β en los pacientes infectados en respuesta al antígeno, el cual fue corregido al coestimular vía CD28. Nuestros resultados pueden ayudar a comprender los mecanismos de tolerancia generados durante la infección crónica por el VHC y ofrecer una aproximación que pudiera contribuir al diseño de estrategias terapéuticas para el control de la infección crónica y al desarrollo de inmunidad protectora contra el virus.

Impaired activation and costimulation of T CD4⁺ lymphocytes during chronic Hepatitis C infection.

Invest Clin 2008; 49(3): 353 - 367

Key words: Hepatitis C virus, T cell activation, CD28, TGF- β , CD69, CD40L, CD25.

Abstract. Hepatitis C chronic infection occurs in 80% of the cases and eventually leads to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. A deficient adaptive immune response has been described during chronic infection which contributes to viral persistence. This altered T cell response could be associated to deficient costimulation signals during priming of T cells. We have conducted an *in vitro* study to explore the activation phenomenon of CD4⁺ T cells focusing on costimulation via the CD28 receptor, associated to stimulation with purified Hepatitis C (HCV) core antigen. Our study involved the induction of CD69, CD25 and CD40L activation receptors, along with detection of intracellular cytokines such as IFN- γ , TGF- β and IL-10. Analysis was performed in chronically HCV infected patients, intrafamilial members of HCV-infected patients and healthy individuals. HCV core antigen induced CD40L expression in CD4⁺ cells from intrafamilial members, in contrast to chronically infected patients and control individuals. Association of CD28 crosslinking increased CD69 and IFN- γ expression in chronically infected patients, suggesting a detriment in this signaling pathway. Additionally, an increased TGF- β expression was observed in CD4⁺ cells from HCV-infected patients, which was corrected by addition of CD28 crosslinking. Our results may contribute to understand the underlying mechanism of T cell tolerance against HCV during chronic infection, and to provide new targets for the designing of therapeutic strategies to control the infection and to offer protective immunity against the virus.

Recibido: 31-07-2007. Aceptado: 27-02-2008.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Hepatitis C (VHC) causante de la hepatitis infecciosa originalmente identificada como no-A no-B (1), afecta alrededor de 170 millones de personas en el mundo (2). En Venezuela los datos epidemiológicos reportan que la prevalencia de la infección por el VHC es de 1,5% (3). Sólo el 20% de los casos se resuelve espontáneamente y en el 80% la infección aguda evoluciona hacia la hepatitis crónica (4), que progresa lentamente en dos o tres décadas hacia la fibrosis hepática y cirrosis y en un 4% se desarrolla carcinoma hepatocelular (5).

Existe una variabilidad notoria en la respuesta inmunitaria contra el VHC. Durante la infección por este agente viral se produce una respuesta proliferativa vigorosa y multiespecífica de las células T CD4⁺ que es mantenida indefinidamente luego de la recuperación de la infección, mientras que es débil y limitada en los pacientes que evolucionan hacia la hepatitis crónica (6), siendo el balance entre la eliminación del virus y el daño hepatocelular el resultado de la actividad de las células CD4⁺ y CD8⁺ (7). El patrón de citocinas dominante durante la infección y su significado fisiopatológico no está del todo esclarecido. Se ha reporta-

do que la presencia de citocinas tipo Th1 puede incrementar la inflamación y necrosis tisular, en contraste con una mayor actividad anti-viral (8); mientras que el perfil de tipo Th2 se relaciona con persistencia viral (1). En todo caso, la respuesta celular asociada a la resolución de la infección se caracteriza por la producción de IFN- γ por linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y linfocitos T colaboradores CD4⁺ (9).

Por otro lado, existen evidencias que demuestran la existencia de una respuesta inmunitaria celular contra antígenos del virus de la hepatitis C en individuos seronegativos para VHC, evidenciado a través de la producción de IFN- γ (10-13). Este fenómeno se ha descrito entre personal de laboratorio con riesgo ocupacional (12), familiares de pacientes infectados y contactos sexuales de pacientes infectados que no presentan ningún otro factor de riesgo de transmisión (11). Si el VHC puede ser completamente erradicado o no, es aún debatible pero se cree que este resultado puede ser logrado por al menos un grupo de individuos (14).

Dentro de las posibles causas que expliquen la persistencia viral se encuentran defectos en la presentación antigénica, que pudiera conducir a activación inapropiada de los linfocitos T CD4⁺ con repercusiones en la diferenciación y funciones efectoras de este importante grupo celular. Estudios previos han demostrado que la expresión *in vitro* de proteínas virales en células dendríticas (core y envoltura E1), conduce a activación incompleta de poblaciones de linfocitos T CD4⁺ (15). Por otro lado, reportes recientes revelan que existe un patrón defectuoso en la activación y diferenciación de linfocitos T, caracterizado por la expresión incrementada de CD25 y producción reducida de IL-2 (16, 17), asociado a un incremento de células T con fenotipo regulador, CD4⁺CD25⁺ (Treg), productoras de IL-10 y TGF- β (18).

La activación efectiva de los linfocitos requiere de señales coestimuladoras que contribuyan con la señal generada a través del receptor antigénico. Entre las moléculas coestimuladoras primordiales para la activación de los linfocitos T se encuentra CD28 (19). La unión de CD28 con sus ligandos expresados en las células presentadoras de antígeno (CD80/B7.1, CD86/B7.2/B70, B7.3) regula el destino de la respuesta de las células T, el patrón de producción de citocinas y la expresión de receptores para citocinas, incluyendo la cadena α del receptor de la IL-2 CD25 (20). Adicionalmente se ha evidenciado que CD28 interviene en el desarrollo de células T reguladoras inducidas en la periferia, controlando la expresión de Foxp3 y su función inhibitoria (21).

En este trabajo se abordan aspectos relacionados con la activación de linfocitos T CD4⁺ con especial énfasis en el papel de la coestimulación vía CD28, con la finalidad de profundizar en elementos clave que participan en el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa específica contra el VHC, y que pudieran ser responsables de la respuesta inmunitaria celular deficiente observada durante la infección crónica. El diseño experimental está dirigido a analizar la expresión e inducción de las moléculas CD25, CD69 y CD40L y la producción de citocinas intracitoplasmáticas en linfocitos T CD4⁺ de pacientes infectados con VHC, personas contactos familiares de estos pacientes e individuos sanos, en respuesta al antígeno del core del VHC, asociado al entrecruzamiento de la molécula CD28. Los resultados obtenidos pueden contribuir a comprender en parte el estado de tolerancia específica observado en estos pacientes incapaces de eliminar el virus y de evocar una respuesta inmunitaria protectora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios y reactivos

El medio de cultivo utilizado RPMI 1640 y los suplementos (medio completo): 2 mM L-glutamina, 10% suero bovino fetal (SBF), 100 U/mL penicilina, y 100 mg/mL estreptomycin, fueron obtenidos de GIBCO Life Technologies Inc, (Grand Island, NY, USA). Lymphoprep fue adquirido de Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Phytohemaglutinina (PHA), estreptavidina y estreptavidina-PE, fueron adquiridos de Calbiochem (San Diego, CA). Los anticuerpos ratón anti-CD4-humano-FITC (clona RPA-T4), ratón anti-CD40L-humano-PE (clona TRAP1), ratón anti-CD25-humano-PE (clona M-A251), ratón anti-IFN- γ -humano-PE (clona 4SB3), rata anti-IL-10-humano-PE (clona JES3-9D7) fueron adquiridos de BD Biosciences PharmingenTM. El anticuerpo biotilado anti-TGF- β -humano fue adquirido de R&D Systems. El anticuerpo anti-CD28 (clona 9.3) fue proporcionado gentilmente por el Dr. Carl June (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA). Los controles de isotipo IgG1 de ratón conjugados con FITC, PE y PerCp, fueron adquiridos de Becton & Dickinson, Co, (San Jose CA, USA). El antígeno del core del VHC, genotipo 1a, sintetizado en *Escherichia coli*, fue donado gentilmente por el Dr. Darrell Peterson del Departamento de Bioquímica de Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA.

Grupos en estudio

Pacientes: Se incluyeron en el estudio 11 individuos con hepatitis C crónica diagnosticados y valorados clínicamente en la consulta de gastroenterología de la Clínica Ambulatoria de Medicina Integral de la ULA (CAMIULA), que cumplieron con los siguientes requisitos de admisión para el estudio: serología positiva para el VHC detectada mediante ELISA de IV generación y se-

rología negativa para el VIH, virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein Barr (VEB). El ARN del VHC fue detectado mediante PCR anidado ("Nested RT-PCR") como se explica más adelante.

Familiares: Cada paciente acudió acompañado de un contacto quien convivía con el paciente sin síntomas hepáticos evidentes.

Controles: se incluyeron 8 individuos sanos no relacionados con los pacientes. Los controles y familiares admitidos fueron negativos para el VHC, VIH, VHB, CMV y VEB. Los pacientes no se encontraban bajo tratamiento anti-viral para el momento del estudio. Todas las personas incluidas en este trabajo fueron notificadas del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito siguiendo las normas del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes.

Pruebas serológicas

El diagnóstico de la infección por el VHC se realizó mediante la detección de IgG contra los antígenos del core, NS3, NS4 y NS5 mediante el ensayo inmunoenzimático (EIA) de IV generación (InnotestTM, Innogenetics NV). La detección de la infección por VIH se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático de IV generación. La detección de anticuerpos anti-VHB se realizó mediante ELISA (Organon Teknike, Boxtel, NL, USA) y las infecciones recientes por CMV y EBV se descartaron mediante inmunoensayos para detectar IgM específica para cada virus (Organon Teknike, Boxtel, NL, USA).

Amplificación del genoma viral mediante "Nested-RT-PCR"

El genoma del VHC fue amplificado a partir de muestras de suero. La extracción del ARN viral se realizó utilizando proteínaasa K, fenol/cloroformo y precipitación con etanol (22). Para la síntesis de la cadena de

ADN complementario (ADNc) se siguió el protocolo de la casa comercial empleando la transcriptasa reversa de M-MLV (SuperScript™ III, Invitrogen), utilizando como iniciador antisentido la secuencia 5' ATA CTC GAG GTC CAC GGT CTA CGA GAC CT 3'. La amplificación se realizó en dos rondas de PCR empleando los iniciadores: 939 (sentido, 5' CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT 3') y 209 (anti-sentido, 5' ATA CTC GAG GTC CAC GGT CTA CGA GAC CT 3') para la primera ronda de PCR y los iniciadores 940 (sentido, 5' TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG 3') y 211 (anti-sentido, 5' CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT3') para la segunda ronda de PCR (23). Las dos rondas de amplificación se realizaron en un termociclador programable (PTC-0150 Mini Cycler™, MJ Research) y consistieron en 10 min de denaturación a 94°C seguidos de 24 ciclos de alineamiento y extensión en tres pasos de 94°C durante 25 seg, 50°C durante 35 seg y 68°C durante 2 min, para finalizar con un paso de 68°C durante 7 min (24). Los productos de la PCR se separaron y analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Controles negativos y positivos apropiados fueron utilizados en las dos rondas de amplificación.

Purificación de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se purificaron mediante gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque 1,077. Las CMSP extraídas se lavaron tres veces con RPMI para luego resuspenderlas en RPMI, cuantificarlas y determinar su viabilidad por el método de exclusión del colorante azul de tripano. Las células fueron ajustadas con RPMI-suero bovino fetal (SBF) al 10% a 7×10^5 células/200 μ L.

Condiciones de cultivo

Las CMSP (7×10^5 cel/mL) fueron cultivadas (37°C y 5% de CO₂) en medio com-

pleto solo o en presencia del antígeno del core del VHC (2,5 μ g/mL) con o sin anti-CD28 (1 μ g/mL) durante 48 h para inducir la expresión de los marcadores de superficie CD40L, CD25 y CD69 y durante 72 h para determinar la producción intracelular de citocinas, en cuyo caso se añadió además 1 μ g/mL de Brefeldina 6 h antes de la cosecha. Como control positivo de la estimulación celular se utilizaron mitógenos, cultivando las células con: PMA (200 ng/mL) e Ionomicina (500 ng/mL) durante 6 h para determinar la expresión de CD40L; PMA (50 ng/mL) e Ionomicina (1 μ /mL) durante 6 h para determinar la producción intracelular de citocinas y PHA (20 μ g/mL) durante 20 horas para determinar la expresión de CD69 y CD25.

Medición de la expresión de CD40L, CD25 y CD69 en la superficie celular

Las CMSP fueron lavadas con PBS-EDTA y resuspendidas en PBS-BSA al 1%, para luego marcarlas con 1 μ g/mL de anti CD4-FITC, anti CD40L-PE, anti CD25-PE y anti CD69-PerCp. Se incubaron a 4°C durante 30 min en la oscuridad y luego de tres lavados mediante centrifugación fueron fijadas con paraformaldehído (PAF) al 3% en PBS y analizadas en el citómetro de flujo.

Medición de la producción intracelular de citocinas

Las CMSP estimuladas fueron resuspendidas en PBS/BSA 1% y marcadas con anti-CD4-FITC durante 30 min a 4°C, lavadas tres veces, fijadas con PAF al 3% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min, permeabilizadas con saponina al 0,09% a 4°C durante 10 min y luego teñidas con 1 μ g/mL de los anticuerpos contra las citocinas respectivas (IFN- γ e IL-10) marcados con PE, a 4°C durante 30 minutos en oscuridad. En el caso del marcaje con anti-TGF- β biotinilado, las células fueron la-

vadas, fijadas, permeabilizadas e incubadas durante 1h a 4°C con 10 µg/mL de estreptavidina a fin de bloquear la biotina endógena, posterior a tres lavados, las células fueron incubadas con anti-TGF-β biotinilado, lavadas y seguidamente teñidas con estreptavidina-PE. Luego de tres lavados las células fueron analizadas mediante el citómetro de flujo. Para analizar la expresión de citoquinas intracelulares en los linfocitos CD4⁺ se siguió la metodología que se describe en la sección Análisis por citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSort mediante el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Fueron capturados 10.000 eventos y mediante un gráfico tipo "dot-plot", se estableció la región donde se ubican las células linfoides en un gráfico de FSC (*Forward scatter*) y SSC (*Side scatter*), de esta región se seleccionaron aquellas células con marcaje positivo para CD4. La expresión de marcadores de superficie y citoquinas intracitoplasmáticas fue analizada solamente en este grupo celular mediante dobles marcajes. Las lecturas fueron realizadas mediante porcentajes de expresión de las moléculas en estudio. Los datos son expresados como diferencias entre células estimuladas o no con los antígenos indicados.

Análisis estadístico

El porcentaje de expresión de cada marcador de superficie o de la producción de citoquinas intracelulares se analizó usando la prueba *t*-student calculada con el pro-

grama GraphPad PRISM (versión 4.00). Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (DS). Se consideraron estadísticamente significativos a los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Valoración clínica, serológica y virológica de los individuos infectados

En la Tabla I se resumen los datos de la valoración clínica de los individuos infectados crónicos. Como puede observarse en general la población estudiada presentaba un cuadro inflamatorio hepático a juzgar por los niveles elevados de las enzimas hepáticas. La infección por el virus VHC pudo ser corroborada mediante el "Nested RT-PCR" en todos los individuos diagnosticados mediante técnicas inmunoenzimáticas.

El entrecruzamiento de CD28 favorece la activación antígeno específica de los linfocitos T CD4⁺ en pacientes infectados con VHC

Para analizar la respuesta de células T cooperadoras contra el antígeno del core del VHC y el efecto de la coestimulación mediada por CD28 analizada a través del entrecruzamiento de CD28 en la membrana celular (lo cual es comparable al acoplamiento con sus ligandos en las células presentadoras de antígeno), se compararon la respuesta de los controles, de los familiares/contacto seronegativos y la de los individuos seropositivos infectados crónicos. La Fig. 1a muestra que en respuesta al antígeno del core del VHC, existe una tendencia

TABLA I
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS INDIVIDUOS CRÓNICAMENTE INFECTADOS

	Edad (años)	Sexo (F/M)	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/mL)
Pacientes	59,5 ± 11,80	6/5	73 ± 35,2	56,6 ± 29,9	84 ± 43,9

Los valores representan la media más o menos la desviación estándar (DS). ALT Alanina amino transferasa. Valores normales: 5-45 U/L. AST Aspartato amino transferasa. Valores normales: 9-40 U/L. GGT γ-Glutamil transpeptidasa. Valores normales: 75-200 U/L.

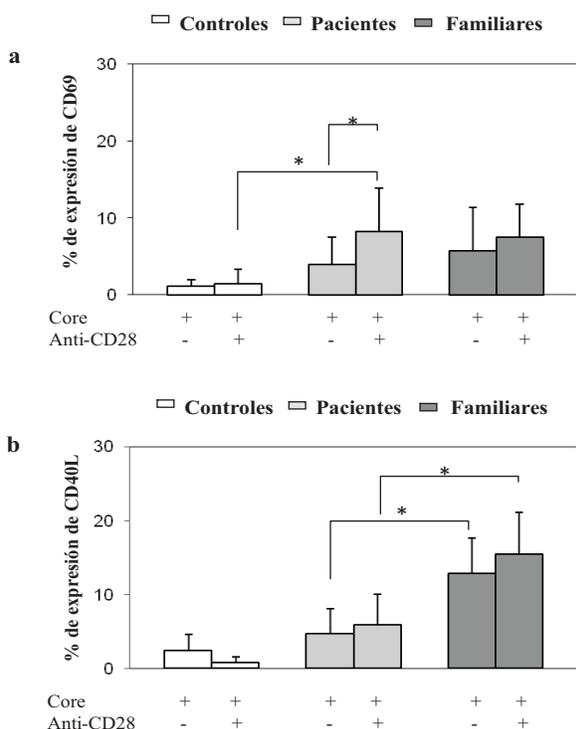


Fig. 1. Efecto del estímulo anti-CD28 más core, sobre la expresión de CD69 y CD40L en los linfocitos CD4⁺ de pacientes infectados crónicos con VHC. La Fig. 1a muestra la expresión de CD69 en respuesta a la estimulación con antígeno del core del VHC (2,5 µg/mL) solo o en combinación con el anticuerpo anti-CD28 (1 µg/mL) durante 48 h, en controles sanos (izquierda), pacientes infectados crónicos (medio) y familiares/contactos (derecha). La Fig. 1b muestra la expresión de CD40L en respuesta a la estimulación con antígeno del core del VHC o en combinación con el anticuerpo anti-CD28 durante 48 h, en controles sanos (izquierda), pacientes infectados crónicos (medio) y familiares/contactos (derecha). *Se refiere a $p < 0,05$.

al incremento del marcador de activación CD69 en linfocitos CD4⁺ de los familiares contacto (aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas); mientras que en los pacientes infectados crónicos este incremento solo es observado al co-estimular con anti-CD28 ($p < 0,05$). En lo

que respecta a la molécula CD40L, la Figura 1b muestra un incremento en su expresión en linfocitos CD4⁺ de familiares contacto ($p < 0,05$), en respuesta tanto al core solo o en asociación con anti-CD28; mientras que en los pacientes infectados no se evidenció un incremento significativo en la expresión de esta molécula en respuesta a ninguno de los estímulos mencionados.

En el caso de la molécula CD25 se evidenció un incremento significativo en la expresión del receptor en la superficie de los linfocitos CD4⁺ de los infectados crónicos y Familiares/contactos, al compararlo con los controles ($p < 0,05$), que no sufrió cambios cuando se utilizó el anticuerpo anti-CD28 (Fig. 2).

La coestimulación vía CD28 compensa la producción deficiente de IFN-γ en linfocitos CD4⁺ de pacientes infectados crónicos con VHC

Se ha descrito previamente que los individuos infectados crónicos producen IFN-γ en forma deficiente en respuesta a la estimulación con Ag del VHC (25). En este estudio se evaluó si esta alteración está relacionada con déficit en señales a través de la molécula CD28. En la Fig. 3 se evidencia una tendencia que muestra un incremento en la producción de IFN-γ en respuesta al antígeno del core del VHC en familiares/contactos (aunque no estadísticamente significativa), mientras que en los pacientes infectados crónicos dicha inducción requiere de la coestimulación con anti-CD28 ($p < 0,05$).

La co-estimulación vía CD28 reduce la producción de TGF-β en los linfocitos de los individuos infectados crónicos con el VHC

Adicionalmente se evaluó la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ al antígeno del core del VHC a través de la medición intracelular de IL-10 y TGF-β. Los resultados demuestran que tanto los pacientes infecta-

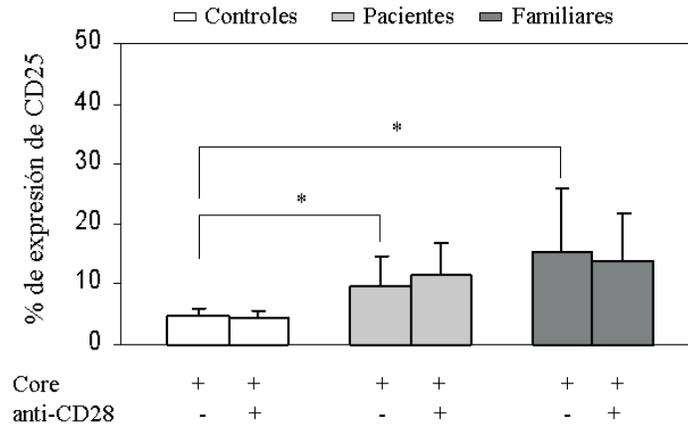


Fig. 2. Efecto del estímulo anti-CD28 más core, sobre la expresión de CD25 en los linfocitos CD4⁺ de pacientes infectados crónicos con VHC. La Fig. 2 muestra la expresión de CD25 en respuesta a la estimulación con antígeno del core del VHC solo o en combinación con el anticuerpo anti-CD28 durante 48 h, en controles sanos (izquierda), pacientes infectados crónicos (medio) y familiares/contactos (derecha). *Se refiere a $p < 0,05$.

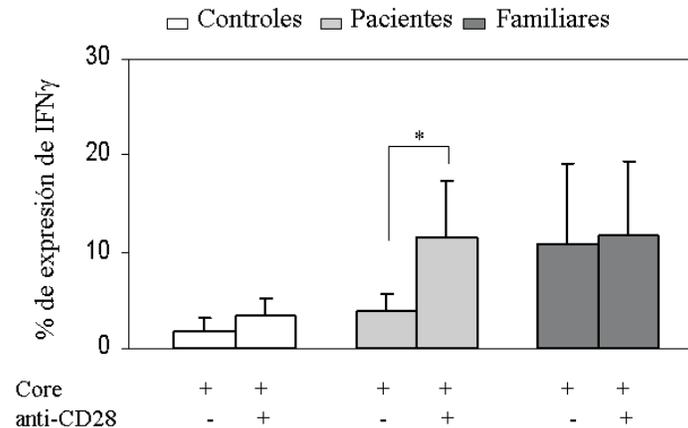


Fig. 3. La coestimulación vía CD28 compensa la producción deficiente de IFN- γ en los linfocitos CD4⁺ de pacientes infectados crónicos con VHC. La Fig. 3 muestra la producción de IFN- γ en respuesta a la estimulación con antígeno del core del VHC solo o en combinación con el anticuerpo anti-CD28 durante 72 h, en controles sanos (izquierda), pacientes infectados crónicos (medio) y familiares/contactos (derecha). *Se refiere a $p < 0,05$.

dos como los familiares contactos producen niveles comparables de IL-10 frente al antígeno, independientemente del entrecruzamiento de CD28 (Fig. 4a). Sin embargo, la estimulación con antígeno del core induce un incremento significativo en la producción de TGF- β sólo en los pacientes infectados crónicos ($p < 0,05$) (Fig. 4b). Este incremento específico en la producción de TGF- β es abolido cuando además del estímulo antigénico se entrecruza la molécula

CD28 en los linfocitos CD4⁺ de los pacientes infectados crónicos ($p < 0,05$).

Con la finalidad de descartar la posibilidad de una supresión generalizada de la respuesta en los individuos infectados crónicos, las CMSP fueron estimuladas con mitógenos policlonales, evidenciándose que los individuos infectados respondieron expresando los marcadores de activación y las citocinas medidas en cantidades comparables a las de los controles (datos no mostrados).

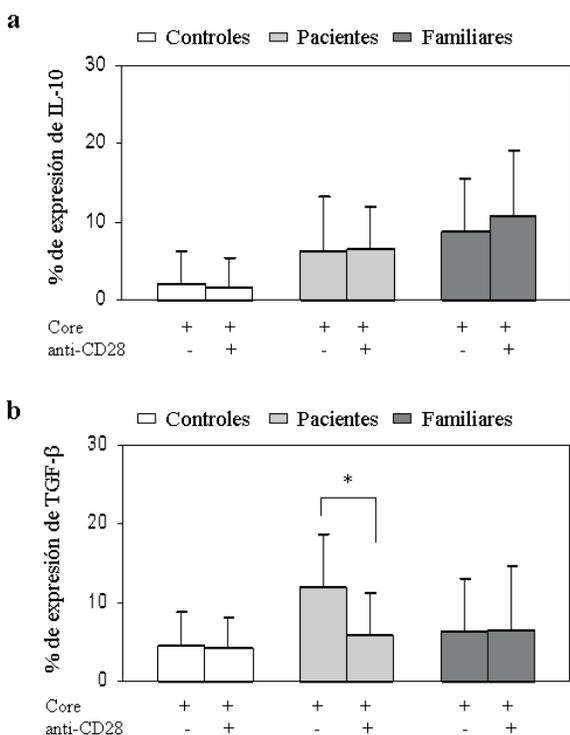


Fig. 4. La co-estimulación vía CD28 reduce la producción de TGF- β en los linfocitos CD4⁺ de los individuos infectados crónicamente con el VHC. La Fig. 4a muestra la expresión de IL-10 en respuesta a la estimulación con antígeno del core del VHC solo o en combinación con el anticuerpo anti-CD28 durante 72 h, en controles sanos (izquierda), pacientes infectados crónicos (medio) y familiares/contactos (derecha). La Fig. 4b muestra la expresión de TGF- β en respuesta a la estimulación con antígeno del core del VHC solo o en combinación con el anticuerpo anti-CD28 durante 72 h, en controles sanos (izquierda), pacientes infectados crónicos (medio) y familiares/contactos (derecha). *Se refiere a $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Las bases moleculares de la variabilidad en la respuesta inmunitaria contra el VHC no han sido del todo esclarecidas. Para que un virus no citopático como el VHC pueda persistir en el hospedador, una de es-

tas dos eventualidades debe ocurrir: el virus debe escapar del reconocimiento por los elementos de la respuesta inmunitaria o promover una respuesta inmunitaria anti-viral de naturaleza inhibitoria.

Se desconoce si la respuesta adaptativa deficiente observada en sujetos que persisten con la infección es una consecuencia de sobrecarga antigénica durante la primoinfección, de defectos en la presentación antigénica inducidos por el virus, de inducción de células T reguladoras, de restricción genética del repertorio de linfocitos T anti-VHC u otras causas (26). Cualquiera de los mecanismos anteriormente expuestos está estrechamente vinculado con eventos tempranos en la activación y diferenciación de poblaciones de linfocitos T cooperadoras antígeno específicas.

En este trabajo se exploraron fenómenos relacionados con la activación de linfocitos T CD4⁺ y la producción de citocinas en respuesta a la estimulación antigénica en sujetos infectados crónicamente con el VHC, individuos familiares contactos de los pacientes infectados y controles sanos. Nuestro estudio se concentró en los siguientes aspectos: 1) detección de marcadores de activación en poblaciones T cooperadoras y 2) estudio de la expresión de citocinas intracelulares en estas mismas poblaciones celulares. El análisis se realizó frente al estímulo con antígeno del core del VHC solo o en asociación al entrecruzamiento de la molécula CD28 como señal coestimuladora.

Existen varios factores que determinan el destino de una célula T virgen en respuesta al desafío antigénico (27), estos incluyen: la fuerza de las señales mediadas por el TCR, o la densidad antigénica, el microambiente de citocinas y las vías coestimuladoras. Por lo tanto exploramos la inducción y expresión de dos marcadores tempranos de activación (CD69 y CD25) y un ligando clave en la coestimulación de linfocitos T denominado CD40L. Nuestros

resultados muestran que los linfocitos CD4⁺ de los pacientes infectados crónicos incrementaron la expresión de CD69 en forma significativa solo cuando las células fueron estimuladas con antígeno del core asociado al entrecruzamiento de CD28. Este incremento en CD69 no fue significativo en los familiares contacto aunque se observó una tendencia positiva, que probablemente amerita el análisis de un mayor número de muestras. Estos datos sugieren que existe un déficit en la señalización de esta principal vía de coestimulación requerida para la activación de los linfocitos T.

Por otro lado se evidenció que no hubo incremento en la expresión de CD40L en las células CD4⁺ de los pacientes infectados crónicos en respuesta al core del virus, a diferencia de lo que se observa en los familiares contacto. Por cuanto la molécula CD40L es necesaria para la maduración de células T y células dendríticas, su déficit podría conducir a un círculo vicioso que mantiene una población de células T anérgicas, parcialmente activadas o simplemente reguladoras durante la infección crónica (28, 29). Estas observaciones requieren de experimentos adicionales que incluyan un mayor número de pacientes para obtener conclusiones definitivas. Sin embargo, cabe destacar que las tendencias reflejadas en este trabajo, sugieren un déficit en señales de coestimulación en células CD4⁺ en respuesta al core de VHC en pacientes infectados crónicos.

Aunque nuestros resultados no lo muestran en forma definitiva, el patrón de respuesta observado en los familiares contactos de los pacientes infectados se corresponde con el reportado para los individuos que se han recuperado de la infección aguda, en quienes se detecta una respuesta celular persistente significativamente más alta que para los individuos crónicamente infectados (30).

Al utilizar la proteína purificada del core del VHC como estímulo para los linfo-

citocitos T CD4⁺ de sangre periférica, no se evidenció respuesta entre los controles, lo que indica que el producto recombinante no contiene ningún elemento adicional que pudiera estimular de forma inespecífica a las células T y que las observaciones analizadas en los distintos grupos son antígeno específicas. Adicionalmente, se evidencia que bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio, no se estimulan las células T vírgenes, aún empleando anti-CD28 como señal coestimuladora, y que la respuesta observada en los pacientes infectados y contactos corresponde a la estimulación de células de memoria y/o efectoras.

Hay varias alternativas para explicar la presencia de respuesta inmunitaria celular en personas seronegativas: 1) Que se trate de respuesta de estimulación de células vírgenes, o respuesta inmunitaria primaria *in vitro*. Esta alternativa puede ser descartada pues de ser así se observaría también en los controles sanos (12, 13) y además la estimulación *in vitro* de células vírgenes requiere de varias rondas de estimulación en presencia de citocinas como la IL-2 y de células dendríticas maduras, lo que sugiere que se trata más bien de respuestas de células T de memoria tal como se ha reportado entre los casos recuperados (9). 2) Algunos sugieren que estos individuos nunca estuvieron infectados o simplemente tuvieron contacto con virus "muertos" o no infecciosos, pero de ser así no habría respuesta policlonal ante las proteínas no estructurales que necesariamente deben producirse en el transcurso de la replicación viral, lo que indica que hubo una infección subclínica y no un simple contacto con antígenos virales no infecciosos (11, 13). 3) Que la respuesta represente una etapa muy temprana de la infección, alternativa que puede ser descartada porque la respuesta se conserva en individuos que han sido seguidos por más de un año sin observarse seroconversión ni presencia del ARN viral en sangre (10). Ade-

más existen evidencias de producción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ CTL de fenotipo CD45RO⁺CD28⁻ en individuos seronegativos sanos familiares de individuos infectados, que se derivan de la reestimulación de linfocitos T de memoria (CD45RO⁺CD28⁺) precursores y no de linfocitos T vírgenes; lo que sugiere que existe memoria inmune a una infección pasada (13). 4) Que la respuesta represente a individuos que han estado expuestos al virus pero que han logrado aclarar definitivamente la infección (12). En este caso se estaría sobreestimando la verdadera tasa de infección y se estaría pasando por alto además una valiosa información sobre la naturaleza de la inmunidad protectora.

En lo que respecta a la producción de citocinas queremos destacar dos observaciones muy importantes: 1) Cuando se estimula con el core del VHC se observa una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, en el incremento de los niveles de IFN- γ en los familiares contacto, a diferencia de lo que se observó en los pacientes infectados crónicos y controles sanos. Este escenario se adapta a las observaciones ya realizadas en otras investigaciones, donde los pacientes con hepatitis C crónica muestran una baja producción de IFN- γ en respuesta al antígeno del core en relación a los pacientes con una infección limitada (31-33). Este déficit en la producción de IFN- γ , una citocina del patrón Th1 clave en el control de la replicación viral, es recuperado cuando las células son coestimuladas vía CD28 (en forma estadísticamente significativa), lo que sustenta la sugerencia anterior sobre un déficit en esta importante vía de señalización frente al VHC. 2) El estímulo con el core del VHC induce un incremento significativo en la producción de TGF- β solo en los pacientes infectados crónicos y dicho incremento es suprimido al coestimular vía CD28. Este dato es muy significativo en el contexto del papel que CD28 juega en el

desarrollo de poblaciones T reguladoras inducidas en la periferia, evidenciado por el hecho que células T antígeno específicas mutantes doble negativos de CD28 expresan niveles elevados de Foxp3, evidenciando su papel en el control de la tolerancia periférica (21). Por otro lado se ha descrito ampliamente la contraparte funcional entre las moléculas de señalización CD28 y CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4), por cuanto ambas moléculas compiten por los mismos ligandos y sus efectos son opuestos (34). Se ha descrito que la molécula CTLA-4 es un mediador importante de la producción de TGF- β y además es una molécula distintiva de poblaciones de T reguladoras naturales (35) y es requerida para el desarrollo de células T reguladoras inducidas en la periferia (36). Por otro lado existen reportes previos que demuestran un incremento de células T CTLA-4 positivas en pacientes infectados por VHC (37, 38). Lo anteriormente expuesto sugiere que al incrementar la estimulación vía CD28 se estaría probablemente compitiendo la señalización supresora dominante de CTLA-4 en poblaciones T reguladoras durante la infección crónica por VHC, observación que requiere estudios posteriores.

A fin de descartar un defecto generalizado de la respuesta inmunitaria en los pacientes infectados crónicos, las CMSP se estimularon con mitógenos policlonales. La mayoría de los individuos infectados mostraron una expresión de marcadores de activación y producción de citocinas intracitoplasmáticas dentro del rango de valores expresados por los controles, lo que permite descartar que durante la infección crónica con el VHC se produzca un estado de inmunosupresión generalizada, que pudiera usarse como argumento para explicar la incapacidad para resolver la infección y el consiguiente establecimiento del estado infeccioso crónico. A pesar de que la respuesta a los mitógenos no necesariamente es repre-

sentativa de la respuesta fisiológica normalmente mediada por el TCR, se ha observado que durante la infección crónica con el VHC se conserva la capacidad de responder a otros antígenos como citomegalovirus, toxoide tetánico, virus de Epstein Barr o *Candida albicans* (30, 39-41).

Las diferencias existentes entre los infectados crónicos y los contactos que parecen haber resuelto o al menos tener bajo control el proceso infeccioso, constituyen una clave fundamental para comprender los procesos que conducen a la cronicidad. Los diferentes comportamientos ante las señales coestimuladoras pueden analizarse como alteraciones de las células encargadas de expresar estas señales a los linfocitos T: las células dendríticas. Numerosos autores argumentan que la incapacidad de los sujetos crónicamente infectados para resolver el cuadro infeccioso se debe a las deficiencias estimuladoras de las células dendríticas (15, 16, 42-44). Como objeción a este argumento resalta el hecho que los individuos infectados conservan la capacidad para responder a otros antígenos, a la vez que se ha mostrado evidencias de células dendríticas maduras competentes en pacientes crónicamente infectados (45, 46). Una de las maneras de explicar esta discrepancia es que las deficiencias de las células dendríticas dependen de la infección de estas células por el virus. Se ha demostrado que el virus puede infectar además de las células hepáticas a monocitos, linfocitos y plaquetas y que la expresión de las proteínas estructurales del core, NS3 y de la envoltura por parte de células dendríticas transfectadas, disminuye su capacidad de presentación antigénica y de expresión de señales coestimuladoras. Esta disfunción estaría limitada a una baja proporción de las células dendríticas sin afectar la respuesta a otros patógenos (15, 16, 42, 44). Sin embargo es posible que las alteraciones funcionales de las células dendríticas sean una

consecuencia directa del estado crónico y la alta tasa de replicación viral en vez de ser un prerrequisito de su establecimiento (46). Bajo este contexto, la insuficiencia de las células dendríticas serviría de mantenimiento del estado crónico, que involucraría a las células T, que como se sabe pueden afectar el proceso de maduración de las células dendríticas mediante la expresión de CD40L (15).

Los resultados de este trabajo soportan numerosos reportes previos en donde se demuestra claramente que existe una deficiente respuesta inmunitaria adaptativa durante la infección crónica por VHC, responsable en parte de la persistencia viral generando una respuesta inflamatoria crónica. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que existe una activación deficiente de poblaciones de linfocitos T cooperadoras que pudiera estar condicionada en parte por un déficit en señales de coestimulación. Siendo CD28 la molécula coestimuladora mayormente estudiada y comprendida, el poder profundizar en el funcionamiento de esta vía de señalización y su papel durante la activación y diferenciación de poblaciones de linfocitos T efectoras contra el VHC, representa un punto clave para el diseño de estrategias terapéuticas que permitan revertir o controlar la respuesta inmunitaria inhibitoria antígeno específica durante la hepatitis C crónica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al CDCHT de la Universidad de los Andes subvención M-836-05-07-B.

REFERENCIAS

1. Freeman AJ, Marinos G, French RA, Loyd AR. Immunopathogenesis of Hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79:515-536.

2. **Lauer GM, Walker BD.** Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345:41-51.
3. **Aguilar MS, Cosson C, Loureiro CL, Devesa M, Matínez J, Villegas H, Flores J, Ludert JE, Alarcón de Noya B, Noya D, Liprandi F, Pujol FH.** Prevalence of infection with hepatitis C virus in Venezuela, as assessed with an immuno-assay based on synthetic peptides. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95:187-195.
4. **Petruff C, Chopra S, Graqham C.** Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14:633-667.
5. **Racanelli V, Rehermann B.** Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003; 24: 456-464.
6. **Chang KM, Rehermann BV, Chisari F.** Immunopathology of Hepatitis C. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 19:57-68.
7. **Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Rice CM, Wong J, Houghton M, Lau JYN.** The role of Hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic Hepatitis C. *J Immunol* 1997; 158:1473-1481.
8. **Jacobson-Brown PM, Newman MG.** Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin Biochem* 2001; 34:167-171.
9. **Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR.** Novel CD4⁺ and CD8⁺ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; 37:577-589.
10. **Bronowicki JP, Vetter D, Uhl G, Hudziak H, Uhlacher A, Vetter JM, Dofoel M.** Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients. *J Infect Dis* 1997; 176:518-522.
11. **Kamal SM, Amin A, Madwar M, Graham CS, He Q, Al Tawil A, Rasenack J, Nakano T, Robertson B, Ismail A, Koziel MJ.** Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients. *J Virol.* 2004; 78:12252-12258.
12. **Koziel MJ, Koziel J, Wong DK, Dudley DD, Houghton M, Walker BD.** Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons. *J Infect Dis* 1997; 176:859-866.
13. **Scognamiglio P, Accapezzato D, Casciaro MA, Cacciani A, Artini M, Bruno G, Chircu ML, Sidney J, Southwood S, Abrignani S, Sette A, Barbana V.** Presence of effector CD8⁺ T cells in Hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors. *J Immunol* 1999; 162:6681-6689.
14. **Rehermann B, Nascimbeni M.** Immunology of hepatitis B and hepatitis C Virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:215-229.
15. **Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribilla L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J.** Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol.* 2003; 77:10862-10871.
16. **Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, López-Díaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, García N, Borrás-Cuesta F, Prieto J.** Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 2002; 76: 5062-5070.
17. **Testi R, D'Ambrosio D, De María R, Santoni A.** The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15:479-483.
18. **Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR.** An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40:1062-1071.
19. **Frauwirth KA, Thompson CB.** Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 2002; 109: 195-299.
20. **Secchiero P, Zella D, Curreli S, Mirandola P, Capitani S, Gallo RC, Zauli G.** Engagement of CD28 modulates CXC chemokine receptor 4 surface expression in both resting and CD3-stimulated CD4 T cells. *J Immunol* 2000; 164:4018-4024.
21. **Lyddane C, Gajewska BU, Santos E, King PD, Furtado GC, Sadelain M.** Cutting Edge: CD28 controls dominant regulatory

- T cell activity during active immunization. *J Immunol* 2006; 176:3306-3310.
22. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
 23. **Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W.** Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 2004; 78:5288-5298.
 24. **Ogata S, Nagano-Fujii M, Ku Y, Yoon S, Hotta H.** Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3625-3630.
 25. **Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM.** Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37:1189-1198.
 26. **Chisari FV.** Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 2005; 436:930-932.
 27. **Gonzalez PA, Carreno LJ, Figueroa CA, Kalergis AM.** Modulation of immunological synapse by membrane-bound and soluble ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18:19-31.
 28. **Sumoza-Toledo A, Eaton AD, Sarukhan A.** Regulatory T cells inhibit protein kinase C theta recruitment to the immune synapse of naive T cells with the same antigen specificity. *J Immunol* 2006; 176:5779-5787.
 29. **Zambrieki E, Zal T, Yachi P, Shigeoka A, Sprent J, Gascoigne N, McKay D.** In vivo anergized T cells form altered immunological synapses in vitro. *Am J Transplant* 2006; 6:2572-2579.
 30. **Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad A, Bakke A, Bouwer A, Hinrichs D.** Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: Correlation with clinical disease stages. *Hepatology* 2002; 35:190-198.
 31. **Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, Kaiser R, Ihlenfeld HG, Jung G, Sauerbruch T, Spengler U.** Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 1999; 31:971-978.
 32. **Anthony DD, Post AB, Valdez H, Peterson D, Murphy M, Heeger P.** ELISPOT analysis of hepatitis C virus protein-specific IFN-gamma-producing peripheral blood lymphocytes in infected humans with and without cirrhosis. *Clin Immunol* 2001; 99:232-240.
 33. **Sreenarasimhaia J, Jaramillo A, Crippin J, Lisker-Melman M, Chapman W, Mohanakumar T.** Lack of optimal T-cell reactivity against the hepatitis C virus is associated with the development of fibrosis/cirrhosis during chronic hepatitis. *Hum Immunol* 2003; 64:224-230.
 34. **Riley JL, June CH.** The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 2005; 105:13-21.
 35. **Sakaguchi S.** Regulatory T cells: Meden Ajan. *Immunol Reviews* 2006; 212:5-7.
 36. **Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA.** TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol* 2006; 176:3321-3329.
 37. **Billerbeck E, Blum HE, Thimme R.** Parallel Expansion of Human Virus-Specific FoxP3- Effector Memory and De Novo-Generated FoxP3+ Regulatory CD8+ T Cells upon Antigen Recognition In Vitro. *J Immunol* 2007; 179:1039-1048.
 38. **Manigold T, Shin EC, Mizukoshi E, Mihalik K, Murthy KK, Rice CM, Piccirillo CA, Rehermann B.** Foxp3+ CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood* 2006; 107:4424-4432.
 39. **Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder HM, Lauer GM, Walker BD, Sullivan J, Phillips R, Pape GR,**

- Klenerman P.** Sustained dysfunction of antiviral CD8⁺ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001; 75: 5550-5558.
40. **Ott PA, Berner BR, Herzog BA, Guerkov R, Yonkers NL, Durinovic-Bello I, Tary-Lechmann M, Lechmann PM, Anthony DD.** CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases. *J Immunol Methods* 2004; 285: 223-235.
41. **Sugimoto K, Stadanlick J, Ikeda F, Brensinger C, Furth E, Alter HJ, Chang KM.** Influence of ethnicity in the outcome of hepatitis C virus infection and cellular immune response. *Hepatology* 2003; 37: 590-599.
42. **Dolganovic A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L, Mandrekar P, Zapp M, Szabo G.** Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003; 170:5615-5624.
43. **Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M.** Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999; 162:5584-5591.
44. **Tsubouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M.** Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2004; 39:754-762.
45. **Longman R, Talal AH, Jacobson IM, Albert M, Rice CM.** Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 2004; 103:1026-1029.
46. **Rollier C, Drexhage J, Verstrepen B, Verschoor E, Bontrop R, Koopman G, Heeney J.** Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* 2003; 38:851-858.