

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**



**RESTAURACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR
CITOTÓXICA ESPECÍFICA EN LA INFECCIÓN
CRÓNICA POR VIRUS DE LA HEPATITIS C
MEDIANTE LA MODULACIÓN DE VÍAS
INDUCTORAS DE ANERGIA Y APOPTOSIS.**

TESIS DOCTORAL

Autora: Selma Benito Martínez

Director: Juan-Ramón Larrubia Marfil

Codirectora: Trinidad Parra Cid

2011

María José Carmena Sierra, Directora del Bioquímica y Biología Molecular de
la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado “*Restauración de la respuesta celular citotóxica específica en la infección crónica por virus de la hepatitis C mediante la modulación de vías inductoras de anergia y apoptosis*”, ha sido realizado por D^a. **Selma Benito Martínez**, en el Hospital Universitario de Guadalajara, bajo la dirección de los doctores D^a. Trinidad Parra Cid y D. Juan Ramón Larrubia Marfil y, a su juicio, cumple todos los requisitos para proceder a su defensa pública como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a 20 de mayo de 2011





Hospital Universitario
Donante de Sangre, s/n. 19002 Guadalajara
Teléfono 949 20 92 00



D. *Juan Ramón Larrubia Marfil*, FEA de Aparato Digestivo y Coordinador de la Unidad de Hepatología Translacional del Hospital Universitario de Guadalajara y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Alcalá y D^a. *Trinidad Parra Cid*, FEA de Bioquímica Clínica y Coordinadora de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Guadalajara,

CERTIFICAN QUE:

La tesis doctoral titulada *“Restauración de la respuesta celular citotóxica específica en la infección crónica por virus de la hepatitis C mediante la modulación de vías inductoras de anergia y apoptosis”*, presentada por D^a Selma Benito Martínez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública ante el tribunal correspondiente.

Y, para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado.

Guadalajara, a 13 de Julio de 2011

Fdo: Dr. Juan Ramón Larrubia Marfil
FEA de Aparato Digestivo

Fdo: Dra. Trinidad Parra Cid
FEA de Bioquímica Clínica

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han participado de un modo u otro en la realización de esta tesis doctoral y muy especialmente:

A mis directores de tesis, Juanra y Trini, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por su apoyo, confianza en mi, comprensión, esfuerzo y dedicación a este trabajo desde el momento en que llegué. Gracias, de corazón.

A mis compañeras de la Unidad de Investigación, Miryam y María, por su ayuda durante todos estos años, por escucharme, animarme y por ser además de compañeras, amigas.

A todas las personas de la Sección de Aparato Digestivo y de la Unidad de Hepatología Translacional del Hospital Universitario de Guadalajara por desarrollar la parte clínica de este estudio y ayudarme en la parte básica.

A todos los pacientes que de forma desinteresada participaron en la realización de este trabajo de investigación.

A Schering-Plough S.A y a la Fundación para la Investigación Sanitaria en Castilla-La Mancha, por el soporte económico prestado.

A las diferentes editoriales y revistas que me permitieron utilizar y adaptar algunas de las figuras empleadas en este trabajo.

A mis padres, M^a Sol y Vicente y a mi hermano Javier, por el cariño y la confianza que tienen en mi, por su apoyo incondicional y por su constante motivación en la vida.

Al resto de mi extensa familia, por preocuparse por mi en todo momento y preguntarme cada día como iba con mi tesis.

Y por último, a Antonio, por ser mi apoyo, mi alegría, por su plena confianza en mí, por entender las horas de nuestra vida invertidas en este trabajo, por animarme cada día y no dejarme desfallecer en el camino.

A todos, de todo corazón, GRACIAS.

RESUMEN

Background: During chronic hepatitis C virus (HCV) infection, HCV-specific cytotoxic T cells (CTLs) lack adequate effector functions and fail to control HCV. This impairment could be related with programmed death-1 (PD-1) and interleukin (IL)-7 receptor (CD127) regulation. Engagement of PD-1 and its ligand, PD-L1, delivers a negative signal to the T cell receptor (TCR) activation pathways, avoiding proliferation and IL-2 production. On the other hand, CD127 plays an essential role in mature lymphocyte survival by counteracting apoptosis induction after antigen encounter through Bcl2-interacting mediator (Bim) down-regulation, enhancing IL-2 secretion and life span. Therefore, it could be possible that HCV infection could modulate PD-1 and CD127 expression in order to impair HCV-specific CTL reactivity through an induction of an anergic and pro-apoptotic state to favour viral persistence.

Objectives: 1.- To describe HCV specific CTL response according to viral control, paying especial attention to PD-1 and CD127 expression. 2.- To analyse the effect of PD-1 and CD127 pathways modulation on HCV-specific CTL reactivity.

Materials and Methods: Non-experimental cross-sectional analytical study. HCV-specific CTL frequency, proliferation, γ -IFN production, and PD-1/CD127 phenotypes (dependent variables) according to viral control (independent variable) were analysed. HLA-A2⁺ HCV infected patients were recruited and divided into two groups according to their serum HCV RNA and alanine transaminase (ALT) levels; defined as persistent infection (PI), and resolved infection (RI). Peripheral blood (PBMC) and intrahepatic (IHMC) mononuclear cells were obtained. Directly *ex-vivo* and after specific stimulation, HCV-specific CTL frequency against three immunodominant epitopes (NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ y Core₁₃₂₋₁₄₀) was tested using labelled pentameric HLA-A2/peptide complexes (Pent). Afterwards, PD-1/CD127 and γ -IFN production on HCV-specific CTLs were analysed. HCV-specific CTL proliferation after specific *in-vitro* challenge in presence or absence of blocking anti-PD-L1 antibodies, to block PD-1/PD-L1 pathway, and z-VAD-fmk to block apoptosis cascade, induced by IL-7 deprivation, were also tested. Bim expression was analysed after specific *in-vitro* challenge in presence of z-VAD-fmk. In order to test whether HCV sequence variation could affect to HCV-specific CTL response, NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ and NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ genes were sequenced in selected cases.

Results: RI and PI patients displayed a low frequency of HCV-specific CTLs in peripheral blood (PB), but these cells were sequestered into the liver in PI patients. Directly *ex-vivo*, HCV-specific CTLs from PB displayed a higher PD-1 and lower

CD127 expression in PI with regard to RI cases. Interestingly, PD-1/CD127 phenotype on HCV-specific CTLs showed a positive and negative correlation respectively with viraemia in PI cases. Moreover, this PD-1/CD127 gradient was also observed between PB and liver in PI cases. Proliferation and γ -IFN production on HCV-specific CTLs from RI cases were higher than in PI cases. Specifically, proliferation and γ -IFN secretion after stimulation on PD-1⁻/CD127⁺ cells from RI cases was preserved, while it was impaired on PD-1⁺/CD127⁻ cells from PI patients. PD1⁺/CD127⁺ population was also observed in some PI patients, and these maintained expansion ability but they did not target the infecting virus. Finally, HCV-specific CTL proliferation in PI increased after PD-1/PD-L1 interaction blocking, and after anti-apoptotic treatment. Bim expression on HCV-specific CTLs from PI patients was also enhanced.

Conclusions: HCV-specific CTL response is still present in persistent infection but its reactivity is impaired. This impairment correlates with PD-1 up-regulation and CD127 down regulation. Particularly, during chronic HCV infection non-reactive PD-1⁺ HCV-specific CD8⁺ cells targeting the virus are CD127⁻/Bim⁺ and, blocking apoptosis and PD-1/PD-L1 pathway on them enhances in-vitro reactivity. Modulation of these two pathways could be considered as a future therapeutic tool for HCV chronic infection treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **A:** Absorbancia
- **Ac:** Anticuerpo
- **ADAR:** Adenosina Desaminasa específica de RNA
- **ALT:** Alanina Aminotransferasa
- **Apaf-1:** Factor activador de proteasas de apoptosis
- **Apo:** Apoproteína
- **Bcl-2:** Proteína B-cell leukemia/linfoma 2
- **Bim:** Mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2
- **BrEt:** Bromuro de Etidio
- **BTLA:** Atenuador de linfocito B y T
- **CCR:** C-C receptor de quimioquinas
- **CD:** Antígenos de Diferenciación (Cluster of Differentiation)
- **CHC:** Carcinoma Hepatocelular
- **Cit c:** Citocromo c
- **CMIH:** Células Mononucleares Intrahepáticas
- **CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica
- **CMV:** Citomegalovirus
- **CO₂:** Dióxido de Carbono
- **CPA:** Célula Presentadora de Antígeno
- **CsA:** Ciclosporina A
- **CTLA-4:** Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos
- **CV:** Carga Viral
- **CXCL10:** Proteína 10 inducida por Interferón- γ
- **Cy5:** Ficoeritrina Cyanina 5
- **DAG:** Diacilglicerol
- **DC:** Células Dendríticas
- **DCm:** Células Dendríticas mieloides
- **DCp:** Células Dendríticas plasmocitoides
- **DC-SIGN:** Molécula-de-agarre-3 de adhesión intercelular específica de la célula dendrítica

- **DEPC:** Dietilenoipirocarbonato
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **DNAc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **dNTP:** Desoxirribonucleotidos Trifosfato
- **dsRNA:** RNA de doble cadena
- **E:** Estructural
- **EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético
- **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- **FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas
- **FITC:** Fluoresceína
- **H₂O:** Agua
- **HCl:** Ácido Clorhídrico
- **HLA:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad en humano
- **ICOS:** Molécula coestimuladora inducible
- **IFN:** Interferón
- **Ig:** Inmunoglobulina
- **IL:** Interleuquina
- **IL-7R:** Receptor de IL-7
- **IMC:** Índice de Masa Corporal
- **IMF:** Intensidad Media de Fluorescencia
- **IP:** Infección Persistente
- **IP₃:** Inositol trifosfato
- **IPS-1:** Estimulador-1 del Promotor de Interferón
- **IQR:** Rango Intercuartil
- **IR:** Infección Resuelta
- **IRES:** Sitio de entrada interno del ribosoma
- **IRF:** Factor Regulador del Interferón
- **ISG:** Genes estimulados por Interferón
- **ITAM:** Motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina
- **ITIM:** Motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina
- **ITSM:** Motivo de cambio del inmunorreceptor basado en tirosina
- **JAK:** Janus Quinasa

- **JNK:** Quinasa C-jun N-terminal
- **LCMV:** Virus de la Linfocoriomeningitis Murina
- **Log:** Logaritmo en base 10
- **L-SIGN:** Integrina molécula-3-de-agarre de adhesión intercelular específica del hígado/ganglio linfático
- **MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos
- **Mcl-1:** Secuencia-1 de la leucemia de célula mieloide
- **MIP-1:** Proteína 1 quimiotáctica para monocitos
- **NF-κB:** Factor nuclear κB
- **NK:** Células Natural Killer
- **NKT:** Células Natural Killer T
- **NS:** No Estructural
- **OAS:** 2'-5'-Oligoadenilato Sintetasa
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **ORF:** Marco de lectura abierto
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PD-1:** Molécula de muerte programada-1
- **PD-L1:** Ligando de PD-1
- **PE:** Ficoeritrina
- **Pent⁺:** Células CD8⁺ Pentámero⁺
- **PKC:** Proteína Quinasa C
- **PKR:** Proteína quinasa dependiente de RNA
- **PP2A:** Proteína fosfatasa 2
- **PTK:** Protein-tirosin-quinasa
- **RE:** Retículo Endoplásmico
- **r-HDL:** Receptor de Lipoproteínas de alta densidad
- **RHV-1:** Región Hipervariable 1
- **RIG-I:** Gen I inducible por ácido retinoico
- **RIP:** Proteína 1 que interactúa con el receptor
- **r-LDL:** Receptor de Lipoproteínas de baja densidad
- **RNA:** Ácido Ribonucleico

- **RNAasa L:** Endoribonucleasa L
- **rpm:** Revoluciones por minuto
- **RT:** Retrotranscripción
- **RVS:** Respuesta Viroológica Sostenida
- **SHP-2:** Proteína 2 con homología a Src
- **SOCS:** Supresor de la señal de citoquinas
- **SRB-I:** Recogedor clase B tipo I
- **STAT:** Transductores de la Señal y Activadores de la Transcripción
- **STF:** Suero de Ternera Fetal
- **Ta:** Temperatura ambiente
- **TAP:** Transportador asociado al Procesamiento del Antígeno
- **TBE:** Tris Buffer EDTA
- **TCR:** Receptor de la Célula T
- **Th:** Célula T helper
- **TIM:** Motivo de Interacción con TRAF
- **TLR:** Receptor tipo Toll
- **T_{MC}:** Células T de memoria central
- **T_{ME}:** Células T de memoria efectora
- **TNF- α :** Factor de Necrosis Tumoral alfa
- **TNF-R:** Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
- **TRAF:** Factor Asociado al Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
- **Treg:** Células T reguladoras
- **TRIF:** Dominio Toll/IL-1R que contiene el adaptador inductor de IFN- β
- **UI:** Unidades Internacionales
- **UTR:** Región no Traducida
- **VEB:** Virus de Epstein-Barr
- **VHB:** Virus de la Hepatitis B
- **VHC:** Virus de la Hepatitis C
- **VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- **ZAP:** Proteína asociada Z
- **Z-VAD-FMK:** Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone

ÍNDICE

RESUMEN **i-iii**

ABREVIATURAS **iv-vii**

ÍNDICE **viii-xii**

I. INTRODUCCIÓN **1-33**

1. FUNDAMENTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR VHC

- 1.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN 2
- 1.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL VHC 3
- 1.3. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VHC 3-4
- 1.4. TRATAMIENTO ANTIVIRAL 5

2. VIROLOGÍA DEL VHC

- 2.1. ESTRUCTURA DEL VHC 5-6
- 2.2. CICLO REPLICATIVO DEL VHC 7-8

3. RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR VHC

- 3.1. RESPUESTA INNATA 9-14
 - 3.1.1. Interferón Tipo I 9-11
 - 3.1.2. Células Natural Killer y Natural Killer T 11-12
 - 3.1.3. Células Dendríticas 12-14
- 3.2. RESPUESTA ADAPTATIVA 14-18
 - 3.2.1. Respuesta Humoral 14-15
 - 3.2.2. Respuesta Celular 15-18
 - 3.2.2.a. Células T CD4⁺ helper 15-17
 - 3.2.2.b. Células T CD8⁺ citotóxicas 17-18
- 3.3. IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA CD8⁺ VIRUS ESPECÍFICA EN EL CONTROL VIRAL 18-26
 - 3.3.1. Cinética de las células T CD8⁺ virus específicas durante la infección 19-21
 - 3.3.2. Interacción entre la molécula HLA-I/Péptido y el TCR 21-22
 - 3.3.3. Moléculas Coestimuladoras 22-26

4. LA MOLÉCULA PD-1 COMO INDUCTOR DE ANERGIA EN LA RESPUESTA CITOTÓXICA.	
4.1. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1	26-27
4.2. PAPEL DE PD-1 EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VIRUS NO CITOPÁTICOS	27-28
5. PAPEL DE LA VÍA IL-7/CD127 EN EL DESARROLLO DE APOPTOSIS	
5.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE CD127	30-32
5.2. PAPEL DE CD127 EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VIRUS NO CITOPÁTICOS	33
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34-36
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37-54
1. DISEÑO	
1.1. TIPO DE ESTUDIO	38
1.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO	38
1.3. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS	
1.3.1. Criterios de admisión en el estudio	38
- Criterios de inclusión	38-39
- Criterios de exclusión	39
1.4. VARIABLES DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DEL ESTUDIO	40
1.5. COVARIABLES	41-42
1.6. OTRAS VARIABLES	42
2. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1. SUJETOS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO	42
2.2. RECOGIDA DE MUESTRAS Y DATOS CLÍNICOS	43-44
2.2.1. Procesamiento de las muestras de sangre periférica	44
2.2.2. Procesamiento de las muestras de biopsia hepática	44
2.3. ESTUDIO VIROLÓGICO	45
2.4. TIPAJE DE HLA-A2	45
2.5. TINCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES CON AC ANTI-CD8 Y CON COMPLEJOS PENTAMÉRICOS HLA-A2/ PÉPTIDO	46-47
2.6. PRODUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES	48

	<u>Páginas</u>
2.7. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS FRENTE AL VHC	48-49
2.8. PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN- γ	49-50
2.9. EVALUACIÓN DE MUTACIONES DE ESCAPE	50-52
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	
3.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	52
3.2. ESTADÍSTICA INFERENCIAL	53
3.3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	53-54
 IV. RESULTADOS.....	 55-74
1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE RECUENTO DE CÉLULAS T CD8 ⁺ NS ₃₁₄₀₆₋₁₄₁₅ , NS ₃₁₀₇₃₋₁₀₈₁ Y CORE ₁₃₂₋₁₄₀ ESPECÍFICAS	56-57
2. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO	
2.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS GRUPOS COMPARADOS	58-59
2.2. FRECUENCIA DE CÉLULAS CD8 ⁺ PENTÁMERO ⁺	60-61
2.3. EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE SUPERFICIE PD-1/CD127 EN CÉLULAS CD8 ⁺ PENTÁMERO ⁺	61-64
2.4. FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS CD8 ⁺ PENTÁMERO ⁺	65-69
2.4.1. Capacidad de proliferación tras el encuentro antigénico.....	65-66
2.4.2. Capacidad de producción de IFN- γ por las células CD8 ⁺ Pentámero ⁺ tras el encuentro antigénico. Correlación con la expresión de PD-1 y CD127.....	66-67
2.4.3. Fenotipo de las células CD8 ⁺ Pentámero ⁺ tras estimulación específica <i>in-vitro</i>	68-69
2.5. RELACIÓN ENTRE FENOTIPO PD-1/CD127 DIRECTAMENTE <i>EX-VIVO</i> Y CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN	69-71
2.6. BLOQUEO DE LAS VÍAS DE ANERGIA Y APOPTOSIS	72-74
2.6.1. Bloqueo de la vía PD-1/PD-L1	72-73
2.6.2. Inhibición de la apoptosis	73-74

	<u>Páginas</u>
V. DISCUSIÓN.....	75-87
VI. CONCLUSIONES	88-89
VII. APÉNDICES	90-98
1. INDICE DE GRÁFICOS	91-93
2. ÍNDICE DE TABLAS	93
3. PUBLICACIONES	94-97
4. FINANCIACIÓN	97-98
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	99-124

I. INTRODUCCIÓN

1. FUNDAMENTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR VHC

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus RNA de cadena simple, hepatotropo, no citopático, perteneciente a la familia *Flaviviridae* género Hepacivirus (1). El VHC causa una enfermedad infecciosa que afecta principalmente al hígado. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 3% de la población mundial (alrededor de 170 millones de personas) (2) son portadores crónicos de la enfermedad (3).

1.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN

La infección por el VHC tiene una distribución universal, aunque su prevalencia varía de unos países a otros en función del mecanismo de transmisión predominante en cada uno de ellos.

En España la prevalencia de anticuerpos (Ac) anti-VHC, que indica la extensión de la infección, oscila entre un 1.6% y un 2.6% en población general (4-7) lo que permite calcular que en España existen entre 480.000 y 760.000 personas infectadas por el VHC (8). Esta prevalencia es superior a la observada en países centroeuropeos, pero similar a la detectada en estudios efectuados en el norte de Italia (Fig.1).

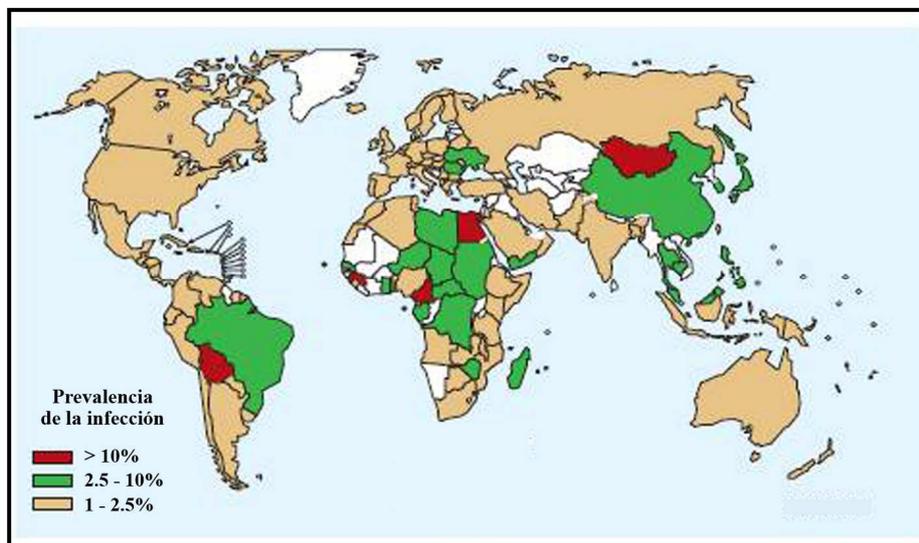


Fig. 1. Distribución mundial de la infección por VHC.
Figura reproducida y adaptada con el permiso de Abbott Laboratories SA, España.

1.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL VHC

El VHC se transmite por vía sexual y parenteral. En Estados Unidos la principal vía de transmisión es la parenteral. Según un análisis realizado en este país para evaluar los factores de riesgo asociados a nuevos casos de infección por VHC, alrededor de un 60% de los infectados presentaban antecedentes de drogadicción por vía intravenosa, en un 10% las causas habían sido las transfusiones de sangre o hemoderivados. La transmisión por vía sexual se calculó en un 15% (9), el

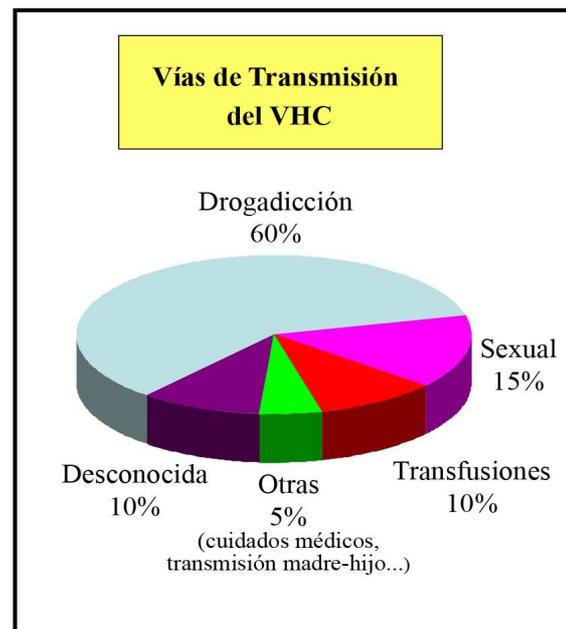


Fig. 2. Vías de transmisión de la infección por VHC

riesgo global de transmisión al recién nacido de una madre infectada era del 5% (10) y en un 10% de los casos la causa de la infección no se identificó (Fig.2).

1.3. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VHC

La infección crónica por el VHC es una enfermedad de baja mortalidad durante las primeras décadas de evolución. Tras la infección aguda, el virus es capaz de cronificarse en el 50-80% de los casos (11, 12). Existen una serie de factores que condicionan el riesgo de cronificación, como son el sexo (13), la raza (14), la edad del sujeto en el momento de contraer la infección (15) y el desarrollo de síntomas en la infección aguda.

De todos los sujetos infectados en los que el virus se cronifica, sólo un 20% desarrolla cirrosis hepática en un plazo de entre 15 a 20 años (16, 17). Sin embargo, no todos los individuos evolucionan de la misma manera ni con la misma rapidez hacia fases más avanzadas de la hepatopatía. Se han señalado varios factores que pueden acelerar el curso de progresión de la fibrosis en sujetos infectados (18, 19). La mayoría hacen referencia a características del huésped, como son: edad superior a 40 años en el momento que se contrajo la infección (20), sexo masculino (21, 22), consumo de alcohol (23) y coinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (24).

La supervivencia tras el diagnóstico de cirrosis compensada es superior al 90% durante los 10 primeros años. Sin embargo, empeora de forma significativa una vez se presenta la primera descompensación clínica o se diagnostica un carcinoma hepatocelular (CHC), reduciéndose la supervivencia al 50% a los 5 años (25). Una vez alcanzada la fase de cirrosis, la probabilidad acumulada de aparición de descompensación clínica oscila entre un 10-20% a los 5 años. Las descompensaciones más frecuentes son la aparición de CHC, alrededor de un 20% y el desarrollo de ascitis, en un 17%. Entre los factores relacionados con un mayor riesgo de descompensación se encuentran el consumo de alcohol, la función hepatocelular en el momento del diagnóstico y la edad del paciente (26, 27).

El riesgo de desarrollo de CHC oscila entre un 1-4% anual entre los pacientes con cirrosis hepática (28, 29). Aproximadamente un tercio de las muertes relacionadas con el VHC son secundarias a la aparición de CHC, existiendo un paralelismo entre la supervivencia del sujeto con cirrosis y la probabilidad de desarrollo de CHC (Fig.3).

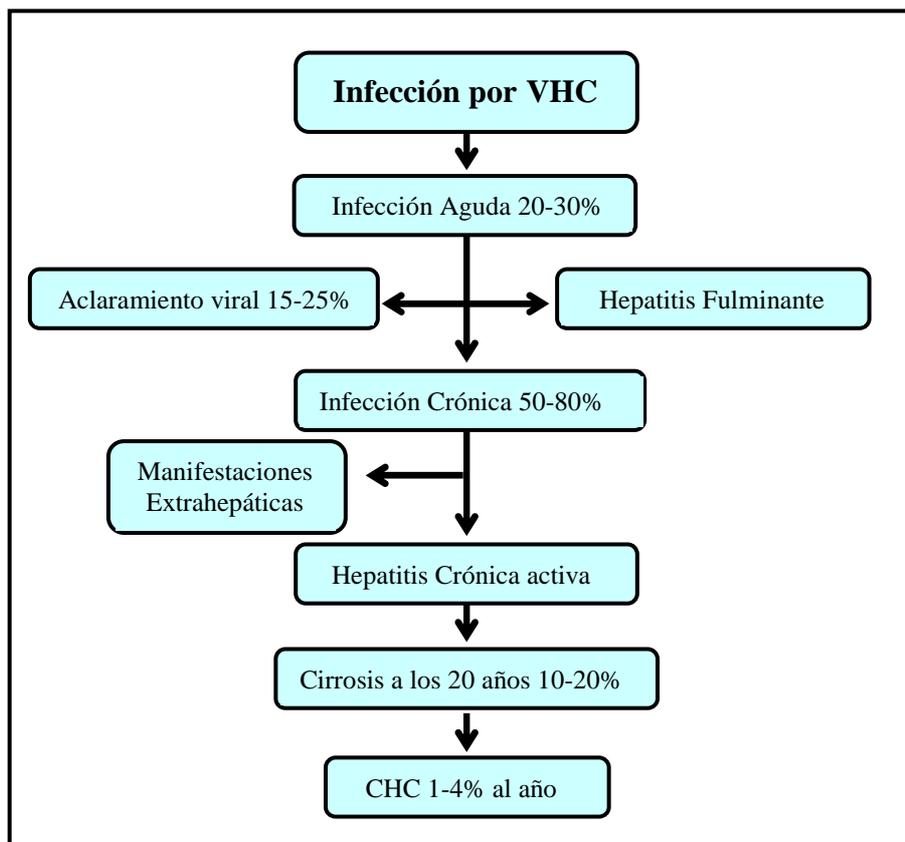


Fig. 3. Representación esquemática de la historia natural de la infección por VHC. Figura reproducida y adaptada de: *The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection*. Chen SL, Morgan TR. Int. J. Med. Sci. 2006,3(2):47-52, con permiso de Ivyspring.

1.4. TRATAMIENTO ANTIVIRAL

El tratamiento actual de la hepatitis C consiste en la terapia conjunta con dos fármacos, el interferón (IFN) pegilado α -2a o α -2b y la ribavirina. En sujetos infectados con los genotipos 2 y 3 del VHC el tratamiento tiene una duración de 6 meses y en los sujetos infectados con genotipo 1 el tratamiento se prolonga hasta los 12 meses. En el caso de los genotipos 4, 5 y 6 no existen datos suficientes, aunque se recomienda seguir las mismas pautas de tratamiento que en los sujetos con el genotipo 1 de VHC.

Se considera que el tratamiento ha tenido éxito cuando hay una respuesta virológica sostenida (RVS) caracterizada por la presencia de una carga viral (CV) indetectable 6 meses después de acabar el mismo. En sujetos con infección crónica con genotipo 1 del VHC el tratamiento tiene éxito en el 40% de los casos aproximadamente, mientras que en sujetos infectados con los genotipos 2 y 3 el éxito del tratamiento se produce en el 80% de los pacientes tratados. (30-33). Existen un gran número de fármacos contra el VHC que se encuentran en distintas etapas de desarrollo clínico. El objetivo de las nuevas estrategias terapéuticas es aumentar la eficacia, disminuir el tiempo del tratamiento y aumentar la tolerancia. En la actualidad existen estudios en fase III con inhibidores de las proteasas NS3/4 (telaprevir y boceprevir). Éstos fármacos podrían ser aprobados a finales de 2011 y su combinación con el IFN pegilado y ribavirina podría cambiar radicalmente las estrategias de tratamiento en sujetos no respondedores con genotipo 1 del VHC (34, 35).

2. VIROLOGÍA DEL VHC

2.1. ESTRUCTURA DEL VHC

El VHC es un virus de pequeño tamaño que tiene un diámetro de 55-65nm recubierto por una membrana lipoproteica (36). El genoma del VHC está formado por una cadena única de RNA de polaridad positiva que contiene 9.600 nucleótidos que codifican para una poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos.

El genoma del VHC contiene dos regiones no codificantes muy conservadas (UTR, Región no Traducida) en la región 5' y 3' (37) que flanquean una región codificante (ORF, Marco de lectura abierto) (38). La región 5' UTR adopta una compleja estructura secundaria y contiene una zona de anclaje al ribosoma de la célula huésped, conocida como IRES (sitio de entrada interno del ribosoma) la cual parece jugar un papel clave en la replicación viral (36).

En el extremo 5' se encuentran las regiones que codifican para proteínas estructurales del virus. La proteína del *core* es la que forma la nucleocápside, dentro de la cual se encuentra el RNA viral y las proteínas E1 y E2 que están implicadas en la unión a los receptores celulares y su posterior fusión, es decir, determinan la entrada del virus en la célula huésped (39).

El grupo de proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4, NS5A y NS5B) se localiza en el extremo 3' y funcionan como proteasa, helicasa y polimerasa, acciones necesarias para la replicación viral (40) (Fig.4).

El VHC presenta una gran heterogeneidad en su genoma. Esto es debido a la elevada tasa de errores de la RNA polimerasa (10^{-5} errores/nucleótido) y a la ausencia de actividad correctora de la misma (41). Ésta es considerada la razón principal por la que se generan los distintos genotipos y cuasiespecies (42, 43). El genotipo hace referencia a la heterogeneidad existente entre las diferentes cepas de VHC aisladas en distintas áreas geográficas y refleja la acumulación de mutaciones durante un largo periodo de la evolución del virus. Los análisis filogenéticos han demostrado la presencia de al menos 6 genotipos diferentes.

Las cuasiespecies son la traducción de la heterogeneidad surgida durante la replicación viral en la persona infectada. El análisis del virus en un sujeto revela la presencia de múltiples variantes similares, pero con algunas diferencias en su secuencia nucleotídica. El extremo amino terminal de la proteína E2 es el que presenta mayor variabilidad, por lo que recibe el nombre de región hipervariable 1 (RHV-1).

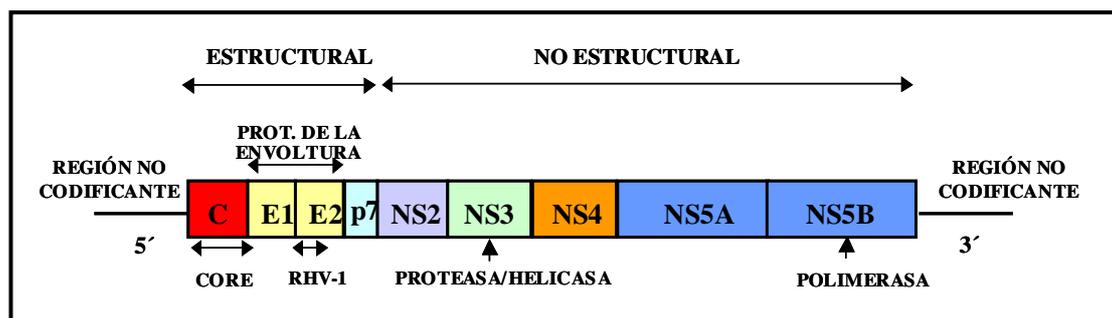


Fig. 4. Estructura genómica del VHC.
Prot: Proteína. RHV-1: Región hipervariable

2.2. CICLO REPLICATIVO DEL VHC

El VHC replica principalmente en hepatocitos (44), aunque se ha detectado genoma y antígenos virales en otras células del hígado, como en las células de Kupffer y en células endoteliales (45). También se ha detectado el VHC en células mononucleadas de sangre periférica (linfocitos T y B) durante la infección, en células de los nódulos linfáticos y en células epiteliales del tracto gastrointestinal y de cerebro (46, 47).

Fuertes evidencias confirman que la proteína CD81, miembro de las tetraspaninas, está implicada en la internalización del virus en la célula (48), así como otras moléculas entre las que se encuentra el receptor recogedor clase B tipo I (SRB-I), que también es el receptor de lipoproteínas de alta y baja densidad (r-HDL y r-LDL) (49). La asociación con las apoproteínas ApoB y ApoE del sujeto, sugiere que quizá la entrada del virus a la célula se realice mediante su unión a estas lipoproteínas (50).

Otras moléculas que podrían estar implicadas en la internalización del virus en la célula son las lectinas L-SIGN y DC-SIGN (51), expresadas en células endoteliales hepáticas y en células dendríticas (DCs) respectivamente. También se encuentran implicados en este proceso el heparán sulfato presente en los glucosaminoglicanos de la superficie celular (52), el receptor de asialoglicoproteína (53) y las proteínas claudina-1 y ocludina que forman parte de uniones estrechas presentes en las células hepáticas (54). Varios estudios demuestran la existencia de un complejo formado por la unión entre la proteína claudina-1 y CD81. Este complejo resulta ser esencial en la internalización del VHC en la célula, puesto que Ac anti-CD81 y anti-claudina-1 inhiben la entrada del VHC en la célula (55). Además de estas proteínas, estudios recientes otorgan un papel importante al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la internalización del VHC. La actividad del EGFR es esencial para la formación del complejo CD81-claudina-1 y en los procesos de fusión celular. Se ha demostrado que la inhibición de la actividad del EGFR mediante la administración del inhibidor erlotinib, bloquea tanto la entrada del VHC a la célula como su difusión si se administra después de la infección (datos presentados en el último congreso de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado, Berlin 2011, no publicados).

Tras la endocitosis en la célula, el RNA viral es liberado al citoplasma dirigido por el IRES de la 5' UTR. La transcripción y el ensamblaje del VHC tiene lugar en una estructura denominada "*membranous webs*", formada por membranas mitocondriales, del retículo endoplásmico (RE) y gotas de lípidos ("*lipid drops*") (56). Las proteínas NS4B y NS5A del VHC están implicadas en la formación de esta red membranosa.

Dentro de esta estructura, el RNA⁺ es copiado a un RNA⁻ intermediario, que va a servir de molde para la síntesis de la progenie de RNA⁺. Estos moldes de RNA⁺ son utilizados para la síntesis de nuevos RNA⁻, para la traducción y para la encapsidación (57) (Fig.5).

En el ensamblaje del VHC tiene una especial importancia la proteína del *core*, que se acumula en la red membranosa induciendo el reclutamiento de las demás proteínas (58-60).

Además, se han descrito varios factores de la célula huésped que participan en el ensamblaje del VHC. Entre ellos destaca la proteína ApoE, que además de estar implicada en la entrada del VHC a la célula, interacciona con NS5A y es requerida en las primeras etapas de ensamblaje (61, 62).

La ruta de señalización MAPK-ERK1/2 también está involucrada en el ensamblaje y la liberación de los nuevos viriones (Pietschman et al, Comunicación personal).

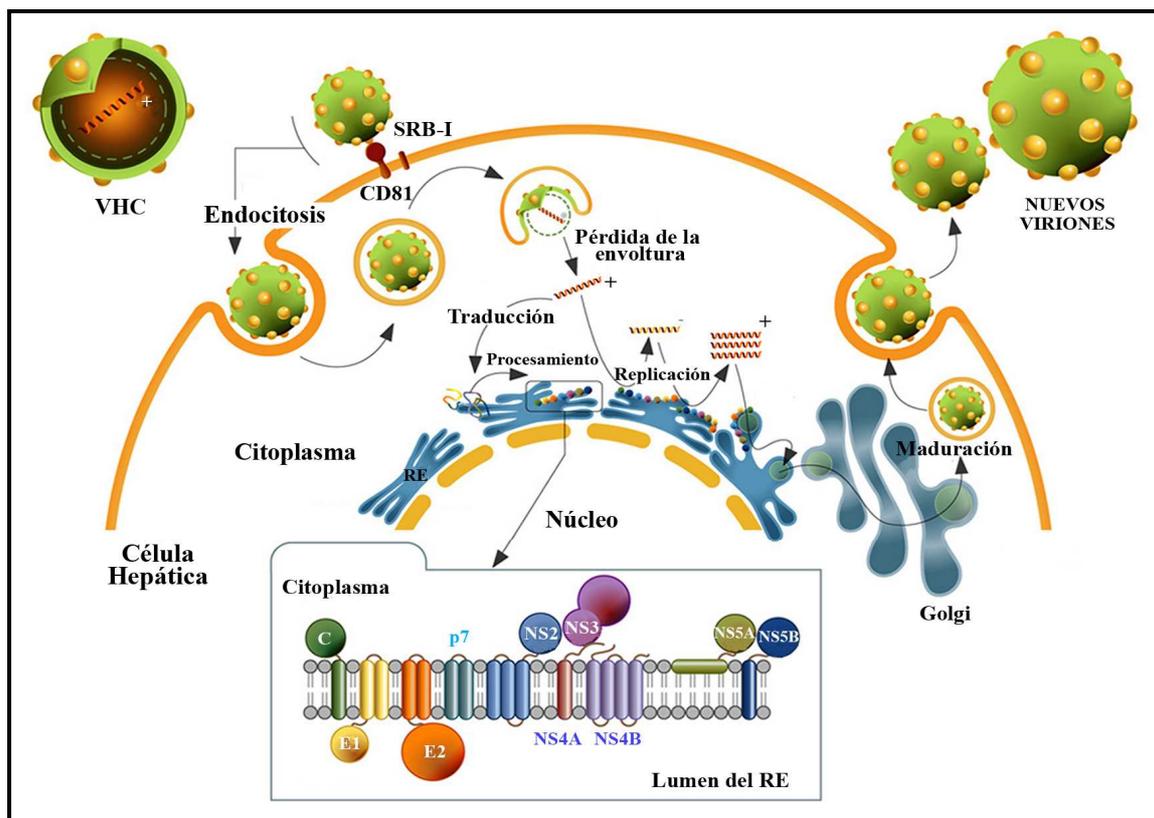


Fig. 5. Ciclo vital del VHC.
Figura reproducida y adaptada con permiso de Tibotec©.

3. RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR VHC

La interacción entre el sistema inmune del huésped y la capacidad del virus infectante para evadir esta respuesta determina el grado de persistencia de la infección. Los virus no citopáticos se caracterizan por presentar una baja contagiosidad, pero por tener una elevada capacidad de persistencia y por producir escaso daño al huésped, lo que permite su supervivencia y cronificación. El VHC es un ejemplo de virus no citopático que ha alcanzado un equilibrio entre la respuesta inmune del huésped y la replicación viral que garantiza la supervivencia de ambos.

A continuación, se describen los mecanismos de defensa antiviral del huésped en la infección por VHC, con especial detenimiento en el papel de las células CD8⁺ VHC específicas. Estas células, también denominadas células citotóxicas, son esenciales en el control de virus no citopáticos que, como el VHC, son capaces de escapar con facilidad al control por el sistema inmune innato. La respuesta celular citotóxica reconoce a las células infectadas y las destruye mediante vías citolíticas, siendo también capaz de eliminar al VHC por mecanismos no citopáticos. Es por ello que este trabajo de investigación se centra en el estudio de la respuesta celular citotóxica específica.

3.1. RESPUESTA INNATA

Cuando se produce una infección por un agente viral, la primera línea de defensa consiste en una rápida respuesta no específica en la que participan diferentes proteínas y células, como la cascada del complemento, IFN- α , macrófagos, células Natural Killer (NK) y Natural Killer T (NKT). El VHC puede interferir en alguno de estos mecanismos inmunes para favorecer su supervivencia.

3.1.1. Interferón Tipo I

Durante la primoinfección por VHC, el primer mecanismo de respuesta inmune se desencadena mediante la producción de IFN- β por parte de los hepatocitos infectados. Se inicia por dos “*pattern recognition receptors*”, el Toll like receptor-3 (TLR3) que reconoce RNA de doble cadena (d_s RNA) en los endosomas (63) y el receptor RNA-helicasa (RIG-I) que reconoce el motivo de poliuridina del extremo 3' UTR del VHC en el citoplasma (64) (Fig.6).

Tras la estimulación del TLR3 por el VHC se recluta la molécula Toll-IL-1 (TRIF) y por otro lado RIG-I recluta el estimulador-1 del promotor de interferón (IPS-1). Ambos procesos hacen que se fosforile el factor de transcripción IRF-3 que juega un papel importante en la activación del promotor de IFN- β iniciándose su síntesis (65, 66).

Una vez sintetizado y secretado, el IFN- β se une a los receptores de IFN- α/β de las células infectadas vecinas, activando la ruta de señalización de JAK/STAT (Janus Quinasa/ Transductores de la Señal y Activadores de la Transcripción) que conduce a la inducción de genes estimulados por IFN (ISGs), como el sistema OAS1/RNAsa L, que degrada el RNA viral y celular (67) y el RNA específico ADAR1, que desestabiliza las estructuras secundarias del RNA viral (68). Otros ISGs son el P56 (69) y la proteína quinasa R (PKR) (70) que inhiben la traducción del RNA viral (Fig.6).

Por tanto, la infección por VHC es un buen inductor de la producción de IFN tipo I (71), aunque a su vez este virus es capaz de atenuar el efecto de esta citoquina a diferentes niveles. En primer lugar se ha observado que la proteína NS3/4A del VHC, cuando se sobreexpresa en cultivos celulares, desestabiliza la unión de TRIF (72) e IPS-1 (73) con sus receptores (TLR3 e RIG-I). También la proteína del *core* sobre expresada en cultivos celulares interfiere con la ruta de señalización JAK/STAT y por tanto con la expresión de ISG, mediante la activación de STAT1 y favoreciendo su degradación (74), lo que induce la expresión del supresor de la señal de citoquinas 3 (SOCS3). Esta proteína inhibe la ruta JAK/STAT (75) e induce a su vez la expresión de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la cual reduce la actividad transcripcional del ISG3 (76). Por otro lado, la proteína VHC NS5A inhibe a la oligoadenilato sintasa (OAS) lo que favorece la expresión de la interleuquina (IL) 8 (IL-8) que a su vez inhibe la expresión de todos los ISG (77). Además, esta proteína del VHC forma heterodímeros con PKR inhibiendo su función (78). Por ultimo, la proteína de la envoltura E2 también actúa inhibiendo a la PKR (79) (Fig.6). Por tanto, aunque la infección por VHC induce la expresión de los genes de los interferones tipo I, el VHC es bastante eficaz en bloquear las cascadas intracelulares que se activan tras la interacción de los interferones tipo I con su receptor, lo que finalmente provoca que no se expresen adecuadamente los genes inducidos por IFN.

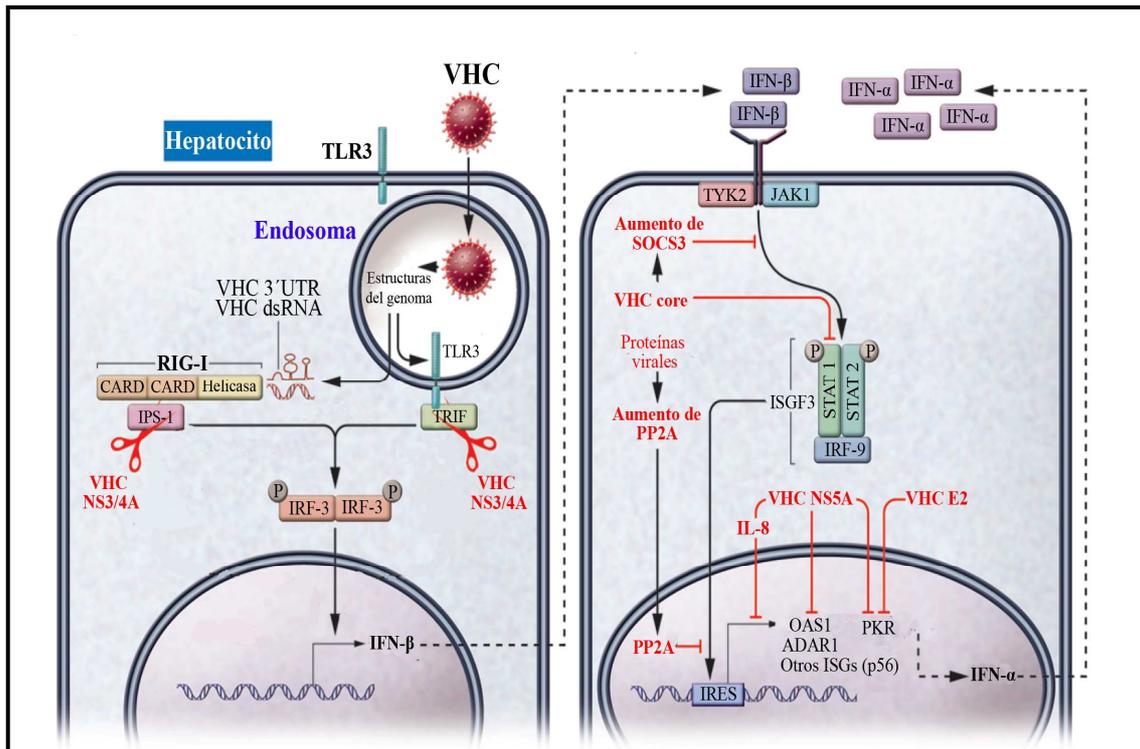


Fig. 6. Atenuación de la respuesta inmune innata mediada por IFN- β por parte de las distintas proteínas del VHC. Figura reproducida y adaptada de: *Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence*. Rehermann B. *J. Clin. Invest.* 119:1745–1754 (2009), con el permiso de la American Society for Clinical Investigation.

3.1.2. Células Natural Killer (NK) y Natural Killer T (NKT)

Las células NK y NKT juegan un importante papel en diferentes enfermedades hepáticas, siendo en estos casos, más abundantes en el hígado infectado que en sangre periférica (80).

La actividad de las NK es controlada por receptores (CD16, NKG2D, CD69, CD2) que median su activación o inhibición según la presencia o ausencia de infección en la célula diana. También son activadas estas células por el IFN tipo I (IFN- α/β) producido en etapas tempranas de infecciones virales y por la IL-12 sintetizada por macrófagos y DCs.

Las células NK ejercen varias funciones efectoras en las primeras horas tras la infección. Primero liberan su contenido granular induciendo muerte celular por apoptosis y después, producen citoquinas, como IFN- γ , factor de necrosis tumoral (TNF- α) y otras quimioquinas como MIP-1 α , MIP-1 β e IP-10 (81).

Las células NKT expresan marcadores tanto de células NK (CD56), como de células T (CD3). Aunque los ligandos de los receptores de las células NKT todavía no

se han identificado, se sabe que estas células ejercen funciones citotóxicas y producen IFN- γ e IL-4.

Las células NK y células NKT desempeñan un importante papel en la respuesta inmune innata contra varias infecciones virales, como es el caso de la infección por CMV (82). Estas células ejercen su acción antiviral a través de mecanismos citotóxicos no HLA restringido y la producción de IFN- γ (82). Además, juegan un papel esencial sobre las DCs, permitiendo su maduración y favoreciendo el desarrollo de una respuesta Th1/Tc1 (83). En modelos de chimpancé con infección aguda por el VHC o VHB (84, 85) los datos sugieren que estos virus pueden bloquear las funciones de las células NK y NKT evitando así la producción de citoquinas antivirales como el IFN- γ . Concretamente el VHC ha desarrollado estrategias para bloquear las funciones de las células NK y NKT e impedir su eliminación durante la primoinfección por estas células. Uno de los mecanismos utilizados para alterar la actividad de estas células se debe a la proteína E2 del VHC, que interacciona con la molécula CD81 de las células NK bloqueando su activación y evitando la liberación de IFN- γ , lo cual impediría la maduración adecuada de las DCs (86, 87).

3.1.3. Células Dendríticas (DCs)

Las DCs son células presentadoras de antígenos (CPAs) profesionales que se activan a través de la respuesta inmune innata y sirven de nexo entre ésta y la respuesta inmune adquirida. Estas células son esenciales para captar antígenos virales en el lugar de la infección y presentarlos posteriormente a las células T naïve del sistema adaptativo para su activación.

Existen dos tipos de DCs:

- *DCs mieloides (DC_m)*: estas células son responsables de la captación y procesamiento de antígenos. Estos antígenos una vez procesados son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) para la activación de las células T. Las *DC_m* producen citoquinas inflamatorias, como la IL-12 que facilita la inducción de la respuesta T helper (Th) 1 (Th1).

- *DCs plasmocitoides (DC_p)*: se caracterizan por su alta producción de IFN- α tras ser estimuladas. Estas células ejercen una importante actividad inmunomoduladora sobre la célula T activada y sobre las células infectadas.

En la infección crónica por VHC, existe un descenso en la producción de IL-12 por las DCm (88, 89), y una reducción en la frecuencia y habilidad para producir IFN- α de las DCp (90). Este cambio en el patrón de citoquinas, inducido por el virus, podría favorecer el cambio de respuesta inmune de Th1 a Th2, siendo ésta ineficaz para eliminar el virus (91).

Los mecanismos por los que el virus induciría estas alteraciones no se conocen con exactitud, aunque estudios *in-vitro* muestran cómo algunas proteínas del VHC (core, NS3, NS4) pueden interactuar con el TLR2 de monocitos, lo que induce la producción de citoquinas típicas de la respuesta Th2, como la IL-10. La IL-10 inhibe la producción de IL-12 e IFN- α por parte de las DCm y DCp respectivamente (92). Este descenso en la producción de citoquinas tipo I produce una inadecuada activación de las células NK y NKT. El descenso en la producción de IL-12 por las DCm, junto a una presentación deficiente de los antígenos virales conduce a una activación inadecuada de las células T CD4⁺ y CD8⁺. También interfiere en la correcta activación de las células T la alteración en la producción de IFN- α por las DCp (Fig.7).

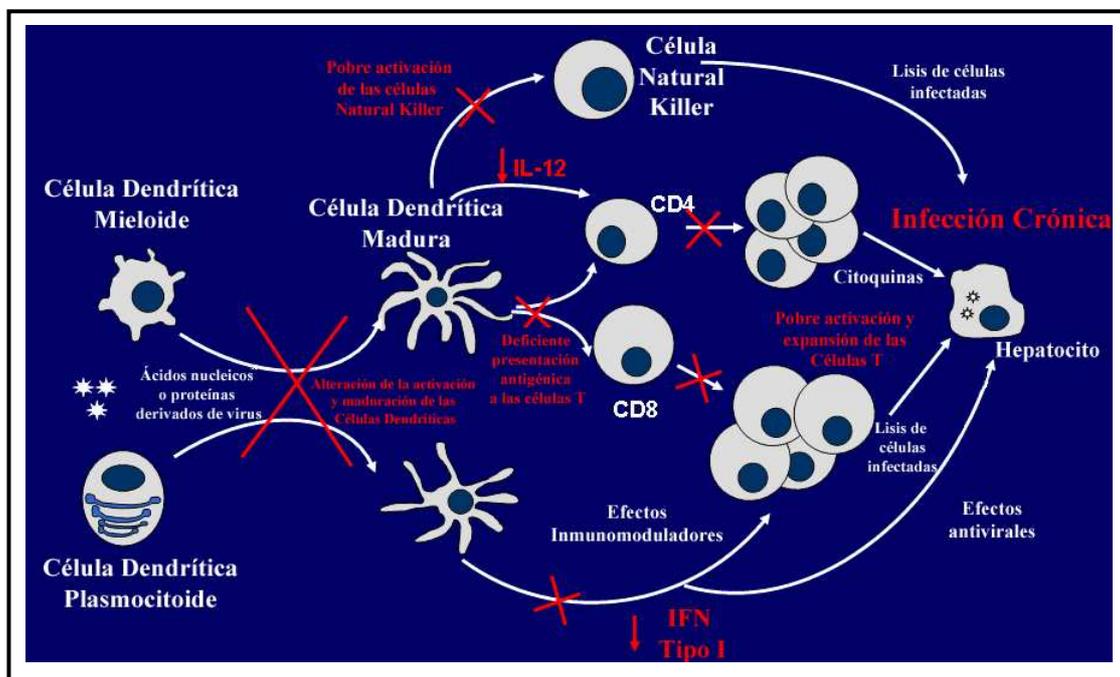


Fig. 7. Mecanismos utilizados por el VHC para interferir en la función de las células dendríticas. Figura reproducida con el permiso de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado.

Por tanto, la respuesta innata desarrollada en el huésped es incapaz de controlar la infección por VHC, siendo necesaria la participación de la respuesta adaptativa para intentar conseguir el control. Esta respuesta es esencial en la infección por VHC como ocurre con otras infecciones no citopáticas, como son la infección por virus de la linfocoriomeningitis murina (LCMV) o VHB (93).

3.2. RESPUESTA ADAPTATIVA

La respuesta adaptativa constituye un mecanismo de defensa más avanzado que se caracteriza por su especificidad. Otra propiedad de la respuesta adaptativa es la memoria celular, que constituye la capacidad de responder con una eficacia mejorada ante un segundo encuentro con el patógeno.

La respuesta inmune adaptativa se divide en respuesta humoral (mediada por Ac producidos por las células B) y respuesta celular (mediada por las células T CD4⁺ y CD8⁺).

3.2.1. Respuesta Humoral: Está mediada por Ac, que son producidos y liberados dentro del torrente circulatorio por las células plasmáticas que derivan de las células B tras su activación. Sin embargo, salvo excepciones, no pueden entrar en tejidos sólidos, lo que impide su actuación en órganos infectados. Los Ac reconocen determinantes conformacionales en proteínas, carbohidratos y partículas antigénicas del torrente sanguíneo opsonizándolos para que los macrófagos los capten y los presenten a las células T. También se unen a estas estructuras moleculares del patógeno bloqueando su entrada a la células huésped y previniendo la liberación de nuevos viriones (94).

En la infección por VHC, la mayoría de los sujetos infectados seroconvierten a las 4 semanas de la primoinfección, detectándose Ac contra proteínas estructurales y no estructurales del virus (95). Sin embargo, el papel de los Ac ha sido cuestionado, ya que no predicen la evolución de la infección, habiéndose descrito casos en los que el virus se ha aclarado en ausencia de los mismos (96).

La respuesta mediada por Ac neutralizantes resulta difícil de evaluar. Recientemente se ha desarrollado un sistema basado en pseudopartículas que llevan unidas las proteínas E1 y E2 (97, 98) y que ha permitido aclarar, en parte, el papel de los Ac. Se ha observado que los primeros Ac producidos por las células B, responden a

la RHV-1 en el extremo amino terminal de la proteína E2. Estos Ac en chimpancés son capaces de neutralizar homólogos del VHC (99, 100).

Sin embargo, mientras que los Ac específicos frente al VHB son habitualmente neutralizantes de forma indefinida, reflejando una protección inmune, la función de los Ac frente al VHC está menos definida, al no aparecer en fases precoces de la enfermedad (101, 102), lo que facilita la aparición de mutaciones de escape (103), convirtiendo a estos Ac en un mecanismo de defensa funcionalmente inoperante.

Por tanto, la respuesta humoral no parece desempeñar un papel importante en el control de la infección del VHC, puesto que los Ac producidos no son capaces de desarrollar una actividad neutralizante del VHC, debido a la rápida variación de los epítomos virales que reconocen.

3.2.2. Respuesta Celular: La respuesta adaptativa celular esta mediada por las células T que se diferencian en el timo y se caracterizan por expresar un receptor clonal de la célula T (TCR), lo que les permite reconocer fragmentos antigénicos presentados por las moléculas HLA de la célula infectada. Las células T se dividen en dos grupos funcionalmente diferentes: los linfocitos CD4 que realizan una función reguladora de la respuesta inmune y los linfocitos CD8 que desarrollan una actividad principalmente citotóxica.

3.2.2.a. - Células T CD4⁺ helper: Estas células reconocen, a través del HLA de clase II, pequeños péptidos de 10-20 residuos de longitud, que han sido procesados de forma endógena a partir de proteínas fagocitadas.

Las células T CD4⁺ colaboradoras (T helper) se ha descrito clásicamente que generan dos tipos de respuesta dependiendo del perfil de citoquinas que secreten (89):

* *Respuesta Th1*: esta respuesta se encuentra mediada por IL-2, IFN- γ y TNF- α . Favorece el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y células T citotóxicas, lo que conduce a la activación de una respuesta inflamatoria (104). Este tipo de respuesta es adecuada ante una infección viral o una enfermedad tumoral.

* *Respuesta Th2*: se encuentra mediada por IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Se encarga de limitar la respuesta mediada por citoquinas Th1 y favorece el desarrollo de la respuesta humoral (105) y el reclutamiento de eosinófilos. Esta respuesta se encuentra involucrada en la producción de Ac, en reacciones inmunoalérgicas y en enfermedades parasitarias.

Estudios que analizan el perfil de citoquinas durante la fase aguda de la infección por VHC demuestran una estrecha relación entre el desarrollo de una respuesta CD4⁺ policlonal, multiespecífica y sostenida y el aclaramiento viral. En estos casos, esta respuesta se caracteriza por presentar un perfil de citoquinas tipo Th1 (106, 107). Sin embargo, en los sujetos en los que la infección se cronifica, se observa una respuesta CD4⁺ escasa y reducida a pocas especificidades y con un perfil de citoquinas Th2 (108, 109).

En resumen, las células T CD4⁺ son muy importantes en la regulación de la respuesta inmune específica y pueden también ejercer un papel antiviral directo a través de las citoquinas que producen.

Otro tipo de célula T CD4⁺ son las células T reguladoras (Treg). Estudios realizados en ratones demostraron la existencia de una población de células capaces de inhibir la activación convencional de las células T periféricas (110).

Las células Treg son capaces de modular la respuesta celular específica contra antígenos propios y ajenos. Las Treg se pueden dividir en dos grupos según el lugar donde se desarrollan. Las células Treg naturales (nTreg) se generan en el timo durante la ontogenia y son responsables del control de las células T autorreactivas previniendo procesos de autoinmunidad. El agotamiento de estas células es capaz de causar enfermedades autoinmunes y el aumento de la respuesta inmune ante antígenos extraños (111). Las células Treg inducidas (iTreg) se desarrollan en el compartimento periférico en condiciones particulares (112-114) y ejercen un papel importante en las enfermedades infecciosas y tumorales evitando una respuesta inmune patológica (115).

Por lo tanto ambas, desarrollan una importante tarea en el mantenimiento de la tolerancia y la homeostasis contra antígenos propios y no propios, siendo de especial importancia el papel que desempeñan en la regulación de la respuesta frente a parásitos (116) y a virus (117).

Las células Tregs se caracterizan por expresar altos niveles de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25), y se definen por la expresión de FOXP3 (“forkhead box 3”). Este factor actúa como regulador del desarrollo y función de las células Treg, siendo su papel principal la modulación de la respuesta de linfocitos T a los estímulos externos, tales como la activación del TCR y la señalización de citoquinas (118).

Varios trabajos han definido el papel de estas células en la infección por VHC. La generación de células Tregs en esta infección es un proceso complejo, inducido por el propio virus como una estrategia evolutiva para escapar del sistema inmune (119) y

para prolongar su supervivencia (120). En este proceso participa el TGF- β , citoquina clave en la generación, expansión y funcionalidad de células Treg (121, 122). El VHC es capaz de sobre-regular la transcripción del gen de TGF- β (123). Concretamente, se ha demostrado que los sujetos con infección crónica por VHC tienen incrementado el número de células Treg. Este hecho se asocia a la alteración de la función de las células T CD8⁺ VHC específicas, ya que la reactividad de las mismas se recupera *in-vitro* tras la depleción de las Treg. Estos datos sugieren que la modulación de las células Treg por el VHC podría funcionar como un mecanismo de persistencia del mismo (124-126).

Recientemente se ha descrito otra población de células CD4⁺, capaz de producir IL-17, que se denomina células Th17. Las Th17 secretan IL-17A, IL-17F y CCL20, expresan altos niveles de CCR6 y CCR4 pero se conoce poco sobre la señal responsable de su reclutamiento al tejido inflamado (127). Las Th17 ejercen un papel protector frente a ciertas infecciones bacterianas y fúngicas en las que promueve la producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, con el consecuente reclutamiento y activación de neutrófilos y macrófagos (128-130). Sin embargo, aunque las funciones inflamatorias de las células Th17 son importantes para el control de infecciones bacterianas, si estas células no son controladas, pueden ocasionar daño tisular, como el observado en algunas enfermedades autoinmunes (131, 132).

El papel de las células Th17 en infecciones virales no está todavía muy claro, aunque un modelo de infección murina por el virus LCMV demuestra que el desarrollo de una respuesta LCMV-específica Th17 conduce a la cronicidad de la infección y al desarrollo de inflamación tisular no específica (133). Además, se ha demostrado que la infección por VHC se asocia con la inducción de células Th17 VHC específicas (134), mecanismo que podría utilizar el VHC para evadir la respuesta inmune del huésped, al favorecer el reclutamiento de un infiltrado inflamatorio no adecuado para el control viral.

3.2.2.b. - Células T CD8⁺ citotóxicas: La respuesta celular citotóxica específica juega un papel central en la patogenia de las infecciones virales no citopáticas y en los procesos de control viral, debido a la capacidad que presentan estas células para reconocer específicamente a la célula infectada (135) y destruirla (136), así como por su habilidad para eliminar el virus por mecanismos no citolíticos (137).

Las células T CD8⁺ antígeno específicas son capaces de reconocer a la célula infectada por medio de la interacción entre su TCR y el HLA de clase I que presenta el

epítopo viral (138) y de esta manera, informa al sistema inmune de la presencia del virus, que de otro modo pasaría inadvertido. Este tipo de comunicación entre la célula efectora y la célula infectada es esencial, puesto que los virus no citopáticos se comportan como verdaderos parásitos intracelulares, que de no ser por la presentación de sus epítomos en el complejo HLA-I nunca serían detectados por las células T citotóxicas.

Las CPAs muestran los epítomos virales a los linfocitos T CD8⁺ naïve con el TCR adecuado, junto a otras señales coestimuladoras apropiadas, en los órganos linfoides secundarios. Esta interacción entre la CPA y la célula T induce su transformación fenotípica de célula naïve a célula efectora con capacidad citotóxica para producir citoquinas tipo-1, para migrar al lugar de la infección y proliferar. Una vez la célula T citotóxica específica es atraída al órgano infectado se produce un segundo encuentro con el antígeno viral, lo que activa sus mecanismos efectores para poder ejercer su función antiviral (139) mediante la producción de citoquinas tipo-1 y la activación de mecanismos citolíticos. Tras la fase efectora, se produce una fase de contracción de la respuesta, después de la cual subsistirá solamente una población de células con fenotipo de memoria-efector, dispuesta a restablecer la respuesta inmune más rápidamente en caso de reencontrarse con la misma infección y posiblemente encargadas de controlar posibles reservorios virales persistentes (140, 141). El fallo en el desarrollo de una adecuada respuesta citotóxica virus específica se asocia a la cronicidad en una infección por un virus no citopático (142).

Tal es la importancia de las células T CD8⁺ antígeno específicas en el control de infecciones no citopáticas, que en la infección murina aguda causada por el LCMV (virus no citopático), cuando el huésped es capaz de controlar el virus, hasta un 50% de las células T CD8⁺ esplénicas son LCMV específicas durante la primoinfección (143).

3.3 IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA CD8⁺ VIRUS ESPECÍFICA EN EL CONTROL VIRAL.

En el caso concreto de la infección por VHC, estudios experimentales demuestran cómo durante la primoinfección, en el momento en que aparece la respuesta citotóxica específica, se produce el control viral, mientras que en ausencia de esta respuesta, la infección se cronifica (144). En estudios observacionales realizados en humanos, se describe que en sujetos que controlan la infección de forma natural se desarrolla una respuesta T CD8⁺ VHC específica vigorosa, policlonal y multiespecífica

temprana (145-149). Sin embargo, en sujetos con infección persistente, esta respuesta se caracteriza por ser débil, oligoclonal y oligoespecífica (150, 151), presenta menor capacidad proliferativa y citotóxica, y se acompaña de bajos niveles de IFN- γ y TNF- β (152-154). Esta respuesta citotóxica específica defectiva no va a conseguir, la eliminación del virus.

3.3.1. Cinética de las células T CD8⁺ específicas durante la infección.

El desarrollo de una respuesta CD8⁺ específica ante una infección viral es un proceso complejo, pudiéndose distinguir tres fases características: la primera consiste en una activación y expansión inicial, a la que le sigue una fase de constricción de la respuesta y muerte, estableciéndose por último una etapa de mantenimiento con el desarrollo de una población de memoria (155) (Fig.8).

Antes de que se produzca la infección, encontramos una población de células T denominadas células T naïve, que son aquellas células que se encuentran circulando por el torrente sanguíneo pero que todavía no han entrado en contacto con el antígeno viral. Estas células se caracterizan por presentar un fenotipo CD45RO⁻, CD28⁺, CCR7⁺, el cual determina que la célula no está activada (156). Cuando las células T naïve entran en contacto con el antígeno, sufren un proceso de proliferación o expansión, diferenciándose en células T efectoras (CD45RO⁺, CD28⁺, CCR7⁻). Estos cambios fenotípicos son esenciales para permitir al linfocito CD8⁺ migrar al lugar de la infección, donde pueden eliminar directamente las células infectadas mediante mecanismos citolíticos y al VHC mediante mecanismos no-citolíticos (157).

La activación de los linfocitos CD8⁺ puede producirse en los órganos linfoides, lo que conduce a la generación de células T efectoras (158) pero también, los linfocitos CD8⁺ pueden migrar a través del sinusoides hepático e interactuar en el hígado con otras células, como pueden ser, las células de Kupffer, DCs, hepatocitos y células endoteliales sinusoidales, que pueden actuar como CPAs. Sin embargo esta activación no se produce de forma adecuada y va a conducir a la apoptosis o anergia de los linfocitos CD8⁺ (158, 159).

Dos o tres semanas después de esta expansión clonal la mayoría (90-95%) de estas células efectoras activadas van a morir por un proceso de apoptosis tras la realización de sus actividades efectoras (143, 155). Las células que no llegan a morir adquieren un nuevo fenotipo y quedan como remanentes formando un reservorio de células denominadas células T de memoria. Estas células T de memoria se dividen en

dos grupos dependiendo de su localización: células T de memoria central (T_{MC}) y células T de memoria efectora (T_{ME}). Las T_{MC} se encuentran preferentemente en los órganos linfoides secundarios y presentan un fenotipo $CD62L^+$ y $CCR7^+$, mientras que las T_{ME} se encuentran en los tejidos periféricos y su fenotipo es $CD62L^-$ y $CCR7^+$, lo que les otorga baja habilidad para migrar a los ganglios linfáticos (160, 161).

Mientras que en la etapa efectora el número de células T $CD8^+$ específicas aumenta y en la etapa de muerte este número disminuye, en la fase de memoria el número de células T $CD8^+$ es constante y se mantiene durante un largo periodo de tiempo (162, 163) gracias al recambio homeostático mediado por la IL-7 e IL-15 (164-166) o por la estimulación persistente por trazas virales o con reactividad cruzada con otros virus, dependiendo del tipo de infección (141).

Las células naïve presentan un bajo potencial para realizar funciones efectoras. Sin embargo, las células efectoras T $CD8^+$ adquieren la habilidad de lisar rápidamente a la célula infectada y secretar citoquinas antivirales en respuesta a la estimulación antigénica (167, 168). Cuando las células T efectoras se diferencian en células de memoria alcanzan un fenotipo menos activado, pero mantienen el potencial para producir IFN- γ , TNF- α y su actividad citotóxica al exponerse de nuevo al antígeno (169). Esta capacidad para recuperar las funciones efectoras tras reestimulación es una de las propiedades que diferencia a las células T $CD8^+$ naïve de las células de memoria.

Existen otras propiedades que también cambian con el paso de célula efectora a célula de memoria. En primer lugar, la habilidad para producir IL-2 es menor en células efectoras y va aumentando progresivamente durante la diferenciación. En segundo lugar, también la capacidad para proliferar en respuesta al antígeno aumenta

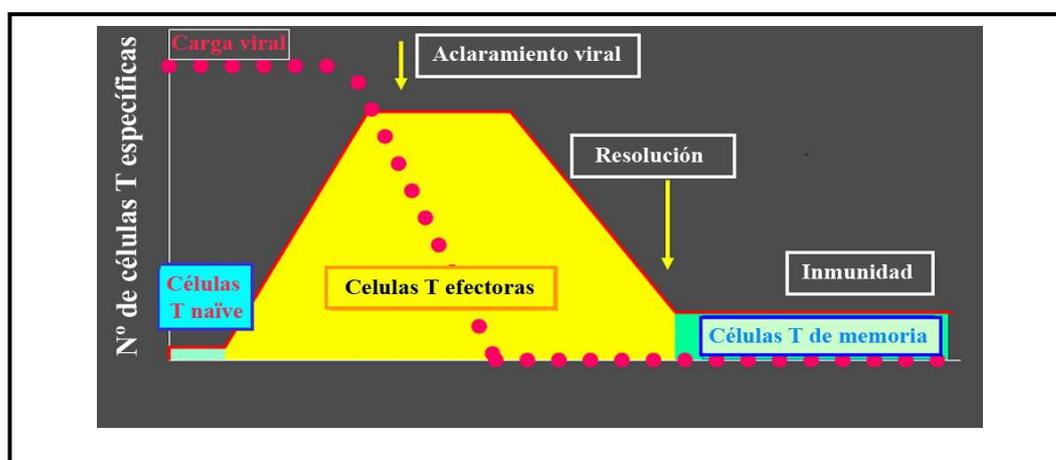


Fig. 8. Esquema de la cinética de las células T $CD8^+$ específicas durante la infección en un paciente con resolución de la infección.

gradualmente (170, 171). Y por último, las células T CD8⁺ efectoras pierden la habilidad para migrar a los ganglios linfáticos debido a la baja expresión de CD62L y CCR7, habilidad que va siendo recuperada progresivamente por las células de memoria (157, 171).

Para que las células T CD8⁺ específicas puedan ejercer su función deben de activarse correctamente, lo que depende de dos señales:

1. Interacción entre el TCR y el HLA de clase I de la CPA que presenta el epítipo viral.
2. Interacción entre las moléculas coestimuladoras positivas, presentadas por las células T CD8⁺, y sus receptores, expresados por las CPAs.

3.3.2. Interacción entre la molécula HLA-I / péptido y el TCR.

Las células T CD8⁺ específicas son capaces de reconocer a la célula infectada gracias a la interacción entre su TCR y el HLA de clase I que presenta al epítipo viral.

El HLA-I se expresa en la superficie de todas las células nucleadas y presenta fragmentos de péptidos derivados de proteínas intracelulares de 8-10 residuos de longitud. En el caso de células infectadas por virus, estos péptidos presentados derivan de las proteínas virales. Las células T CD8⁺ específicas son capaces de reconocer los epítopos virales presentados por los complejos HLA-I y posteriormente eliminar a la célula infectada y producir citoquinas tipo-I (172).

El HLA-I es un heterodímero formado por una cadena pesada y una proteína integral de membrana, la β_2 -microglobulina (173) (Fig.9).

Las moléculas que van a formar el HLA-I se ensamblan en el lumen del RE. Para que el péptido se ensamble con el HLA-I es necesario que sea transportado del citosol al interior del RE, siendo esta función llevada a cabo por un transportador asociado al procesamiento del antígeno (TAP) (174, 175). Tras el anclaje del péptido, las moléculas de HLA-I se disocian de TAP y son transportadas por vesículas a través del aparato de Golgi (176) hasta llegar a la membrana plasmática.

Una vez en la membrana plasmática, el péptido unido al HLA-I va a ser reconocido por el TCR. El TCR es un heterodímero formado por las cadenas α y β que se asocia con la molécula CD3 en el complejo TCR-CD3. El complejo TCR-CD3 es esencial para la expresión en la membrana del TCR. La función de este complejo es la transducción de la señal a la célula tras la unión del ligando al TCR (177).

Los polipéptidos de la molécula CD3 presentan en sus colas intracitoplasmáticas el llamado "motivo de activación del

inmunorreceptor basado en tirosina" (ITAM) que desarrolla un papel esencial en la activación del linfocito T a través de su interacción con tirosinquinasa (178). El complejo CD3-TCR no tiene actividad intrínseca protein-tirosin-quinasa (PTK), sino que la estimulación del receptor conduce a la fosforilación de residuos tirosina en los ITAMs, a través de las que se activa la familia de las Src quinasa. Seguidamente, la proteína asociada Z (ZAP) 70 se une con los ITAMs fosforilados. Todo este proceso conduce a la activación de dos principales rutas, una involucrando al diacilglicerol (DAG) y otra al inositol trifosfato (IP_3) que inducen la producción del factor nuclear NF- κ B que finalmente genera la activación celular (179, 180).

3.3.3. Moléculas coestimuladoras

Como se ha comentado previamente, para la activación de las células $CD8^+$ además de la interacción entre el TCR y el péptido unido al HLA-I, es necesaria una segunda señal. Esta señal se produce por unión de moléculas coestimuladoras expresadas en las CPAs, con sus receptores presentes en las células T (181).

Dos grandes familias de proteínas están implicadas en la coestimulación de las células T. La familia del CD28 (182) y la familia del receptor del TNF (TNF-R) (183).

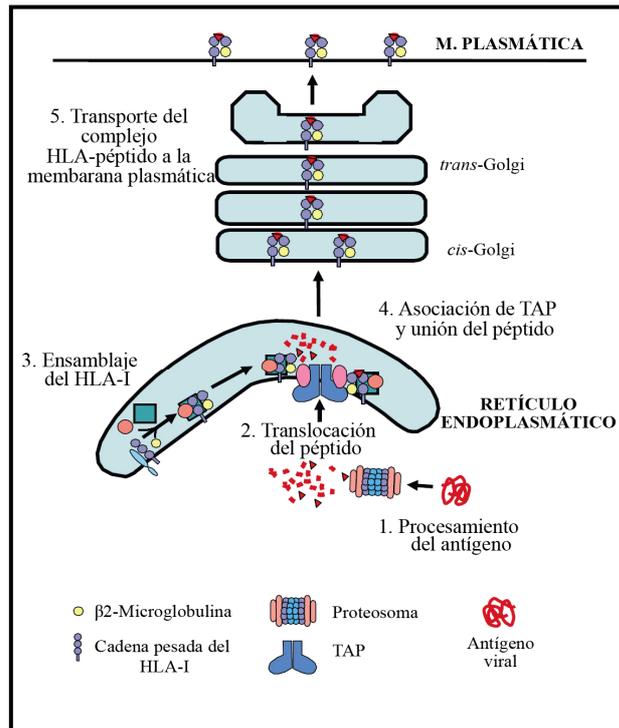


Fig. 9. Ruta de presentación del HLA-I en la membrana plasmática.

Figura reproducida y adaptada de: *The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion*. Hewitt EW. Immunology 2003 110: 163-169, con permiso de John Wiley & Sons Ltd.

Algunos de los miembros de la familia del CD28 son la proteína CD28 y el coestimulador inducible (ICOS), que al unirse a sus ligandos, provocan una coestimulación positiva. En concreto, la molécula CD28 expresada por la célula T naïve se une a B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) induciendo el aumento de la producción de IL-2 y favoreciendo la proliferación celular. Por otro lado, la unión de ICOS con su ligando, ICOS-L, aumenta la activación, supervivencia y secreción de citoquinas por parte de las células de memoria efectoras, pero no por las células T naïve (184) (Fig.10).

Además, existen moléculas coestimuladoras negativas pertenecientes a la familia CD28 que regulan la tolerancia de las células T y atenúan la respuesta inmune. Algunas de ellas son CTLA-4 (antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos), PD-1 (molécula de muerte programada-1) y BTLA (atenuador de linfocitos B y T). La expresión de estas moléculas es inducida tras la activación de las células T para regular o frenar su actividad una vez han realizado su función y por tanto, estas moléculas están ausentes en las células T naïve. CTLA-4 se une al mismo ligando que el CD28 pero con mayor afinidad, y PD-1 y BTLA tras la unión a sus respectivos ligandos (PD-L1 y B7-H4) inhiben la proliferación de las células T y la producción de citoquinas (185).

El adecuado balance entre la presencia de señales coestimuladoras positivas y negativas permite el desarrollo de una respuesta eficaz y no perjudicial para el huésped (186-188) (Fig.10).

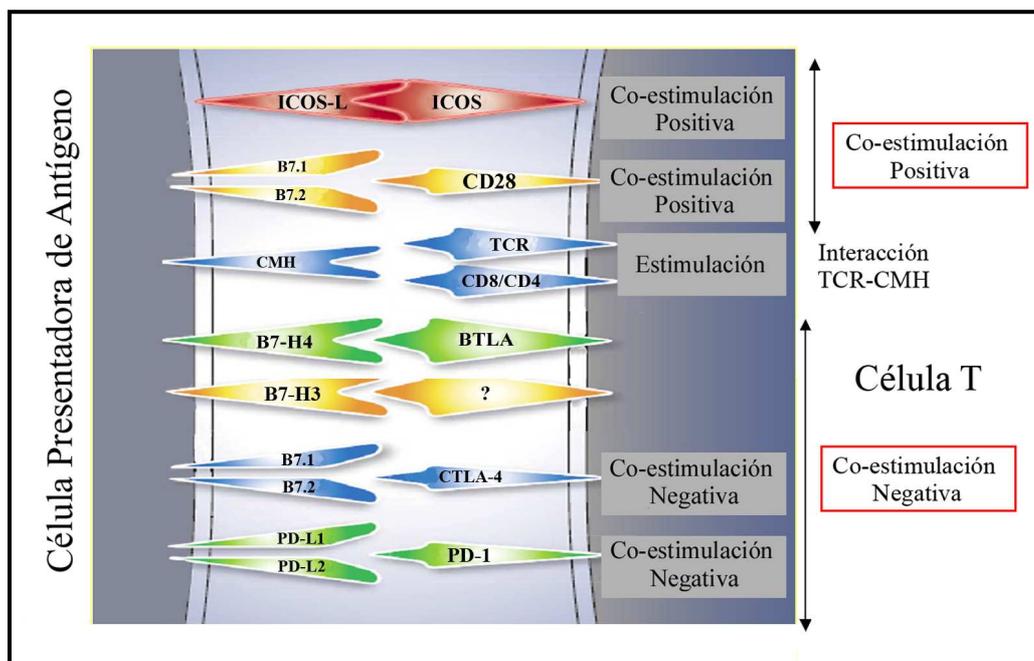


Fig. 10. Interacción entre receptores expresados por la célula T y sus ligandos expresados por la CPA. Según el tipo de interacción se producirá una coestimulación positiva o negativa.

La otra familia de receptores de membrana involucrada en la coestimulación, es la familia TNF-R. Muchos miembros de la familia TNF-R juegan un papel crucial en la activación de las células T. Los miembros de esta familia se dividen en tres grupos:

- a) aquellos que contienen dominios de unión a receptores de superficie implicados en rutas de muerte celular.
- b) aquellos que han perdido los dominios anteriormente mencionados.
- c) aquellos que han perdido estos dominios pero que contienen motivos de interacción con factores asociados al TNF (TRAFs) o motivos de interacción con TRAF (TIMs) (183), que se unen a receptores de membrana produciendo la sobrerregulación de factores nucleares, como el factor nuclear κ B (NF- κ B) (189).

Entre los miembros de la familia TNF-R denominados TIMs se encuentran OX40 (CD234), CD27, 4-1BB (CD137) los cuales activan las células T (190, 191). Otros como el CD40, presente en la CPA, son importantes en los procesos de supervivencia y activación de las CPAs, lo que puede tener un efecto directo en la respuesta de las células T (192, 193).

Los virus no citopáticos desarrollan estrategias para evadir la respuesta celular citotóxica del huésped. Una de estas estrategias podría ser la inducción de anergia en las células T CD8⁺ antígeno específicas, es decir, favorecerían el desarrollo de un agotamiento que disminuye su capacidad proliferativa y para secretar citoquinas.

Una manera potencial de lograr este objetivo sería mediante la modulación de la coestimulación de la célula T, favoreciendo la expresión de moléculas coestimuladoras negativas de manera temprana.

La anergia de las células T citotóxicas ha sido estudiada durante la infección por LCMV, observándose que tiene lugar en varias etapas (194, 195) (Fig.11). La primera etapa, llamada agotamiento parcial I, se caracteriza por la incapacidad de estas células para producir IL-2 y en menor medida TNF- α , además, la capacidad citolítica *in-vitro* de estas células efectoras está disminuida. En la segunda etapa, también denominada agotamiento parcial II, la mayoría de las células son incapaces de producir IL-2 y TNF- α , mostrando, también alterada aunque en menor medida, su capacidad para producir IFN- γ . Finalmente, las células entran en un estado de agotamiento funcional completo, en el que las células han perdido todas sus funciones efectoras y mueren por apoptosis (196, 197).

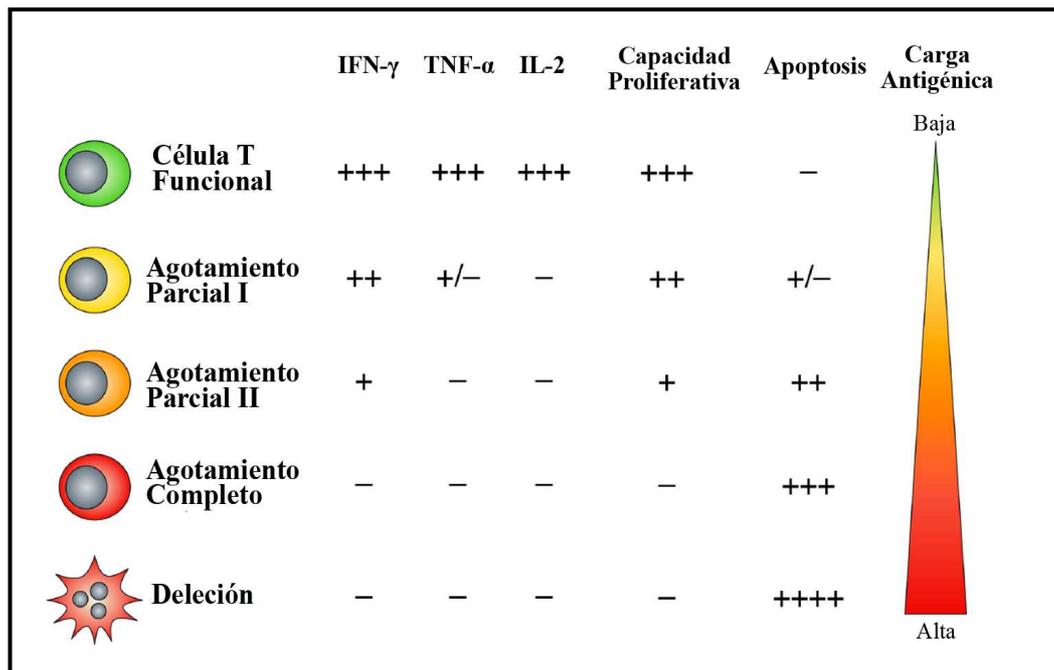


Fig. 11. Agotamiento de las células T CD8⁺ específicas durante la infección viral crónica.

Freeman GJ et al. 2006. Figura publicada originalmente en *J Exp Med*. doi: 10.1084/jem.20061800.

Este mismo hecho podría ocurrir en las infecciones por virus hepatotropos, pero el mecanismo no está suficientemente descrito.

En la infección persistente por VHC se ha demostrado la existencia de células CD8⁺ VHC específica anérgicas, proclives al desarrollo de apoptosis, pero no completamente eliminadas (198). Por tanto, si bien no existe una destrucción total de la respuesta citotóxica específica, ésta es incapaz de controlar la infección debido a que tienen alterada su capacidad efectora. El conocimiento de las vías utilizadas por el VHC para favorecer el desarrollo de anergia y apoptosis en la respuesta citotóxica específica podría permitir su modulación, y consecuentemente, la restauración de esta respuesta.

En el caso del VHC, un mecanismo eficaz de escape viral podría ser la inducción de la expresión prematura de moléculas coestimuladoras negativas en las células T CD8⁺ VHC específicas. De esta manera, evitaría su eliminación al favorecer el desarrollo de un estado de anergia en estas células.

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, las células efectoras de memoria son capaces de sobrevivir en el organismo durante largos periodos de tiempo, pero para ello necesitan el contacto continuo con bajas cantidades de Ag viral (141), una

estimulación persistente con otro antígeno con el que tengan reactividad cruzada (199, 200) o la interacción con determinadas citoquinas que favorezcan su supervivencia. En este último caso, la IL-7 juega un papel esencial, ya que la interacción con su receptor (CD127, IL-7R) induce la expresión de moléculas anti-apoptóticas (201, 202) e inhibe la expresión de moléculas pro-apoptóticas (203, 204) implicadas en la supervivencia celular.

Por tanto, podría ocurrir que la infección por VHC favoreciera la disminución de la expresión de CD127, receptor de IL-7, como mecanismo de escape viral, favoreciendo la inducción de moléculas implicadas en la apoptosis de las células T citotóxicas específicas.

Basándonos en los antecedentes referidos previamente, en este trabajo nos hemos centrado en el estudio del papel de la molécula coestimuladora negativa PD-1 y de la molécula CD127 durante la infección por VHC. A continuación se describe con detalle las características estructurales y funcionales de estos receptores de membrana.

4. LA MOLÉCULA PD-1 COMO INDUCTOR DE ANERGIA EN LA RESPUESTA CITOTÓXICA.

La molécula PD-1 es una molécula coestimuladora negativa que tras la unión con su ligando (PD-L1) induce la anergia de la respuesta citotóxica específica, inhibiendo su proliferación y bloqueando sus capacidades efectoras.

4.1. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1.

La molécula PD-1 es una proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Tiene un 23% de homología con CTLA-4, aunque ha perdido el motivo MYPPPY necesario para la unión con B7.1 y B7.2 (205).

PD-1 consta de dos regiones funcionales, una extracelular formada por un dominio Ig Variable (IgV) y una citoplasmática, que contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo de cambio del inmunorreceptor basado también en tirosina (ITSM) (206, 207). Tras la estimulación antigénica, PD-1 recluta la proteína tirosin fosfatasa homóloga de Src, que contiene un dominio tirosina fosfatasa (SHP-2), hacia el ITSM. Esto activa a la proteína SHP-2 que

a continuación defosforila moléculas efectoras de la vía nuclear inducida por el TCR, inhibiendo la activación de la célula T tras la estimulación del TCR (208, 209) (Fig.12).

PD-1 media la inhibición de la proliferación de las células T mediante la parada del ciclo celular en G0/G1, e inhibiendo la producción de IL-2 (210, 211).

Los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2) son proteínas transmembrana de tipo I con dominios IgV e IgC en su región extracelular (212, 213).

Mientras que PD-1 se expresa en células T y B activadas y en células mieloides (205), su ligando PD-L1 se expresa en células T, B, células mieloides, DCs, células no hematopoyéticas de órganos no linfoides (corazón, placenta, páncreas, pulmón e hígado) y en una variedad de tumores. Por otro lado PD-L2 se induce en DCs y macrófagos (212-216).

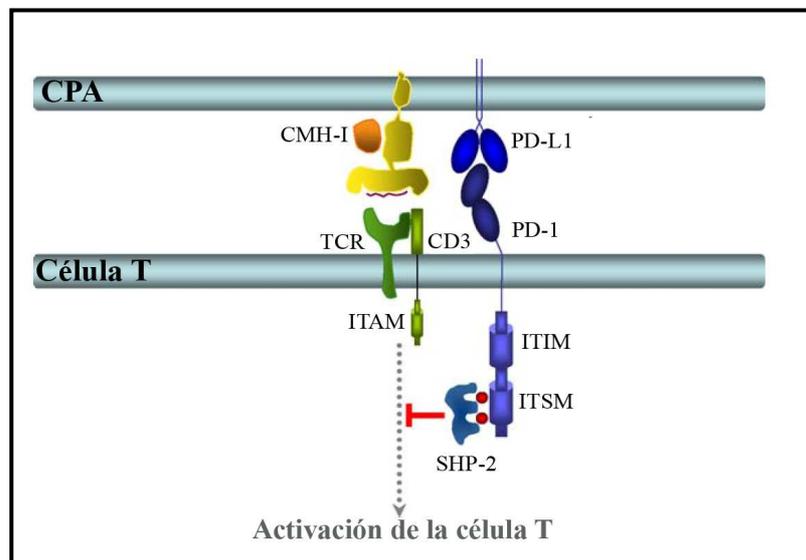


Fig. 12. Estructura e interacción entre PD-1 y PD-L1.

Figura reproducida y adaptada de: *Turning on the off switch: Regulation of anti-viral T cell responses in the liver by the PD1/PD-L1 pathway.* Grakoui A et al. *J. Hepatol* 2006 45 468-472, con permiso de Elsevier.

4.2. PAPEL DE PD-1 EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VIRUS NO CITOPÁTICOS.

La primera evidencia que correlacionaba la expresión de la molécula PD-1 con el desarrollo de una respuesta citotóxica anérgica en infecciones virales no citopáticas se obtuvo en un modelo experimental de infección murina por LCMV. Las células T CD8⁺ LCMV específicas desarrollaban un estado de agotamiento funcional en la fase crónica de la infección (sin capacidad de proliferación, producción de IFN- γ ni control viral) (217). En este modelo, la infección por una cepa de LCMV que ocasiona una infección

persistente se asociaba a la sobreexpresión de PD-1 en las células citotóxicas específicas y al desarrollo de anergia celular. (218). Sin embargo, el bloqueo de la interacción entre PD-1 y su ligando favorecía el aumento cuantitativo y cualitativo de la respuesta T CD8⁺ LCMV específica. Tras este bloqueo, las células T CD8⁺ LCMV específicas producían mayor cantidad de IFN- γ y TNF- α y fueron capaces de controlar la infección.

Estudios realizados en otras infecciones, como en la infección por VIH y VHB, muestran también la implicación de la vía PD-1/PD-L1 en la alteración funcional de las células T (219-222). Concretamente, en la infección por el VHB las células CD8⁺ VHB específicas de sujetos con infección crónica sobreexpresan PD-1 y el bloqueo de la unión entre PD-1 y PD-L1 restaura las funciones efectoras de estas células (223).

En el caso de la infección por el VHC, durante la primoinfección se induce la expresión de PD-1 en las células T CD8⁺ VHC específicas, permaneciendo elevada en los sujetos que cronifican, pero no así en los que controlan espontáneamente la infección (224, 225). El agotamiento funcional de estas células se correlaciona con su nivel de expresión de PD-1, así las células T CD8⁺ VHC específicas de sujetos con infección crónica, con elevada expresión de PD-1, presentan alteraciones en su capacidad para producir citoquinas tipo I (IFN- γ , TNF- α e IL-2), moléculas citolíticas (perforina y granzima B) (226, 227) y en su capacidad para proliferar tras el encuentro antigénico (154, 228).

5. PAPEL DE LA VÍA IL-7/CD127 EN EL DESARROLLO DE APOPTOSIS.

La apoptosis o muerte celular programada juega un papel central en una gran variedad de procesos fisiológicos, entre los que se incluye la autoorganización funcional del sistema inmune y del sistema nervioso central, cambios morfogénicos durante el desarrollo embrionario, homeostasis tisular en animales adultos y eliminación de células dañadas (229). Además, los procesos apoptóticos están involucrados en la patogénesis de muchos desórdenes como cáncer, infección por VIH, desórdenes inmunológicos, enfermedades cardiovasculares, y muchas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson e isquemia) (230). Algunas alteraciones se acompañan de apoptosis insuficiente (linfomas, cáncer), y otras de apoptosis excesiva (VIH, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por isquemia/perfusión) (231).

La apoptosis fue inicialmente descrita por las alteraciones que el proceso provoca en la morfología celular y que incluyen: agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplasmática, disrupción de la membrana plasmática, degradación del DNA genómico en fragmentos discretos y disgregación de núcleo y citoplasma en forma de vesículas (“cuerpos apoptóticos”) que contienen ribosomas, mitocondrias intactas y/o DNA nuclear (232).

La apoptosis de las células T puede ocurrir por dos mecanismos, uno activo y otro pasivo.

- Mecanismo Activo: Se inicia con los denominados “receptores de muerte”, entre los que están incluidos Fas (CD95) y TNF-R1 y 2. Estos receptores contienen unos dominios de muerte (“*Death Domain*”, DD) necesarios para la activación de caspasas (cisteín proteasas que juegan un importante papel en la apoptosis). La unión de FasL o TNF- α con sus respectivos receptores hace que se recluten proteínas asociadas a Fas con dominios de muerte (FADD), esto activa las caspasas 8 y 10, lo que conduce al inicio de la cascada de caspasas y a la apoptosis vía caspasa 3 (233, 234).

- Mecanismo Pasivo: Se inicia cuando las células carecen de citoquinas y factores de crecimiento y es controlada por la familia de proteínas del Bcl-2 (“*B-cell leukemia/lymphoma 2*”). Existen dos vías por las cuales la muerte pasiva puede ocurrir, una vía dependiente del factor activador de proteasas de apoptosis (Apaf-1) y la otra no dependiente de dicho factor. En el primer caso, el estrés celular induce las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, provocando la translocación del citocromo c (cit c) de la mitocondria al citoplasma (235). En este estado inactivo, Apaf-1 se encuentra en forma monomérica, pero la salida del cit c provoca un cambio conformacional que concluye en la formación del apoptosoma (236). Cada una de las siete moléculas de Apaf-1 que forman el apoptosoma expone su dominio de reclutamiento de caspasas, permitiendo así la unión de la procaspasa 9, que una vez activada es capaz de activar a la caspasa 3 iniciando así la cascada de caspasas y la apoptosis (234, 237). La segunda vía, que no requiere Apaf-1 ni caspasa 9, se basa en la inhibición de caspasas por proteínas inhibitoras de la apoptosis. La permeabilización de la membrana mitocondrial produce la liberación de proteínas como DIABLO, que es un antagonista del inhibidor de las proteínas apoptóticas, por lo que las caspasas efectoras se activan y se inicia la cascada de caspasas (238).

Como se ha comentado anteriormente, la muerte celular pasiva es controlada por proteínas de la familia del Bcl-2. Esta familia está formada por proteínas pro-

apoptóticas que promueven la apoptosis (Bax, Bak, Bad, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim y Hrk) y por otro grupo de proteínas anti-apoptóticas que inhiben la muerte por apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Dependiendo del balance entre las proteínas pro y anti-apoptóticas las células morirán por apoptosis o sobrevivirán (234).

Se sabe que la IL-7 juega un papel crucial en el desarrollo y supervivencia de las células T, protegiéndolas de una muerte pasiva por apoptosis (239), siendo en este proceso muy importante el papel de las moléculas de la familia de Bcl-2.

5.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE CD127.

La IL-7 fue descubierta como un factor que promovía el crecimiento de las células B precursoras murinas a largo plazo en sobrenadantes de cultivo de médula ósea (239, 240). Esta citoquina juega un papel crucial en el desarrollo y supervivencia de células T y B en ratones y sólo en las primeras en humanos (239). El papel de esta citoquina en el desarrollo de las células T se puso de manifiesto en trabajos realizados en ratones *knockout* (241, 242), en los que la deficiencia de IL-7 causaba un síndrome de inmunodeficiencia severo (243). Sin embargo, recientemente se ha visto que la IL-7 es esencial en la homeostasis de las células T naïve y de memoria (165, 244-246).

En ratones, la producción de IL-7 se ha detectado en células estromales del timo (247), del hígado y de la médula ósea (248), en el bazo (240), en queratinocitos (249), en el intestino fetal (250) y en el cerebro embrionario (251). En humanos, la producción de IL-7 se ha identificado en células del epitelio intestinal (252), queratinocitos (249), en tejido hepático (253), células dendríticas foliculares (254), células endoteliales (254), células del músculo liso (254) y fibroblastos (254).

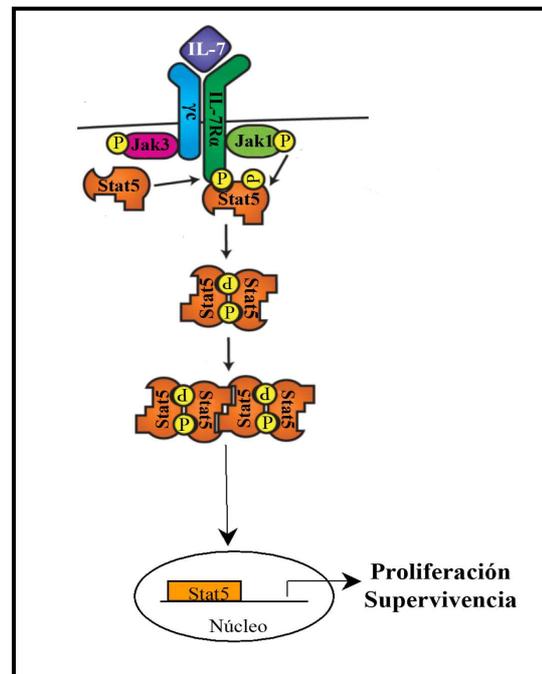


Fig. 13. Estructura del receptor de la IL-7 y ruta de señalización.

Figura reproducida y adaptada de: *Perspectives on the quantitative immunobiology of the IL-7 signaling network*. Megan J. Cell Mol Immunol. 2008; 5(2): 79–89, con permiso de Cell Mol Immunol.

El receptor de la IL-7 está formado por una cadena α (IL-7R α) y una cadena γ (γ c) que es compartida por los receptores de otras citoquinas como IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21 (255) (Fig.13).

Tras la unión del ligando, las dos cadenas forman un heterodímero, lo que conduce a la activación de proteínas quinasas de la familia de JAK, como son JAK1 que se une a la cadena α del IL-7R y JAK3 que se une a la cadena γ c (256). Las proteínas JAK se autofosforilan y fosforilan, a determinadas tirosinas del receptor. A continuación las proteínas de la familia de STAT se unen a algunas de las tirosinas fosforiladas del receptor, quedando cerca de las proteínas JAKs. Las proteínas JAKs fosforilan a las proteínas STAT que pierden su afinidad por el receptor y forman dímeros entre sí que migran al núcleo de la célula, donde se van a unir a elementos de respuesta específicos regulando la transcripción de genes diana y promoviendo la proliferación celular (257, 258) (Fig.13). La IL-7 realiza esta regulación transcripcional a través de la estabilización de un activador de la quinasa dependiente de ciclina (Cdc25a) (259) y desestabilizando un inhibidor de esta misma quinasa, el p27^{kip1} (260).

El nivel de expresión de CD127 está regulado en varios puntos del desarrollo linfoide, en la activación y diferenciación. Se han propuesto varias teorías para explicar esta regulación. La primera propone un papel selectivo en el que existiría una sobrerregulación de CD127 en las células de memoria (261), y estas células con altos niveles de CD127 recibirían una señal de supervivencia mayor por lo que persistirían. Sin embargo, para intentar explicar la regulación a la baja del CD127, que se produce después de que las células T son expuestas a diversas citoquinas (262), se ha postulado un papel “altruista” (263), por el cual una célula T que ha estado expuesta a IL-7 y ha recibido una señal de activación, dejaría de consumir IL-7 permitiendo que otras células reciban esta señal.

Como hemos comentado anteriormente, la IL-7 tiene un importante papel en el desarrollo y supervivencia de las células T, protegiéndolas de la apoptosis mediada por las moléculas de la familia de Bcl-2.

Dentro de los mecanismos pasivos, el miembro de la familia de Bcl-2 más estudiado ha sido el mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2 (Bim). Bim es un regulador crucial de la selección negativa en el timo (264) y juega un papel esencial en la muerte por apoptosis inducida por la deprivación de IL-7 en células T, B, neuronas y muchos otros tipos celulares. (265-267).

Existen dos teorías por las cuales Bim induciría la apoptosis:

- *Modelo de unión directa:* La familia de Bcl-2 está compuesta por moléculas sensibilizadoras de la muerte celular (Bad, Bik) y por activadores de la muerte celular (Bim, Bid). Los activadores normalmente se unen a proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Mcl-1), sin embargo ante estímulos apoptóticos (como puede ser la deprivación de IL-7), las moléculas sensibilizadoras se unen a estas proteínas anti-apoptóticas dejando libre a los activadores. Una vez que Bim se encuentra liberado interaccionaría con Bax o Bak activándolos y promoviendo su translocación a la membrana mitocondrial, con la consiguiente liberación de cit c al citosol, desencadenando la cascada apoptótica.

- *Modelo de desplazamiento:* La muerte celular es prevenida gracias a la interacción entre proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Mcl-1) con Bax y Bak. Estímulos apoptóticos sobre-regulan Bim, que se uniría a Bcl-2, desplazando a Bax y Bak. Estos últimos quedarían libres para unirse a la membrana mitocondrial y desencadenar la cascada de apoptosis.

Esta teoría queda demostrada en un trabajo recientemente publicado (268). Los autores demuestran que en presencia de IL-7, Bim se ve limitado por Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia Sequence-1); mientras que cuando se produce la deprivación de IL-7 (estímulo apoptótico), la cantidad de Mcl-1 disminuye dejando libre a Bim. Esta liberación hace a Bim susceptible de ser fosforilado en las serinas en posición 55 y 65 por las proteínas JNK (“*C-Jun N-terminal quinasa*”) y p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) lo que incrementa su actividad pro-apoptótica, activando a su vez a Bax y Bak (266, 269) lo que induce la liberación de cit c, desencadenando la cascada apoptótica.

En resumen, la supervivencia mediada por IL-7 depende de la regulación de proteínas pro y anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 (Bim y Mcl-1 respectivamente). La IL-7 promueve la expresión de Mcl-1 e inhibe la expresión de Bim evitando de esta manera que se desencadene la muerte celular por apoptosis.

5.2. PAPEL DE CD127 EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VIRUS NO CITOPÁTICOS.

Varios trabajos demuestran que durante la infección aguda por LCMV (261), citomegalovirus (CMV) y Epstein-Barr (VEB) (270) existe una baja expresión de la molécula CD127 en las células T CD8⁺ específicas.

En otras infecciones, como es el caso de la infección por VHC, se ha descrito que en sujetos con infección resuelta de manera espontánea, las células T CD8⁺ VHC específicas muestran, además de una expresión baja de PD-1, una elevada expresión de CD127 tras la resolución de la infección, lo que se correlaciona con unas adecuadas funciones efectoras. Sin embargo, en la infección crónica, las células T CD8⁺ VHC específicas tienen una baja expresión de CD127 y alta de PD-1 (225, 271, 272). Estas células no sólo están en un estado de anergia sino que probablemente están predispuestas a morir por apoptosis.

Hasta ahora ningún trabajo ha examinado mecanismos restauradores de la reactividad de las células citotóxicas VHC específicas actuando sobre la presumible situación pro-apoptótica desencadenada por la deprivación de IL-7 derivada de la baja expresión de CD127. Esta posibilidad terapéutica se ha explorado previamente en un modelo murino con infección por LCMV (273) y en la infección crónica por VHB (274).

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, en este trabajo nos centramos en el estudio de la alteración de la expresión de la molécula coestimuladora negativa PD-1 y de la molécula CD127 durante la infección por VHC y en la modulación de las vías, en las que se encuentran implicadas estas moléculas, como posible mecanismo restaurador de la respuesta citotóxica VHC específica. La intención de este estudio fue evaluar si la actuación sobre vías inductoras de anergia y apoptosis permitiría restaurar la reactividad de la respuesta específica citotóxica. Los resultados obtenidos corroboran el conocimiento publicado sobre el efecto de la vía PD-1/PDL1 y describe por primera vez la relación entre la expresión de CD127 y la alteración de la reactividad celular mediada por la molécula Bim en las células citotóxicas VHC específicas durante la infección crónica por VHC.

I. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La respuesta celular citotóxica específica juega un papel esencial en el control de las infecciones. La cronificación de diferentes infecciones virales se ha relacionado con el desarrollo de anergia y apoptosis de las células citotóxicas específicas. También en la infección crónica por VHC se observa una alteración de la respuesta celular citotóxica específica, por lo que el VHC podría activar estas vías para favorecer su persistencia. Estrategias encaminadas a contrarrestar el efecto provocado por la disregulación de la expresión de moléculas implicadas en anergia y apoptosis podrían convertirse en futuras armas terapéuticas. Considerando estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis teórica:

Hipótesis:

El VHC podría modular tanto la expresión de PD-1 como de CD127 en las células T CD8⁺ VHC-específicas con el fin de favorecer un estado de anergia y pro-apoptótico que alteraría la capacidad de esta respuesta para el control de la infección viral. La modulación terapéutica de estas vías podría restaurar la respuesta citotóxica específica.

Para contrastar la validez de estas hipótesis establecimos los siguientes objetivos:

Objetivo general

Relacionar las características funcionales y fenotípicas de la respuesta citotóxica específica frente al VHC con el grado de control viral, con especial atención a la expresión de las moléculas relacionadas con anergia (PD-1), supervivencia (CD127) y apoptosis (Bim), y al efecto de su modulación *in-vitro* sobre la reactividad de esta respuesta.

Objetivos específicos

1. Analizar las características cualitativas y cuantitativas de la respuesta citotóxica VHC específica en función del grado de control viral:
 - a. Características cuantitativas: Frecuencia intrahepática y en sangre periférica de células específicas citotóxicas contra el VHC.
 - b. Características cualitativas de las células citotóxicas VHC-específicas de sangre periférica:
 - b.1. Capacidad de expansión clonal *in-vitro* ante estimulación específica.
 - b.2. Capacidad de producción de citoquinas tipo-1 tras estimulación específica *in-vitro*.
 - b.3. Fenotipo asociado a anergia (PD-1) y supervivencia (CD127/Bim).
 - b.4. Capacidad de expansión clonal *in-vitro* ante estimulación específica tras bloqueo de la vía de acción del PD-1 (complejo PD-1/PD-L1) y de la vía pro-apoptótica (Bim).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO

1.1. TIPO DE ESTUDIO

Para contrastar la hipótesis planteada se diseñó el siguiente estudio:

- Estudio no experimental transversal analítico, en el que se analizaron las siguientes características de la respuesta celular citotóxica VHC específica (variables dependientes): frecuencia, capacidad de expansión clonal, capacidad para producir IFN- γ , fenotipo asociado a anergia (PD-1⁺) y a apoptosis (CD127⁻/Bim), en función del grado de control de la infección (variable independiente).

1.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el área de salud del Hospital Universitario de Guadalajara. Los casos se recogieron mediante muestreo consecutivo entre los sujetos con infección por VHC remitidos a la Unidad de Hepatología Translacional de la Sección de Aparato Digestivo de dicho hospital, siempre que cumplieran los criterios de inclusión y de no exclusión. El estudio se desarrolló entre los meses de enero de 2007 y agosto de 2010.

1.3. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS

1.3.1. Criterios de admisión en el estudio.

Durante el periodo del estudio se incluyeron mediante muestreo consecutivo los sujetos remitidos al Servicio de Aparato Digestivo con diagnóstico de infección por VHC que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión y de no exclusión:

- **Criterios de inclusión:**

- Edad entre 18 y 65 años.
- Serología positiva contra el VHC. Se agruparon según su situación clínica en:
 - A- Sujetos con hepatitis crónica genotipo 1 no tratados o sin RVS.
 - * Persistencia de RNA positivo frente a VHC en suero durante más de 6 meses.
 - * Concentración de alanina aminotransferasa (ALT) sérica persistentemente elevada durante más de 6 meses.

B- Sujetos con hepatitis crónica genotipo 1 resuelta tras tratamiento anti-VHC.

- * Persistencia de RNA negativo frente a VHC en suero 6 meses después de finalizar el tratamiento.
- * Concentración de ALT sérica normal 6 meses después de finalizar el tratamiento.

C- Sujetos con inmunidad natural contra VHC.

- * Serología positiva contra VHC.
- * RNA negativo frente a VHC sin tratamiento previo.
- * Concentración de ALT sérica normal sin tratamiento previo.

- Estar de acuerdo con participar en el estudio y firmar un consentimiento informado.
- Haplotipo HLA-A2 positivo, excepto para el grupo control negativo del estudio constituido por pacientes con hepatitis crónica por VHC genotipo 1 y HLA-A2 negativo.

- **Criterios de exclusión:**

- Genotipo del VHC distinto a 1, excepto para el grupo con inmunidad natural en el que no se podía conocer el genotipo.
- Tratamiento antiviral actual o en los 6 meses previos a la recogida de datos.
- Consumo mayor de 40 gramos de etanol al día en hombres y 20 gramos en mujeres.
- Presencia de otras causas de hepatopatía crónica: hemocromatosis, hepatitis autoinmune, enfermedad de Wilson, cirrosis biliar primaria, porfiria cutánea tarda, esteatohepatitis no alcohólica y coinfección por VHB.
- Inmunodepresión primaria o secundaria: sujetos infectados por el VIH y/o con tratamientos inmunosupresores. Estos sujetos se excluyeron del estudio por las posibles consecuencias de la inmunodepresión sobre la respuesta citotóxica contra el virus.

1.4. VARIABLES DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DEL ESTUDIO

- Variable Independiente: La variable analizada en este estudio fue el grado de control viral de la infección. Se trata de una variable dicotómica con las siguientes categorías:

- *Infección Persistente (IP) por VHC*: RNA VHC > 1.000 UI/mL / ALT > 40 UI/L / HLA-A2⁺. Se trata de pacientes naïve o sin RVS tras haber transcurrido al menos 6 meses desde el final del tratamiento.
- *Infección Resuelta (IR) tras tratamiento antiviral*: RNA VHC < 40 UI/mL / ALT < 40 UI/L / HLA-A2⁺. Se trata de pacientes con RVS tras tratamiento estándar con IFN-pegilado α -2b más ribavirina.

- Variables Dependientes: Para analizar las características cuantitativas y cualitativas de la respuesta citotóxica VHC específica, se eligió como modelo la respuesta citotóxica frente a los epítomos inmunodominantes del VHC, NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ y Core₁₃₂₋₁₄₀, en sujetos HLA-A2⁺. Se registraron las siguientes variables:

- Frecuencia de células T CD8⁺ VHC específicas sobre el total de células T CD8⁺, en sangre periférica (grupos IP e IR) y en biopsias hepáticas (grupo IP). Es una variable cuantitativa continua con un rango de 0-100%.
- Proliferación de las células T CD8⁺ VHC específicas positivas tras estimulación con péptidos específicos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ y Core₁₃₂₋₁₄₀. En casos seleccionados también se evaluó la capacidad proliferativa tras la adición de Ac anti-PD-L1 o z-VAD-fmk. Es una variable categórica dicotómica que puede tomar los valores: expansión positiva o negativa.
- Porcentaje de células T CD8⁺ VHC específicas productoras de IFN- γ tras estimulación antígeno específica e intensidad media de fluorescencia (IMF) tras marcaje con Ac anti-IFN- γ marcados fluorescentemente. Es una variable cuantitativa continua con un rango de 0-100% y de 0-10.000 unidades de fluorescencia respectivamente.
- Fenotipo PD-1, CD127 y Bim de las células T CD8⁺ VHC específicas. Se mide como IMF tras marcaje de las células T CD8⁺ VHC específicas con Ac marcados. Esta variable tiene un rango de 0-10.000 unidades de fluorescencia.

1.5. COVARIABLES

Como posibles variables de confusión y/o modificadoras se recogieron:

- *Edad en años cumplidos*: Variable cuantitativa continua. En edades extremas de la vida, el sistema inmune muestra alteraciones en cuanto a calidad e intensidad que pueden afectar a las conclusiones del estudio.
- *Sexo*: Variable categórica dicotómica. El sexo masculino se relaciona con un peor pronóstico de la infección por VHC, lo que podría ser un reflejo de diferencias en la respuesta antigénica específica contra el VHC.
- *Vía de contagio*: Variable categórica con las siguientes categorías: 1. Sexual; 2. Desconocida; 3. Parenteral. La vía de contagio puede influir en la calidad de la respuesta inmune durante la primoinfección.
- *Tiempo de evolución*: Variable cuantitativa continua generada por estimación de la fecha en la que el sujeto contrajo la infección. Se considera que los sujetos con mayor tiempo de evolución de la enfermedad pueden presentar una peor respuesta inmune.
- *Índice de masa corporal (IMC)*: Se correlaciona con el grado de resistencia a insulina, esteatosis y fibrosis hepática, características relacionadas con una peor respuesta al tratamiento antiviral. Además, la resistencia a la insulina se puede correlacionar con la resistencia al efecto del IFN al compartir ambas vías similares rutas de activación (275, 276).
- *Variables Histológicas*: El grado de inflamación hepática y el estadio de fibrosis fueron evaluados mediante la puntuación histológica semicuantitativa propuesta por Scheuer (277). La actividad inflamatoria portoperiportal y la actividad lobulillar se clasificaron utilizando una escala de 0-3 (1: leve, 2: moderada y 3: severa). El grado de fibrosis se calculó utilizando una escala de 0-4 (0: ausente, 1: leve, sin tabiques, 2: moderado, con pocos tabiques; 3: numerosos tabiques sin cirrosis, 4: cirrosis). El distinto grado de daño hepático puede traducir diferencias en la calidad de la respuesta inmune (89, 278).

- *Amplificación y secuenciación de las regiones NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁*: Mutaciones en los genes de los que forman parte estos epítomos pueden provocar que no sean reconocidos por las células citotóxicas específicas, por lo que no sufrirían presión inmunológica, lo que podría influir en su fenotipo y función.

1.6. OTRAS VARIABLES

Se utilizaron para clasificar a los casos en los diferentes grupos:

- Concentración sérica de ALT en unidades internacionales por litro (UI/L). Variable cuantitativa continua que refleja el grado de inflamación hepática.
- Variables virológicas:
 - * Concentración sérica de RNA del VHC medida en UI/mL. Variable cuantitativa continua con rango de 4.3×10^1 a 6.9×10^7 UI/mL.
 - * Genotipo del VHC (1a y 1b).

2. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

En esta sección se describen los sujetos admitidos en el estudio, las técnicas experimentales y el protocolo desarrollado para medir las distintas variables del trabajo de investigación. En la Tabla 1 se resume la composición de los distintos medios de cultivo y soluciones utilizadas.

2.1. SUJETOS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO

Entre enero de 2007 y agosto de 2010 acudieron al Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Guadalajara 94 sujetos HLA-A2⁺ con infección por VHC que cumplían los criterios de inclusión y de no exclusión del estudio. De éstos, 76 sujetos presentaban IP y 18 habían resuelto la infección tras recibir previamente tratamiento antiviral. En 22 sujetos con IP, se realizó una biopsia hepática previa a la posterior indicación de tratamiento. Además se reclutaron 10 sujetos con infección crónica HLA-A2⁻ y 10 sujetos HLA-A2⁺ con infección por VHC resuelta de forma natural que sirvieron de control negativo y positivo respectivamente, para la validación de la técnica de cuantificación de las células T CD8⁺ VHC específicas.

Tabla 1 . Medios y tampones utilizados en los experimentos.

SOLUCIONES	CONSTITUYENTES
Solución de lavado para separación de CMSP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medio RPMI 1640 ▪ 10 % STF
Solución de lavado para tinción de CMSP con complejos pentaméricos (FacsFlow)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0.1% Azida sódica ▪ 0.1% STF ▪ PBS
Solución tamponada para PCR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris HCl 10mM + KCl 500mM (pH 8.3)
Buffer de electroforesis (TBE)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris 890mM (pH=8) ▪ EDTA 20mM ▪ Ácido Bórico 890mM
Medio de cultivo celular	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medio RPMI 1640: 500 mL ▪ Hepes 20 mM ▪ Piruvato sódico 0.5 mM ▪ 100 U/mL de penicilina ▪ 100 µg/mL de estreptomina ▪ 2 Mercaptoetanol 50 µM ▪ 2mM L-glutamina ▪ Aminoácidos esenciales 50 X (1/50) ▪ Aminoácidos no esenciales 100 X (1/100) ▪ 10% STF

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica. STF: Suero de ternera fetal. PBS: Tampón fosfato salino. HCl: Ácido Clorhídrico. KCl: Cloruro potásico. TBE: Tris Buffer EDTA. EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

2.2. RECOGIDA DE MUESTRAS Y DATOS CLÍNICOS

A todos los sujetos incluidos en el estudio se les sometió a un cuestionario normalizado para recoger los datos clínicos de interés. Se les extrajo 60mL de sangre heparinizada, y dos tubos sin anticoagulante para la obtención de suero, mediante técnica de venopunción estándar en el momento de inclusión en el estudio. Estas muestras se utilizaron para evaluar la presencia de Ac anti-VHC, cuantificar la concentración sérica de RNA del VHC, determinar el genotipo del VHC, medir la concentración sérica de ALT, descartar otras causas de hepatopatía crónica y de inmunodeficiencia y realizar las técnicas específicas de este trabajo.

2.2.1. Procesamiento de las muestras de sangre periférica.

Los tubos con sangre no heparinizada se centrifugaron a 3.500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos para obtener el suero. Parte de este suero se alicuotó en tubos Eppendorff y se congeló inmediatamente a -80°C . Estas muestras se utilizaron posteriormente para amplificar los fragmentos 1406-1415 y 1073-1081 del gen NS3.

En la sangre heparinizada se realizó el tipaje del HLA-A2 y la separación en gradiente de densidad con Ficoll-hypaque de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Para la obtención de estas células, se pipeteó Ficoll-hypaque en un tubo falcon de 50mL, (Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suecia) y sobre él se añadió un volumen de sangre heparinizada en proporción 1:2 dejándola deslizar suavemente por las paredes del tubo para evitar que se mezclase con el Ficoll. El falcon se centrifugó a 2.100 rpm durante 30 minutos sin freno y a continuación con una pipeta se aspiró la capa formada entre el Ficoll-hypaque (situado por encima del pellet de hematíes y polimorfonucleares) y el plasma (parte superior del tubo), correspondiente a las CMSP. Las CMSP se lavaron 2 veces con RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) suplementado con suero de ternera fetal (STF) al 10% (Biochrom AG, Berlín, Alemania) y se contaron en una cámara de Neubauer al microscopio óptico tras tinción con azul tripán para ver su viabilidad.

De los 60mL se obtienen $30-40 \times 10^6$ CMSP. Estas células resuspendidas en medio de cultivo se emplearán para el recuento de células CD8^+ VHC específicas y para la producción de líneas celulares mediante estimulación con péptidos específicos.

2.2.2. Procesamiento de las muestras de biopsia hepática.

Se obtuvieron células mononucleares intrahepáticas (CMIH) de sujetos infectados por VHC, a partir del excedente de tejido hepático, no necesario para uso diagnóstico, procedente de biopsia hepática. El tejido hepático se lavó con RPMI 1640 al 10% STF para eliminar restos de sangre. Posteriormente, se incubó con 1mg/mL de colagenasa 1 (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA-asa (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO) durante 1 hora a 37°C en baño de agua con agitación. De la suspensión celular obtenida tras la digestión, se aislaron las CMIH mediante gradiente de Ficoll-hypaque (como se ha explicado anteriormente para las CMSP).

2.3. ESTUDIO VIROLÓGICO

Los Ac anti-VHC fueron determinados mediante un inmunoensayo enzimático (Ortho HCV Version 3.0 ELISA Test, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ).

La CV del VHC se midió por técnicas de PCR a tiempo real con un límite de detección de 40 UI/mL (Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 Roche, Indianapolis, IN); el genotipo del virus se testó mediante hibridación reversa (Inno-Lipa HCV II, Innogenics Inc, Alpharetta, GA) y la concentración sérica de ALT mediante los procedimientos bioquímicos habituales. Estos ensayos fueron realizados en los Laboratorios de Virología y de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Guadalajara.

2.4. TIPAJE DE HLA-A2

Para valorar el haplotipo HLA-A2 de los sujetos incluidos en el estudio se incubaron 100 μ L de sangre periférica con Ac de ratón anti-HLA-A2 humano marcado con fluoresceína (FITC) (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 20 minutos a temperatura ambiente (Ta). Tras este tiempo se añadieron 2mL de solución de lisis (BD Biosciences, San Diego, CA) y se incubaron durante otros 10 minutos. Finalmente, la sangre marcada se centrifugó a 2.500 rpm. El pellet obtenido se lavó dos veces con solución de lavado (FACSFlow) y se analizó mediante Citometría de Flujo, en el citómetro FACScalibur con el programa informático CELLQuest® (Becton Dickinson, CA).

El haplotipo HLA-A2 positivo se estableció para un valor de IMF mayor al calculado como media de los 10 controles negativos previamente analizados (Fig.14).

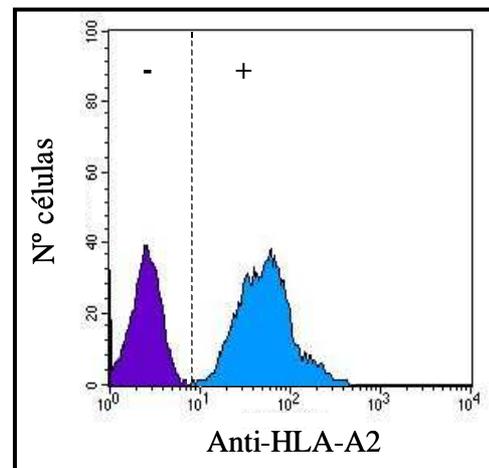


Fig. 14. Histograma de un paciente HLA-A2 negativo y otro positivo. Este último muestra una intensidad de fluorescencia para la tinción con el Ac anti-HLA-A2-FITC superior a 10 unidades de fluorescencia en las CMSP. (-) Negativo. (+) Positivo.

2.5. TINCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES CON AC ANTI-CD8 Y CON COMPLEJOS PENTAMÉRICOS HLA-A2/PÉPTIDO

Para la detección de células CD8⁺ VHC específicas utilizamos una tecnología que permitió su recuento directamente *ex-vivo* sin necesidad de ensayos funcionales (145, 147, 279). Esta tecnología consiste en el uso de moléculas pentaméricas formadas por la unión de cinco moléculas de HLA de clase I/péptido unidos a una molécula fluorescente, ficoeritrina (PE), que permite, tras su unión a las células citotóxicas antígeno específicas, su recuento gracias a la fluorescencia de emisión del complejo y a su detección por técnicas de Citometría de Flujo (Fig.15). Esta técnica es excepcionalmente antígeno-específica y altamente sensible ya que permite reconocer una célula T CD8⁺ antígeno específica entre 5.000 linfocitos CD8⁺.

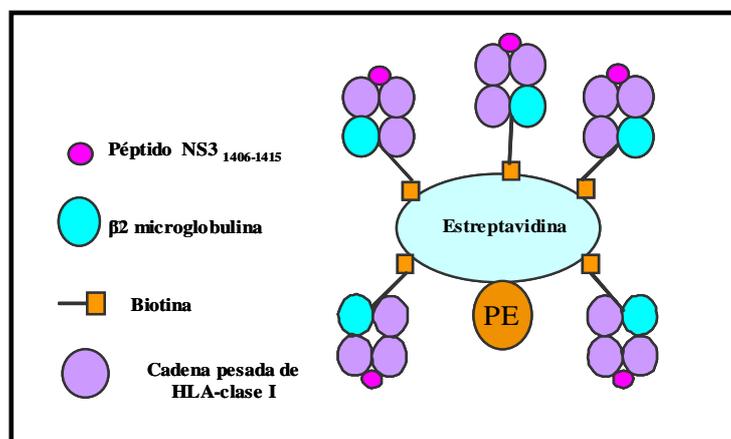


Fig. 15. Esquema del complejo pentamérico HLA-A2/ péptido NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅.
PE: Ficoeritrina

Trabajamos con tres complejos pentaméricos de cuya estructura forman parte tres fragmentos de epítodos inmunodominantes del VHC. Dos de ellos pertenecientes a la región NS3 (fragmentos 1406-1415 y 1073-1081) y otro perteneciente a la región del Core (fragmento 132-140) (280, 281).

Para conocer cuál era el ruido de la técnica utilizada para el recuento de las células T CD8⁺ NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ y Core₁₃₂₋₁₄₀ específicos, se seleccionó un grupo de 10 sujetos con IP por VHC HLA-A2⁺, y otro grupo de 10 sujetos con infección por VHC resuelta de manera espontánea HLA-A2⁺ de similares características demográficas a los casos, que sirvieron como controles de la técnica de detección de células citotóxicas VHC específicas.

Como control positivo se eligió la respuesta citotóxica contra el CMV, porque esta infección se caracteriza por el desarrollo de una respuesta citotóxica eficaz.

El fragmento peptídico utilizado para la formación del complejo pentamérico contra el CMV fue el CMVpp65₄₉₅₋₅₀₄ que se trata de un epítipo inmunodominante en sujetos HLA-A2 positivos. Los distintos complejos pentaméricos fueron sintetizados por Proimmune Limited, Oxford, Reino Unido.

Para determinar el número de células T CD8⁺ VHC específicas frente a estos epítipos, $1-1.5 \times 10^6$ CMSP, o un número variable de CMIH, se incubaron durante 10 minutos con $1 \mu\text{M}$ de los complejos pentaméricos-(PE) HLA-A2/péptido en $100 \mu\text{L}$ de solución de lavado (Tabla 1) a Ta. Tras un lavado, las células se incubaron con concentraciones saturantes de Ac anti-CD8 marcado con ficoeritrina-Cyanina5 (Cy5) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) durante 20 minutos a 4°C. Tras un nuevo lavado, el marcaje de la suspensión celular se analizó en el citómetro de flujo. Se analizaron al menos 250.000 CMSP por cada tinción para alcanzar un número mínimo de 50.000 células T CD8⁺ (Fig.16).

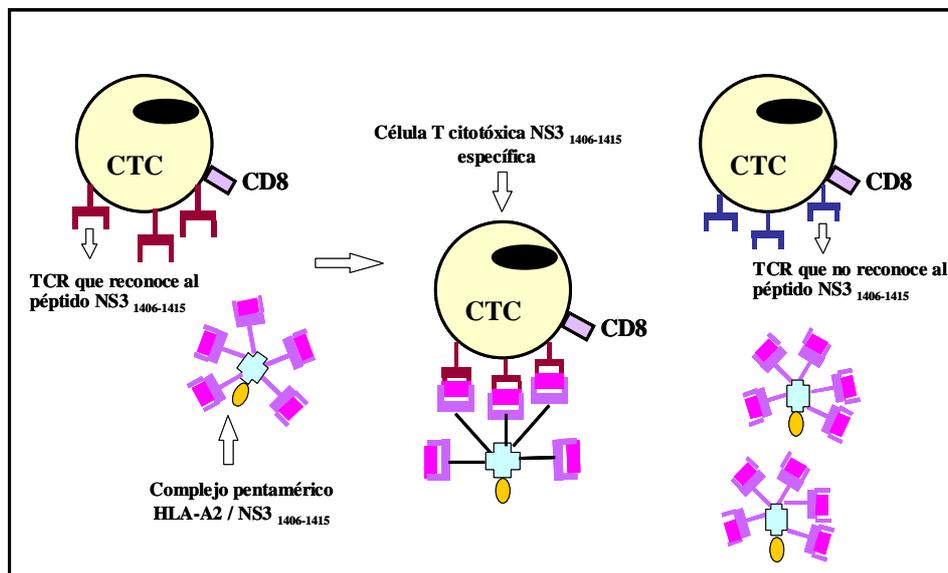


Fig. 16. Esquema de la visualización directa de la célula T citotóxica mediante marcaje con complejos pentaméricos HLA-A2/péptido NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅. Los TCR capaces de reconocer el péptido NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ se unirán al complejo pentamérico, detectándose gracias a la molécula fluorescente. Sin embargo, las células T citotóxicas cuyos TCR no sean capaces de reconocer el péptido no se van a unir a dichos complejos. CTC: Célula T Citotóxica. TCR: Receptor de la célula T.

2.6. PRODUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Para evaluar la capacidad de expansión clonal de las células T CD8⁺ VHC específicas tras el encuentro antigénico, se estimularon *in-vitro* las CMSP con los epítomos específicos correspondientes a las mismas regiones peptídicas que portaban los pentámeros (NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ y Core₁₃₂₋₁₄₀) (Proimmune Limited, Oxford, Reino Unido). A una suspensión de 1x10⁶/mL CMSP en medio de cultivo (Tabla 1), se añadieron los péptidos específicos a concentración final 1μM, 25UI/mL de IL-2 y toxoide tetánico a concentración final 0.5μM. La suspensión se pipeteó en placas de 96 pocillos de fondo en U y se incubó durante 10 días a 37°C y a atmósfera de CO₂ al 5%. El toxoide tetánico se añadió para activar las células T helper y crear un ambiente propicio de citoquinas para la expansión de las células CD8⁺ VHC específicas. La IL-2 se añadió al cultivo para permitir la proliferación celular. La IL-2 es la tercera señal necesaria para la activación de la célula T, además de la activación del TCR y la coestimulación positiva. Estas dos señales inducen la expresión del gen del receptor de la IL-2 (CD25) después de la interacción entre el TCR y el complejo HLA-I/epítomo.

Al cultivo celular de las células de 35 sujetos (18 con IR y 27 con IP) se añadió 2μg/mL de Ac anti-PD-L1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para bloquear la unión PD-1/PD-L1. Además en 13 casos con IP y 11 con IR se bloqueó la apoptosis añadiendo al medio el inhibidor de pancaspasas z-VAD-fmk a concentración final 50μM (BD Bioscience, San Jose, CA).

Para estos experimentos, las células se cultivaron durante 10 días, tras los cuales se analizaron por Citometría de Flujo tras tinción con complejos pentaméricos y Ac anti-CD8 como se comentó previamente.

2.7. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS FRENTE AL VHC

El análisis fenotípico se realizó únicamente en los casos en los que detectamos más de 20 células específicas por cada 50.000 células T CD8⁺ tanto directamente *ex-vivo* como tras proliferación *in-vitro*.

Para incrementar la especificidad de la tinción de las células T CD8⁺ VHC específicas realizamos previamente una selección negativa de células T CD8⁺ mediante el kit II CD8⁺ T cell Isolation, según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Germany), obteniendo un porcentaje de recuperación de células CD8⁺ superior al 95%.

Tras la selección, las células T CD8⁺ se incubaron con 2µL de Ac anti-CD8-Cy5, 1µM de uno de los complejos pentaméricos frente al VHC (NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ o Core₁₃₂₋₁₄₀-PE) y 2µL de Ac anti-CD127 (Pharmingen BD, San Jose, CA) y anti-PD-1 (eBioscience Inc, San Diego, CA).

El fenotipaje se realizó directamente *ex-vivo* y en las líneas celulares obtenidas tras estimulación antígeno específica. La suspensión celular se analizó por Citometría de Flujo.

En función de la IMF obtenida, las células se clasificaron como fenotipo bajo intermedio y alto.

Para evaluar la expresión de la molécula pro-apoptótica Bim directamente *ex-vivo* y tras estimulación antigénica en presencia de z-VAD-fmk, las células T CD8⁺ VHC específicas se marcaron con complejos pentaméricos-PE y Ac anti-CD8-Cy5, como se ha descrito con anterioridad. A continuación, las células se fijaron y permeabilizaron durante 20 minutos con Citofix/Cytoperm (BD Bioscience, San Jose, CA) y se marcaron con Ac anti-Bim de conejo contra humano (Cell Signalling Technology, Beverly, MA) durante 45 minutos y un Ac secundario de cabra anti-conejo IgG2 Alexa 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 30 minutos. Finalmente las células se lavaron dos veces con solución de lavado y se analizaron por Citometría de Flujo.

2.8. PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN- γ

Para analizar la capacidad de producción de IFN- γ por las células citotóxicas VHC específicas, se estimularon 1×10^6 CMSP/mL en RPMI 1640 suplementado con 10% STF con 2µM del péptido NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ durante 15 horas a 37°C en presencia de 10 µg/mL de Brefeldina A (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO) durante las últimas 11 horas. Tras lavar las células, se marcaron con complejos pentaméricos (HLA-A2 / NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅) y Ac anti-CD8-Cy5 como anteriormente se ha comentado. Tras la incubación y un nuevo lavado, las células se fijaron y permeabilizaron con 250µL de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 20 minutos a 4°C. Tras lavar la suspensión celular, se añadieron 7µL de Ac anti-IFN- γ conjugado con FITC

(Pharmingen BD, San Jose, CA) y se incubaron durante 45 minutos a Ta. Finalmente las células se volvieron a lavar y se analizaron por Citometría de Flujo.

2.9. EVALUACIÓN DE MUTACIONES DE ESCAPE

En sujetos seleccionados con IP, con células Pent⁺ detectables directamente *ex vivo*, en los que se evaluó la expresión de PD-1 y CD127, se realizó la secuenciación de los epítomos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ del VHC para descartar la presencia de mutaciones de escape en las regiones de anclaje al HLA-A2 o en los residuos de contacto con el TCR. La amplificación se realizó mediante PCR anidada a partir del RNA obtenido de 140µL de sueros crioconservados. La extracción del RNA viral se efectuó con el kit QiaAmp HCV-RNA (Qiagen, Valencia, CA), según instrucciones del fabricante y se eluyó en 50µL de agua libre de RNAasa (tratada con DEPC al 1‰).

La cantidad de RNA extraído se calculó en función de la absorbancia (A) de la muestra, medida en un espectrofotómetro (Espectra MR Dynex Technologies), según la siguiente expresión: 1 unidad de A ($A_{260nm} - A_{320nm}$) = 40µg/mL de RNA puro. Las cantidades de RNA viral que obtuvimos oscilaban entre 1-3µg/mL. La pureza de la muestra se determinó calculando el cociente A_{260}/A_{280} , que en todos los casos estuvo comprendido entre 1.7-1.9 indicando la baja contaminación de las muestras con DNA y proteínas.

El RNA extraído se transcribió a DNAc empleando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, Foster City, CA.) y una mezcla de hexámeros como cebadores. La mezcla de reacción estaba compuesta por RNA (2µg), hexámeros (2.5µM), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs 250µM), inhibidor de RNAasa (0.4U/µL) y transcriptasa inversa MultiScribe (1.25U/µL) en un volumen final de 25µL. El programa empleado para la retrotranscripción (RT) fue el siguiente:

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 seg	∞

Una vez que el RNA había sido transcrito a DNAc se realizaron las siguientes reacciones de PCR.

Primera PCR:

- 4 μ L DNAC.
- 5 μ L solución tamponada para PCR (10x) (Tabla 1).
- 2.5 mM de cada uno de los cuatro dNTPs.
- 0.2 μ M primers.
- 5 μ L magnesio 25mM.
- 1.5 UI Taq DNA polimerasa.
- Hasta 50 μ L de H₂O DEPC (1^o/₁₀₀).

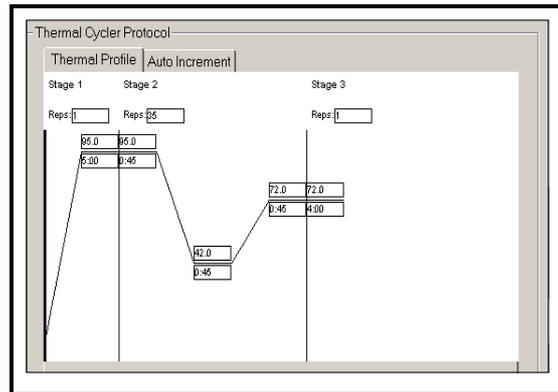


Fig. 17. Parámetros de las condiciones utilizadas en la “nested PCR”.

Los reactivos utilizados fueron de Applied Biosystems, Foster City, CA. La reacción se llevó a cabo en el termociclador ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA), las condiciones de la PCR fueron las que se muestran en la figura 17 y los primers utilizados se detallan en la Tabla 2.

Segunda PCR:

Fue realizada con 1 μ L del producto obtenido en la primera PCR y las mismas cantidades y condiciones descritas anteriormente.

Tabla. 2 Descripción de la secuencia de los primers utilizados para la amplificación y secuenciación de las regiones NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ del RNA del VHC

Epítipo	PCR	Secuencia (5'-3')	Amplicón
NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅	Primera	Forward: ACGTACTCCACCTACGGCAA Reverse: AGGTAGGGTCAAGGCTGAA	289pb
	Segunda	Forward: ATCCCAACATCGAGGAGGT Reverse: TTGCAGTCTATCACCAGTC	
NS3 ₁₀₇₃₋₁₀₈₁	Primera	Forward: GCYTGCCCGTCTCYGCCCG Reverse: CGGCGCACSGGAATGACATCG	317pb
	Segunda	Forward: CGGCSTACKCCCARCAGACGMGAGGCC Reverse: CCTCGTGACCARGTAAAGGTCC	

pb: pares de bases. A: Adenina. C: Citosina. G: Guanina. T: Timina Y: C ó T. S: C ó G. K: G ó T. M: A ó C

La especificidad de las amplificaciones se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Tris Buffer EDTA (TBE) (Tabla 1), teñido con Bromuro de Etidio (BrEt). Posteriormente se visualizaron los productos de PCR con un transiluminador (ImageQuant 350, GE Healthcare) (Fig.18).

El DNA obtenido se purificó con el kit Genclean® Turbo (MP Biomedicals LLC, Ohio) según las instrucciones del fabricante. Este DNA se secuenció con el kit Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing y el secuenciador Abi 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá.

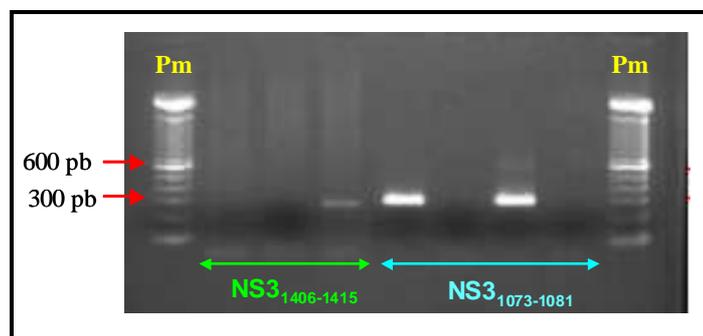


Fig. 18. Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra la amplificación de las regiones NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁, amplicones de 289pb y 317pb respectivamente. Pm: marcador de peso molecular. pb: pares de bases.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

En primer lugar se describieron las diferentes variables del estudio en los distintos grupos. Para describir las variables cuantitativas se evaluó primeramente si las distribuciones de estas variables, según los dos grupos definidos por la variable independiente (grado de control viral), seguían una distribución normal mediante la aplicación del test de Kolmogórov-Smirnov. La homogeneidad de varianzas entre grupos se analizó mediante el test de Levene.

Las variables cuantitativas normales se describieron mediante su media y su desviación estándar. Las variables que no siguieron una distribución normal se resumieron mediante su mediana y amplitud intercuartil.

Las variables categóricas se describieron mediante su distribución de frecuencias en los distintos grupos definidos por las categorías de la variable independiente.

3.2. ESTADÍSTICA INFERENCIAL

Todas las pruebas realizadas fueron bilaterales y a partir de un nivel de significación $p < 0.05$ se consideró un resultado estadísticamente significativo.

Se realizó un análisis univariante para la comparación de las distintas variables del estudio en los dos grupos. Se utilizaron test no paramétricos para las distintas comparaciones. El test de Wilcoxon se empleó para la comparación de dos muestras relacionadas y el test U de Mann-Whitney para la comparación de dos muestras independientes. Para la comparación de varias muestras independientes se utilizó el test de Chi cuadrado de Pearson. El análisis de la correlación entre dos variables independientes continuas se realizó mediante el índice de correlación de Spearman.

3.3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Puesto que la aportación novedosa de nuestro estudio se centraba en la valoración de la situación pro-apoptótica de las células T CD8⁺ VHC específicas, elegimos las variables IMF de Bim y porcentaje de expansión tras bloqueo de la apoptosis para calcular el tamaño muestral necesario para desarrollar nuestro estudio.

Para calcular el tamaño muestral suficiente para demostrar la posible diferencia de expresión de la molécula Bim en las células T CD8⁺ VHC específicas en los dos grupos del estudio, se utilizó una prueba Z bilateral para la comparación de dos medias independientes. Estimamos la varianza de esta variable basándonos en datos publicados sobre el estudio de la expresión de Bim en células T CD8⁺ VHB específicas en la infección por VHB (274). En este trabajo la varianza de la expresión de Bim en IP fue de 22.1 y en IR de 1.9. La media de la expresión de Bim en estas células fue de 52.3 en el grupo con IP. Suponiendo que en la infección por VHC existiera una varianza similar en los sujetos de nuestro estudio, consideramos que para detectar una mínima diferencia de 5 unidades de fluorescencia entre los grupos IP e IR necesitaríamos al menos 8 pacientes en cada grupo, aceptando un error alfa del 5% y un error beta del 20%.

Para estimar el tamaño muestral necesario para analizar diferencias en la capacidad de expansión clonal *in-vitro* de las células T CD8⁺ VHC específicas de sujetos con IP ante estimulación específica tras el bloqueo o no de la vía de la apoptosis, se utilizó una prueba Z bilateral para comparación de dos proporciones independientes. Basándonos de nuevo en el trabajo de Lopes y col. en la infección por VHB, sabíamos que el 25% de los sujetos con IP eran capaces de expandir en condiciones normales. Sí suponíamos que en los pacientes con IP por VHC de nuestro estudio ocurría lo mismo,

esperando una diferencia entre el porcentaje de expansión tras el bloqueo de la apoptosis del 50%, asumiendo un error alfa del 5% y un error beta del 20% calculamos que necesitábamos al menos 14 pacientes por grupo.

Teniendo en cuenta los cálculos previamente comentados, se reclutaron de forma consecutivas pacientes con infección por VHC HLA-A2⁺ crónica o resuelta tras tratamiento antiviral hasta alcanzar la cifra de catorce pacientes por grupo en los que se hubieran realizado estos experimentos. No obstante, el número de pacientes reclutados fue mucho mayor para obtener una elevada consistencia en el resto de las variables fenotípicas y funcionales comparadas.

IV. RESULTADOS

1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA RECuento DE CÉLULAS T CD8⁺ NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ Y CORE₁₃₂₋₁₄₀ ESPECÍFICAS

Cuantificamos las células T CD8⁺ VHC específicas frente a los epítomos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ y Core₁₃₂₋₁₄₀ del VHC mediante la tinción con complejos pentaméricos HLA-A2/péptido y Ac anti-CD8 marcados con PE y Cy5 respectivamente. El límite de detección de la técnica se analizó previamente a su utilización en nuestro estudio. Para definir la sensibilidad mínima de la misma se utilizó un grupo de 10 sujetos con IP por VHC con haplotipo HLA-A2⁻ que fue nuestro control negativo.

Se consideró que un resultado era negativo si era inferior a la media de la frecuencia en sangre periférica o intrahepática de células CD8⁺ VHC específicas (Pentámero⁺, Pent⁺) detectadas en el grupo control negativo más dos veces el error típico de la media. Según esta definición el punto de discriminación fue de 10 células CD8⁺/ Pent-NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, Pent-NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁, Pent-Core₁₃₂₋₁₄₀ positivas por cada 50.000 células T CD8⁺ de sangre periférica o hígado (0.02%).

Esta técnica se mostró extremadamente específica, como se señala en la figura 19. En esta figura se observa cómo la tinción con los complejos pentaméricos HLA-A2/péptido es capaz de detectar células citotóxicas específicas, en este ejemplo, contra el epítomo NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ del VHC, tras estimulación específica con el péptido NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅. Sin embargo, no detecta células citotóxicas cuando se estimulan las CMSP con el péptido del citomegalovirus, CMV pp65₄₉₅₋₅₀₄.

Para continuar analizando la sensibilidad y especificidad de esta técnica, también se generaron clones de células T específicas contra el epítomo VHC NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y contra el epítomo CMV pp65₄₉₅₋₅₀₄, siguiendo la metodología de dilución límite (282). La tinción del clon NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ específico con Ac anti-CD8-Cy5 y con complejos pentaméricos HLA-A2/ NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ mostró que el 95% de las células eran doble positivas, es decir, la tinción con este complejo pentamérico era capaz de reconocer prácticamente la totalidad de las células del clon, lo que demostraba su elevada sensibilidad. Sin embargo, cuando teñimos el clon específico para el epítomo CMVpp65₄₉₅₋₅₀₄ del CMV con el complejo pentamérico HLA-A2/NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ más Ac anti-CD8-Cy5, sólo el 1% de las células fue doble positiva. Esto demostró que la tinción con esta molécula era específica para las células CD8 que expresan el TCR adecuado (Fig.20).

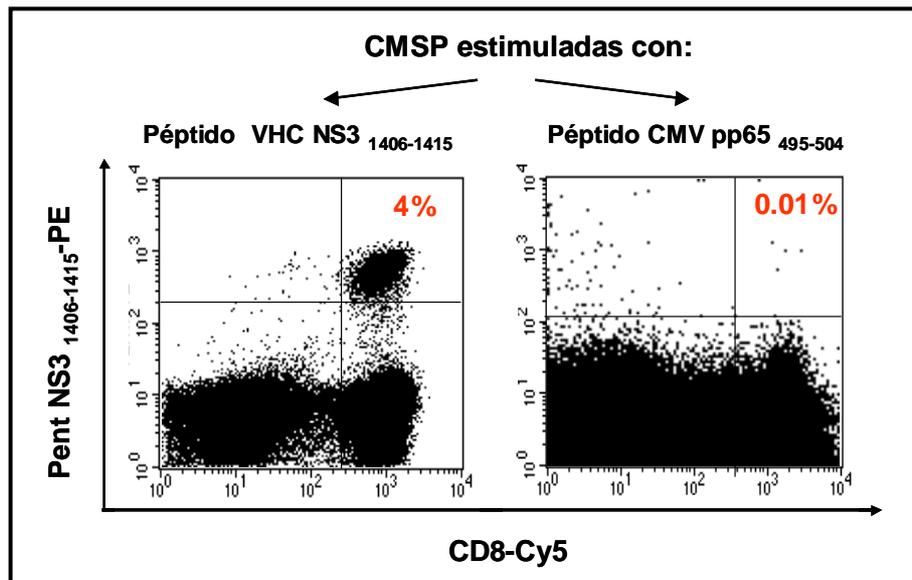


Fig. 19. Gráficos de puntos que muestra la especificidad de los complejos pentaméricos para detectar las células $CD8^+$ Pent- $NS3_{1406-1415}$ específicas en dos líneas celulares de un mismo sujeto. En las CMSP estimuladas con el péptido $NS3_{1406-1415}$ se detecta una población de células doble positivas ($CD8^+/Pent-NS3_{1406-1415}^+$) que no se detecta tras estimular estas células con el péptido $pp65_{495-504}$ del CMV. CMSP: Células mononucleares de sangre periférica. CMV: Citomegalovirus.

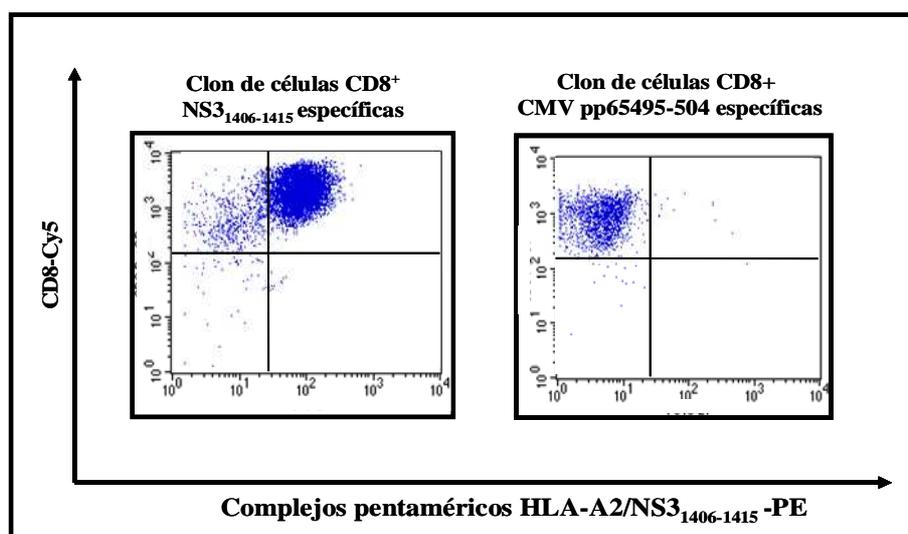


Fig. 20. Gráfico de puntos de la tinción de los clones $NS3_{1406-1415}$ y CMV $pp65495-504$ específicos con los complejos pentaméricos HLA-A2/ $NS3_{1406-1415}$ más anticuerpos anti-CD8. En el clon $NS3_{1406-1415}$ se observa una población doble positiva que no existe en el clon CMV $pp65495-504$.

2. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO.

En este apartado se comparan las características fenotípicas y funcionales de las células CD8⁺/Pent⁺ según el grado de control viral, con especial atención al papel de las moléculas PD-1, CD127 y Bim.

En primer lugar, se describen las covariables del estudio en los dos grupos comparados (IP e IR). En la Tabla 3 se resumen estas variables junto a los valores p de los distintos índices estadísticos de las comparaciones realizadas con respecto a la variable dependiente (grupo clínico).

Las características de la respuesta citotóxica específica fue la variable dependiente de este estudio. Esta variable se evaluó mediante el estudio de la frecuencia, fenotipo (PD-1, CD127 y Bim) y capacidad efectora (expansión clonal y producción de IFN- γ) de las células CD8⁺/Pent⁺ y se comparó según el grado de control viral (variable independiente).

2.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS GRUPOS COMPARADOS.

En el estudio transversal se analizaron 94 sujetos HLA-A2⁺ genotipo 1 con serología para VHC positiva repartidos en dos grupos según el grado de control viral. De estos 94 sujetos, 18 presentaban infección resuelta (IR) tras tratamiento con IFN pegilado α -2b más ribavirina, caracterizados por una concentración sérica de ALT inferior al límite alto de la normalidad y CV del VHC indetectable; y 76 sujetos con infección persistente (IP) con una concentración sérica de ALT > 40 UI/L y CV del VHC > 1.000 UI/mL. Además, otros 10 sujetos formaron un grupo control negativo (descritos en el punto 1 de este apartado), definido así por tratarse de sujetos con IP por VHC HLA-A2⁻ y otros 10 sujetos integraban el grupo control positivo, que eran aquellos sujetos HLA-A2⁺ que tras previo contacto con el VHC habían controlado de forma natural la infección (sujetos con inmunidad natural). Todos los sujetos dieron su autorización para participar en el estudio, firmando el correspondiente consentimiento informado.

Todos los grupos eran similares respecto a las principales características demográficas (Tabla 3). La edad media se situó en la cuarta década, oscilando entre los 38 años del grupo control negativo y los 47 del grupo control positivo. La distribución del sexo masculino fue predominante en todos los grupos.

La vía de contagio estimada no fue diferente en los distintos grupos. La principal causa de contagio fue la parenteral, aunque entre un 40%-70% de los casos, según el grupo, no se identificó una potencial vía de contagio.

Obviamente, la concentración sérica de ALT en el grupo con IP estaba aumentada considerablemente respecto a la concentración del grupo control positivo y del grupo con IR ($p < 0.001$).

De igual manera, la CV del VHC de todos los sujetos con IR era < 40 UI/mL (límite de detección de la técnica), mientras que en el grupo con IP y en el control negativo, el valor medio de CV estaba alrededor de 2×10^6 UI/mL ($p < 0.001$).

El tiempo de evolución de la enfermedad fue similar en todos los grupos estudiados. El grado de inflamación y de fibrosis hepática también fue equivalente en todos los grupos en los que se realizó biopsia hepática.

En resumen, estos datos muestran que existe homogeneidad en las variables clínicas demográficas entre los grupos comparados con excepción de las variables que definen los grupos (CV del VHC y concentración sérica de ALT).

Tabla 3. Características clínicas de los sujetos del estudio

	Infección Resuelta n=18	Infección Persistente n=76	Control Negativo n=10	Control Positivo n=10	Valor p
<i>Edad: años cumplidos</i>					
Media	41	47	38	47	0.08
DE	7	9.16	7.1	8.4	
<i>Sexo: n (%)</i>					
Masculino	12 (66)	52 (68)	6 (60)	6 (60)	0.43
<i>IMC (kg/m²)</i>					
Media	25.3	25.6	23.7	23.3	0.09
DE	1.8	2.7	3.8	1.03	
<i>Vía de contagio: n (%)</i>					
Sexual	0 (0)	4 (5.2)	0 (0)	0 (0)	
Desconocida	8 (44.4)	30 (39.7)	6 (60)	7 (70)	0.81
Parenteral	10 (55.5)	42 (55.1)	4 (40)	3 (30)	
<i>ALT sérica (UI/L)</i>					
Media	42.1	92.8	67.3	43.8	<0.001
DE	19.2	54.5	32.4	14.3	
<i>Tiempo de evolución (años)</i>					
Media	25.25	27.28	25.7	26.3	0.11
DE	7.17	15.7	16.4	2.3	
<i>Carga viral VHC (UI/mL) x 10⁶</i>	<40	2.12±4.19	1.9±3.8	<40	<0.001
<i>Histología Hepática*: Media ± DE</i>					
Actividad Lobulillar	1.82±0.67 [†]	1.97±0.6	2±0.89 [†]	ND	0.11
Actividad Portal	2.11±0.56 [†]	2.21±0.6	2.17±0.98 [†]	ND	0.24
Fibrosis	1.14±0.45 [†]	1.8±0.7	2±0.89 [†]	ND	0.79

Las variables se describen como la media ± la desviación estándar (DE) o el porcentaje.

*Histología Hepática descrita de acuerdo con el índice de Scheuer. [†]Datos de Histología Hepática antes del tratamiento antiviral. ND: No disponible.

2.2. FRECUENCIA DE CÉLULAS CD8⁺ PENTÁMERO⁺

Los datos de frecuencia, fenotipo y funcionalidad de las células Pent⁺ para los tres epítomos estudiados se describen individualmente, aunque el análisis estadístico se realiza agrupando en una sola variable la respuesta contra los distintos epítomos para aumentar el tamaño muestral. En cada caso se realizó de uno a tres experimentos dependiendo del número de epítomos analizados en cada individuo. En el análisis estadístico cada experimento realizado fue valorado como un caso independiente. La proporción de células Pent⁺ y su intervalo de confianza al 95% para cada epítomo se describen en la Tabla 4.

El porcentaje de experimentos con células Pent⁺ detectables en sangre periférica de sujetos pertenecientes al grupo control positivo (inmunidad natural) fue del 0-66% dependiendo del epítomo, con un porcentaje medio de 20% y una frecuencia media de 0.046% (IQR: 0.02) en los casos con células detectables.

En los sujetos con IP, el porcentaje de experimentos de sujetos con células Pent⁺ detectables en sangre periférica frente a los diferentes epítomos fue del 8.3-28% dependiendo del epítomo, con un porcentaje medio del 18% y una frecuencia media de 0.046% (IQR: 0.07) del total de células CD8⁺, no existiendo diferencias con el grupo control positivo (p=0.61). Sin embargo, entre el 66 y el 89% de los experimentos realizados con células intrahepáticas de estos mismos sujetos presentaban células Pent⁺ frente a los diferentes epítomos, con un porcentaje medio del 77% de los experimentos y una frecuencia media intrahepática de 0.36% (IQR: 3.7) (p<0.001). (Fig.21A y 21B) (Tabla 4).

En los sujetos con IR la frecuencia de experimentos con células Pent⁺ frente a los diferentes epítomos en sangre periférica era también muy baja, entre un 14-22% dependiendo del epítomo testado, con un porcentaje medio del 20% y una frecuencia media de 0.056% (IQR: 0.05) del total de células CD8⁺, porcentaje similar al observado en sujetos con IP (p=0.51) y en controles positivos (p=0.66) (Fig.21A y 21B) (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de pacientes con células pentámero⁺ detectables contra tres epítomos inmunodominantes del VHC directamente *ex-vivo* y frecuencia de estas células en los pacientes con células pentámero⁺ detectables

		Todos los epítomos	NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅	NS3 ₁₀₇₃₋₁₀₈₁	Core ₁₃₁₋₁₄₀	Valor de p
HÍGADO	Nº de casos analizados (n)	31	19	9	3	↑
	Casos con células Pent ⁺ detectables (n;%)	24 (77%)	14 (74%)	8 (89%)	2 (66%)	
	†Frecuencia de células Pent ⁺ del total de CD8 ⁺ (%)	0.36 (IQR 3.7)	0.21 (IQR 3.9)	2.1 (IQR 3.8)	0.20 (IQR 3.8)	
IP						<0.001*
SP	Nº de casos analizados (n)	127	76	39	12	↑
	Casos con células Pent ⁺ detectables (n;%)	23 (18%)	11(14%)	11 (28%)	1 (8.3%)	
	†Frecuencia de células Pent ⁺ del total de CD8 ⁺ (%)	0.046 (IQR 0.07)	0.048 (IQR 0.04)	0.07 (IQR 0.09)	0.08 (IQR 0.05)	
						NS*
IR	Nº de casos analizados (n)	40	18	15	7	↓
	Casos con células Pent ⁺ detectables (n;%)	8 (20%)	4 (22%)	3 (20%)	1 (14%)	
	†Frecuencia de células Pent ⁺ del total de CD8 ⁺ (%)	0.056 (IQR 0.05)	0.064 (IQR 0.08)	0.054 (IQR NA)	0.05 (IQR NA)	

IP: Infección Persistente por VHC . IR: Infección Resuelta por VHC. SP: Sangre *Tests Chi cuadrado de Pearson. NA: no aplicable debido al tamaño muestral. Pent: pentámero. †Frecuencia media de células pentámero⁺ en pacientes con células detectables. El límite de detección de la técnica fue de 10 células de 5×10^4 CD8⁺.

2.3. EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE SUPERFICIE PD-1/CD127 EN CÉLULAS CD8⁺ PENTÁMERO⁺.

En aquellos sujetos con células Pent⁺ detectables se analizó la expresión de PD-1 y CD127 directamente *ex-vivo*. Además, se analizó en paralelo la respuesta citotóxica contra el CMV como control positivo en los casos con células CMV-específicas detectables, ya que esta infección se caracteriza por el desarrollo de una respuesta citotóxica capaz de controlar la infección.

Los datos en conjunto de los 3 epítomos muestran que en el grupo control positivo la IMF de PD-1 en las células Pent⁺ de sangre periférica fue de 7.8 (IQR: 10.3). En sujetos con IP la IMF de PD-1 en las células Pent⁺ del hígado fue de 110 (IQR: 106), más elevada que la media observada en sangre periférica, que fue de 30 (IQR: 37.1) (p=0.014). Sin embargo, en los sujetos con IR la IMF de PD-1 de éstas células en sangre periférica fue de 6.5 (IQR: 7.03) menor que la observada en los sujetos con IP (p=0.003) (Tabla 5), pero similar a la observada en células de sangre periférica Pent⁺ frente al CMV cuyo valor fue de 8.6 (IQR: 8.3) en sujetos con IP (Fig.21C y Fig. 22) (Tabla 5).

Los resultados para la expresión de la molécula CD127 presentaron una situación inversa a los observados para la expresión de PD-1. En sujetos con IP la IMF de CD127 en células hepáticas fue más baja, 5.1 (IQR: 1.2), que en sangre periférica, 11.5 (IQR: 11.7) (p=0.007). Por otro lado, la expresión de CD127 en sangre periférica

en sujetos con IR fue mayor, 33.6 (IQR: 14.5), que en sujetos con IP ($p=0.014$) (Tabla 5), siendo similar a la que expresan las células CMV específicas, 11.3 (IQR: 25) de sujetos con IP (Fig.21D Fig. 22). Estos datos sugieren que la infección por VHC induce la expresión de PD-1 y disminuye la de CD127, afectando esta modulación sólo a las células VHC específicas. En los controles positivos no se evaluó la expresión de CD127.

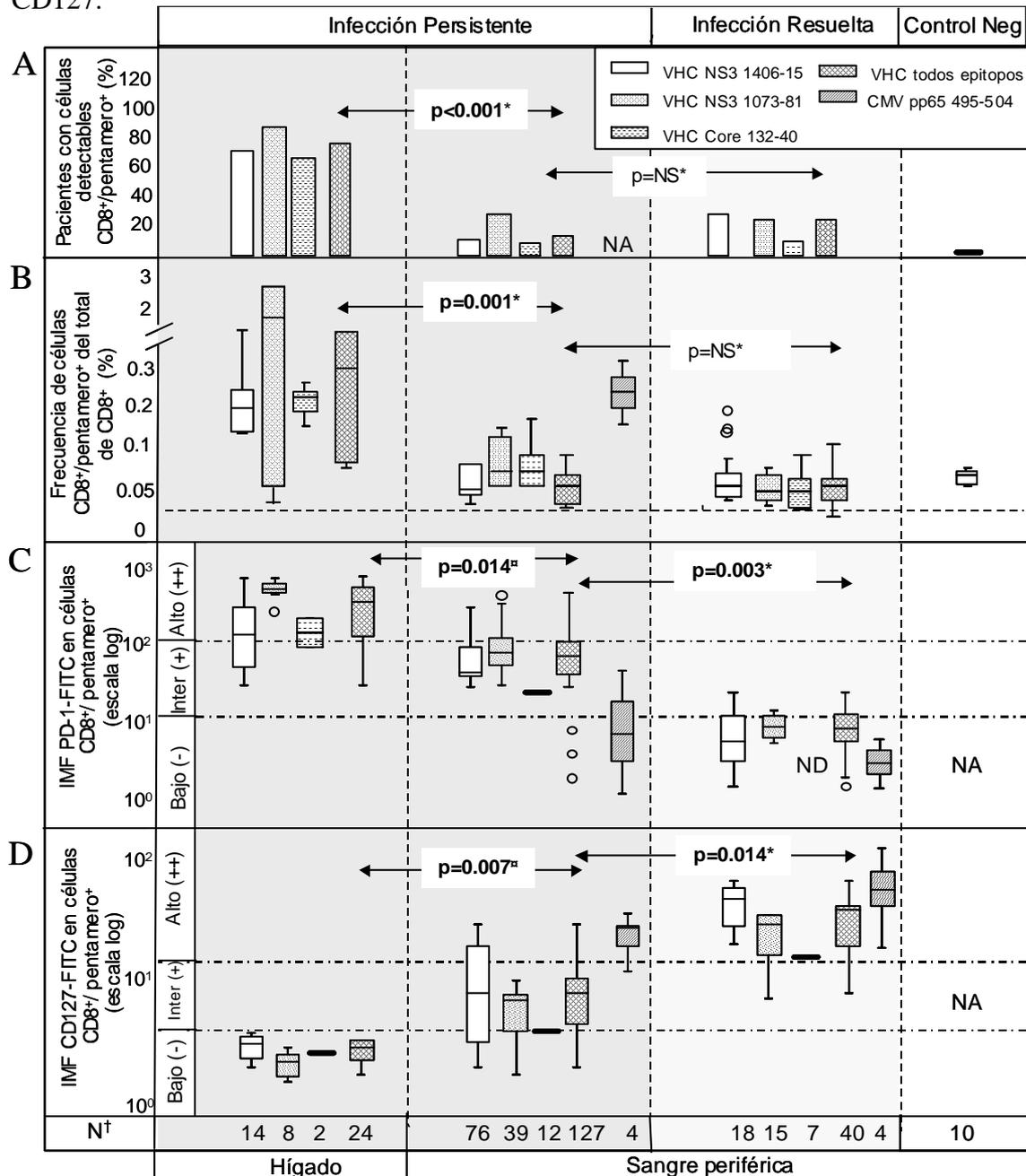


Fig. 21. Análisis directamente *ex-vivo* de la frecuencia y fenotipo PD-1/CD127 en las células CD8⁺ VHC específicas según el grado de control de la infección.

(A) Diagrama de barras y (B) diagrama de caja que muestran el porcentaje de sujetos con células Pent⁺ y su frecuencia en hígado y sangre periférica de sujetos con IP, IR y controles negativos. Se muestran tres epítomos inmunodominantes de VHC y un epítomo del CMV. (C y D) Diagramas de caja que muestran la IMF para la tinción con Ac anti-PD-1 y anti-CD127 marcados con FITC en las células Pent⁺ en los dos grupos de sujetos. Inter: Intermedio. Neg: Negativo. NA: no aplicable. ND: No disponible. NS: No significativo. O: Outlier. Log: Logarítmica. ^{ns} Test de Wilcoxon. * Test U de Mann-Whitney. [†] Número de casos estudiados para cada epítomo.

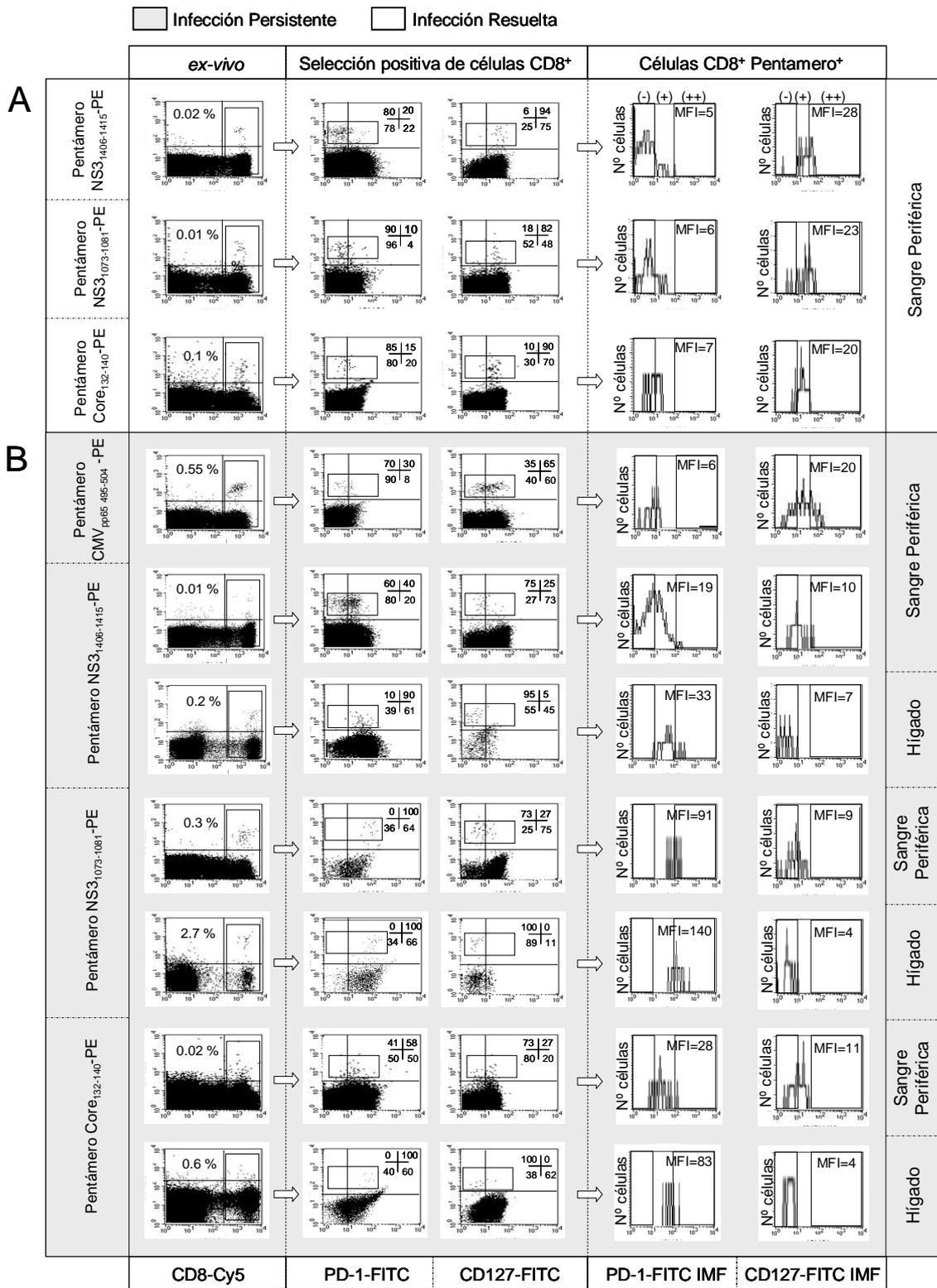


Fig. 22. Análisis directamente *ex-vivo* de la frecuencia y fenotipo PD-1/CD127 en las células CD8⁺ VHC específicas según el grado de control de la infección.

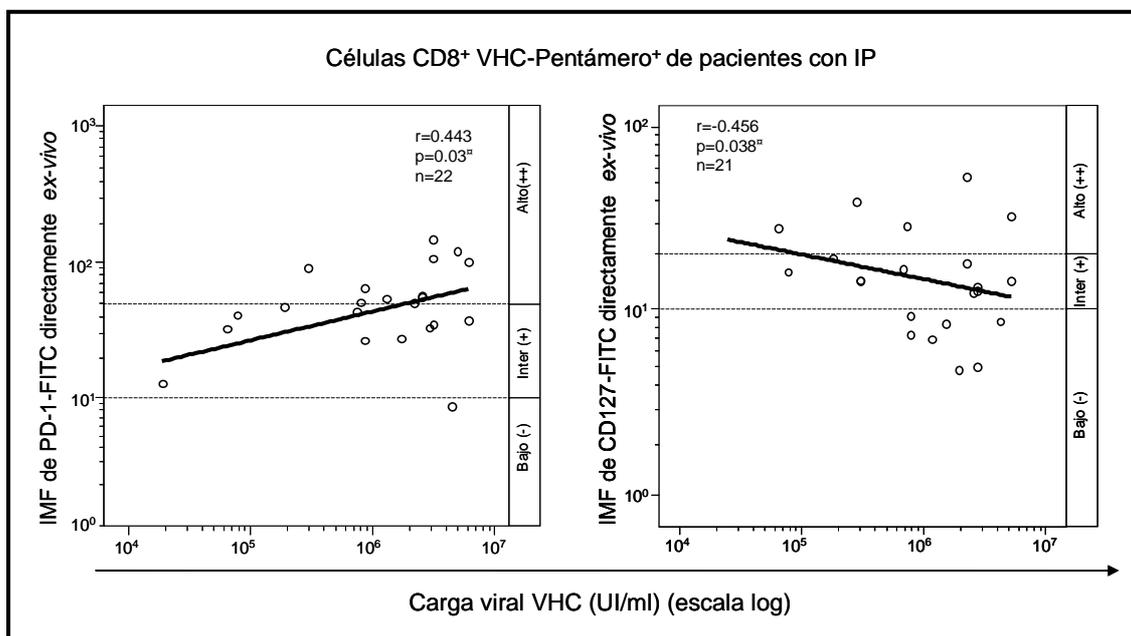
Diagrama de puntos de células mononucleares de sangre periférica e hígado marcados con Ac anti CD8-Cy5, Pentámeros-PE, PD1-FITC y CD127-FITC. Los diagramas muestran los resultados de un sujeto con IP (A) y otro con IR (B), siendo representativos de los datos obtenidos en todos los sujetos de ambos grupos.

Tabla 5. Valores de IMF de PD-1 y CD127 directamente *ex-vivo* en sangre periférica e hígado de los dos grupos de sujetos.

			NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅	NS3 ₁₀₇₃₋₁₀₈₁	Core ₁₃₂₋₁₄₀	Todos los epitopos
Infección Persistente	PD-1	SP	26 (50)	38.8 (46)	8.18 (-)	30 (37.1)
		HÍGADO	47.9 (76)	148 (31)	96 (-)	110 (106)
	CD127	SP	18 (26)	5.4 (8.7)	ND	11.5 (11.7)
		HÍGADO	5.6 (0.86)	4.9 (1.30)	ND	5.1 (1.2)
Infección Resuelta	PD-1	SP	5.4 (4.3)	10.9 (6.8)	ND	6.5 (7.03)
	CD127	SP	38.4 (12.4)	21.6 (18.8)	19 (-)	33.6 (14.5)

Los valores se describen como la mediana y rango intercuartil. En los grupos en los que no había suficientes sujetos no se muestra el rango intercuartil. SP: Sangre periférica. ND: No disponible

Esta diferencia de expresión de PD-1 y CD127 según el grado de control viral, quedó reflejada en la correlación existente entre la expresión de las moléculas PD-1 y CD127 con la CV del VHC, en los pacientes con IP. Concretamente, se observó una correlación positiva y negativa entre el logaritmo de la CV del VHC y la expresión de PD-1 ($r=0.443$; $p=0.03$) y CD127 respectivamente ($r=-0.456$; $p=0.038$) (Fig.23).

**Fig. 23.** Análisis directamente *ex-vivo* de la correlación entre la CV del VHC y la expresión de las moléculas PD-1 y CD127 en pacientes con infección persistente.

Diagramas de puntos que muestra la correlación entre la CV del VHC y la IMF tras tinción de las células Pent⁺ con Ac anti PD-1 y CD127 marcadas con FITC. IMF: Intensidad media de fluorescencia. CV: Carga viral. Log: Logarítmica. Inter: Intermedio. IP: Infección persistente. ^aCoefficiente de correlación de Spearman.

2.4. FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS CD8⁺ PENTÁMERO⁺

Tras la demostración de una expresión diferencial de las moléculas PD-1 y CD127 en función del grado de control viral, se analizó como se relacionaban estos fenotipos con la capacidad efectora de las células citotóxicas VHC específicas (capacidad proliferativa y de producción de IFN- γ tras el encuentro antigénico).

2.4.1. Capacidad de proliferación tras el encuentro antigénico:

Mientras que ninguno de los experimentos realizados en el grupo control negativo (HLA-A2⁻) presentó proliferación de las células Pent⁺ frente al VHC cuando se estimuló en presencia de los distintos epítomos virales analizados, en el grupo control positivo, el 80% (4 de 5) y 100% (5 de 5) de los casos presentaban capacidad de expansión clonal tras expansión *in-vitro* con los péptidos específicos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ respectivamente (Fig.24). Se observaron diferencias de expansión clonal en los experimentos realizados con CMSP de sujetos con IP e IR. Concretamente, se observó que el 39% (21 de 53) y 22% (5 de 22) de los experimentos con células de sujetos con IP y el 72% (13 de 18) y 82% (9 de 11) de los experimentos de casos con IR presentaban capacidad de expansión clonal tras la estimulación *in-vitro* con los péptidos específicos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ respectivamente ($p=0.018$ y $p<0.001$) (Fig.24). En su conjunto, la proporción de experimentos con expansión clonal para ambos epítomos fue mayor en sujetos con IR (76%: 22 de 29) y con inmunidad natural (90%: 9 de 10) que en sujetos con IP (34%; 26 de 75) ($p<0.001$ en ambos casos).

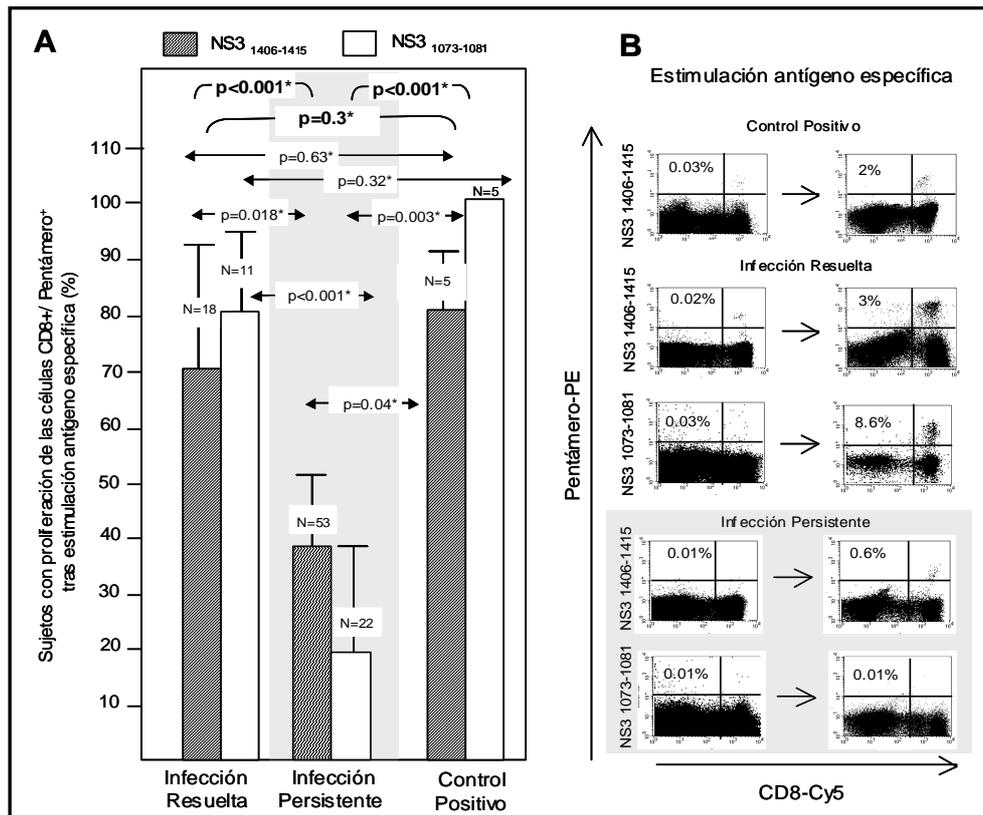


Fig. 24. Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ tras estimulación *in-vitro* antigéno específica según el grado de control viral.

(A) Diagrama de barras que muestra el porcentaje de experimentos con proliferación de las células Pent⁺ tras estimulación antigéno específica con los péptidos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅, NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ en sujetos con IP, IR e Inmunidad Natural (control positivo) Las barras de error representan 2 veces el error estándar de la media. * Test U de Mann-Whitney.

(B) Diagrama de puntos de Citometría de Flujo de células mononucleares de sangre periférica de sujetos con IP, IR y control positivo marcados con Ac anti CD8-Cy5 y Pentámeros-PE directamente *ex-vivo* y tras estimulación *in-vitro* antigéno específica de pacientes con IP e IR. Los valores situados en la parte superior izquierda representan el porcentaje de células Pent⁺ sobre el total de células CD8⁺.

2.4.2. Capacidad de producción de IFN- γ por las células CD8⁺ Pentámero⁺ tras el encuentro antigénico. Correlación con la expresión de PD-1 y CD127:

La capacidad de las células CD8⁺ Pent-NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅⁺ para producir IFN- γ tras estimulación específica *in-vitro* con el péptido NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ se evaluó en 17 sujetos (9 con IR y 8 con IP). Se observó que la frecuencia de células CD8⁺ Pent-NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅⁺ productoras de IFN- γ fue menor en los sujetos con IP (15%; IQR: 32) que en sujetos con IR (41.28%; IQR: 35.7) ($p=0.0047$) (Fig.25).

Esta expresión diferencial de IFN- γ según el grado de control viral se correlacionó con la expresión de las moléculas PD-1 y CD127. Concretamente, se observó una correlación negativa entre la producción de IFN- γ y la expresión de PD-1-FITC, medida como IMF ($r=-0.636$; $p<0.05$) y una correlación positiva con la expresión

de CD127, aunque ésta última no llegó a ser estadísticamente significativa ($r=0.430$; $p=0.333$). (Fig.26).

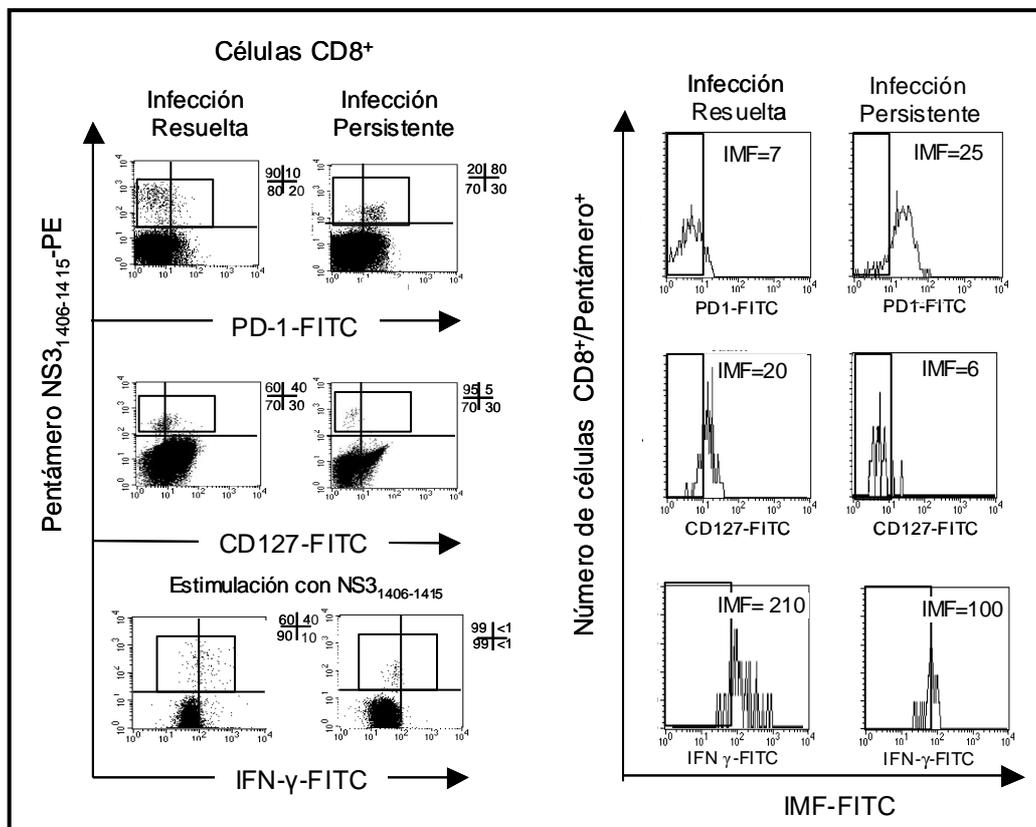


Fig. 25. Producción de IFN- γ por las células Pent⁺ tras estimulación específica *in-vitro* de acuerdo con el fenotipo PD-1/CD127.

Diagrama de puntos e histograma de Citometría de Flujo mostrando la expresión de PD-1 y de CD127 y la producción de IFN- γ por las células Pent⁺ de un paciente representativo de cada grupo (IP e IR).

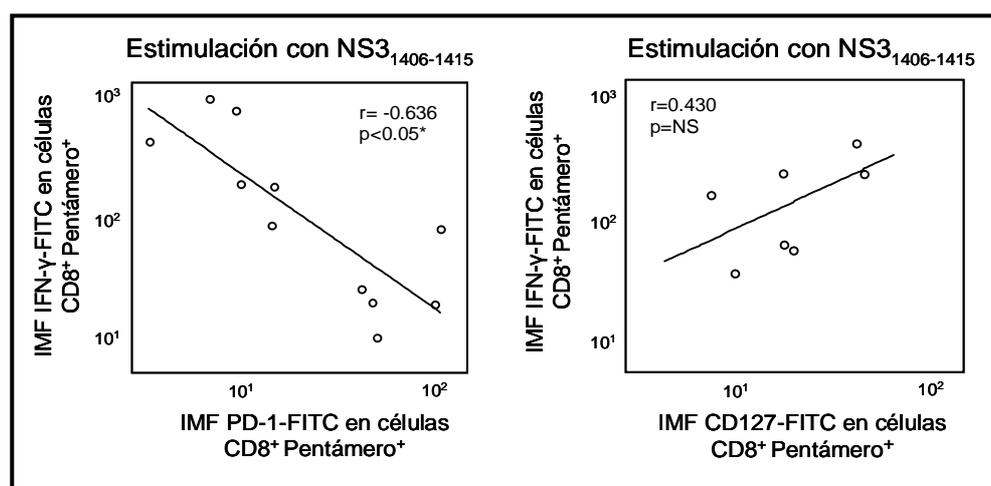


Fig. 26. Correlación entre la producción de IFN- γ por las células Pent⁺ tras estimulación específica *in-vitro* y el fenotipo PD-1/CD127.

Diagrama de puntos que muestra la correlación entre la producción de IFN- γ y la expresión de PD-1 y de CD127 en células Pent⁺ de los sujetos de estudio. FITC: Fluoresceína.* Coeficiente de correlación de Spearman.

2.4.3 Fenotipo de las células CD8⁺ Pentámero⁺ tras estimulación específica *in-vitro*.

La expresión de PD-1 y CD127 en las células Pent⁺ tras estimulación específica, fue diferente en cada grupo del estudio. La expresión de PD-1, medida como IMF, en las células Pent⁺ del grupo con IP fue significativamente mayor (32.3; IQR: 32.3) que en sujetos con IR (8.3; IQR: 8.1) ($p=0.01$) (Fig.27; Tabla 6), siendo la expresión en este último grupo similar a la observada en el grupo control positivo (inmunidad natural) (11.8; IQR: 8.14) ($p=ns$). La expresión de PD-1 en las células Pent⁺ de sujetos con IR e IP fue menor y mayor respectivamente que la observada en la población total de CD8⁺ de estos mismos sujetos ($p=0.03$ y $p=0.01$)

En las células Pent⁺ del grupo con IR la expresión de CD127 estaba regulada a la baja tras estimulación *in-vitro* ($p<0.05$) comparada con la expresión en las células CD8⁺ totales. La expresión de CD127 era similar a la observada en las células Pent⁺ del grupo con inmunidad natural (IMF: 10.4, IQR: 2.45, $p=0.35$). Estas células tras ser activadas no necesitan la IL-7 para su supervivencia, por lo que se inhibe la expresión de su receptor (CD127). Por el contrario, las células Pent⁺ de los sujetos con IP capaces de proliferar, presentaban una mayor expresión de CD127 (17.6; IQR: 17.25) tras el encuentro antigénico que las células Pent⁺ expandidas de sujetos con IR (8.1; IQR: 6.4) ($p=0.022$) (Tabla 6 y Fig.27).

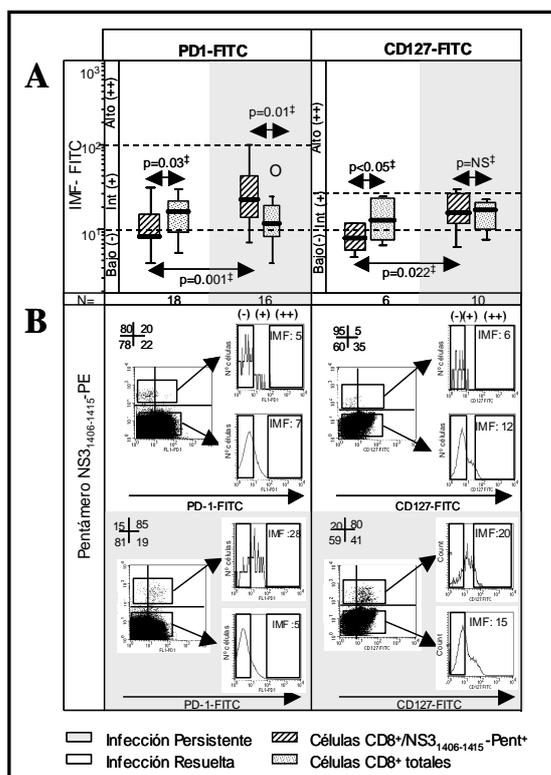


Fig. 27. Fenotipo de las células CD8⁺ / NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅-Pentámero⁺ tras estimulación específica *in-vitro*.

(A) Diagrama de cajas que muestra la IMF para el marcaje con FITC de células T CD8⁺ totales y Pent⁺ con Ac contra PD-1, CD127, NS: No significativo. ‡ Test U de Mann-Whitney. IMF: Intensidad media de fluorescencia. N: Número de pacientes. O: outlier. FITC: Fluoresceína.

(B) Diagramas de puntos de Citometría de flujo mostrando el fenotipo PD-1/CD127 de las células Pent⁺ e histogramas de células CD8⁺ totales y Pent⁺ que muestran la IMF para la tinción con los Ac anti- PD-1 y anti-CD127 marcados con FITC. Los cuadrantes de la parte superior derecha de todos los diagramas de puntos representan el porcentaje de células CD8⁺ totales y Pent⁺ positivas y negativas para los distintos marcajes.

Tabla 6. Valores de IMF de PD-1 y CD127 tras estimulación específica *in-vitro* en las CD8⁺ Pent-NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅⁺ y en la población total de CD8⁺ en los dos grupos de estudio (IP, IR e Inmunidad Natural).

		PD-1	CD127
Infeción Persistente	Pent-NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅ ⁺	32.3 (32.3)	17.6 (17.2)
	CD8 ⁺ totales	13 (16.09)	18.9 (8.4)
Infeción Resuelta	Pent-NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅ ⁺	8.3 (8.1)	8.1 (6.4)
	CD8 ⁺ totales	16.4 (9.8)	12.8 (13.4)
Inmunidad Natural	Pent-NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅ ⁺	11.8 (8.1)	10.4 (2.4)
	CD8 ⁺ totales	18.1 (16)	23.9 (1.28)

La IMF se describe como mediana y rango intercuartil.
IMF: Intensidad media de fluorescencia.

2.5. RELACIÓN ENTRE FENOTIPO PD-1/CD127 DIRECTAMENTE EX-VIVO Y CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN

Se evaluó el fenotipo PD-1/CD127 y la capacidad de proliferación en los casos con células Pent⁺ detectables directamente *ex-vivo*.

Tras el análisis de todos los experimentos realizados, se observó que, independientemente del control de la infección (IP o IR) y de la expresión de PD-1 en las células Pent⁺, existía una correlación positiva entre la expresión de CD127 y la capacidad de expansión de las células Pent⁺. Concretamente, el 83% de las células Pent⁺ CD127⁺ mostraron capacidad de proliferación, mientras que solo el 16% de las células Pent⁺ CD127⁻ fue capaz de proliferar ($p=0.001$) (Fig.28).

Tras este análisis preliminar, los experimentos se analizaron de acuerdo al grado de control viral. Todos los casos con IR con células Pent⁺ detectables presentaron un fenotipo PD-1⁻/CD127⁺, mientras que en los casos con IP se observaron dos poblaciones celulares con diferente expresión de

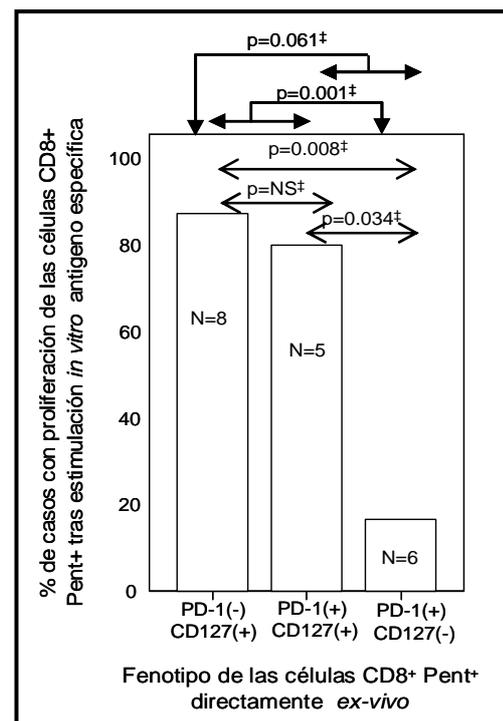


Fig. 28. Asociación entre fenotipo PD-1/CD127 directamente *ex-vivo* y la capacidad de proliferación de las células CD8⁺ Pent⁺. Diagrama de barras que muestra el porcentaje de experimentos con proliferación de las células CD8⁺ Pent⁺ de acuerdo con el fenotipo CD127/PD-1. †Test U de Mann-Whitney.

CD127 y capacidad proliferativa. Las células Pent⁺ de sujetos con IP que mantenían capacidad de proliferación tras el encuentro antigénico presentaban una expresión de CD127 mayor (IMF: 30.8; IQR: 3.8) que las células sin capacidad de proliferación (IMF: 6.04; IQR: 3.9) ($p=0.045$). Sin embargo, independientemente de la capacidad de proliferación, la expresión de PD-1 fue elevada y similar en ambos casos ($p=ns$) (Fig.29).

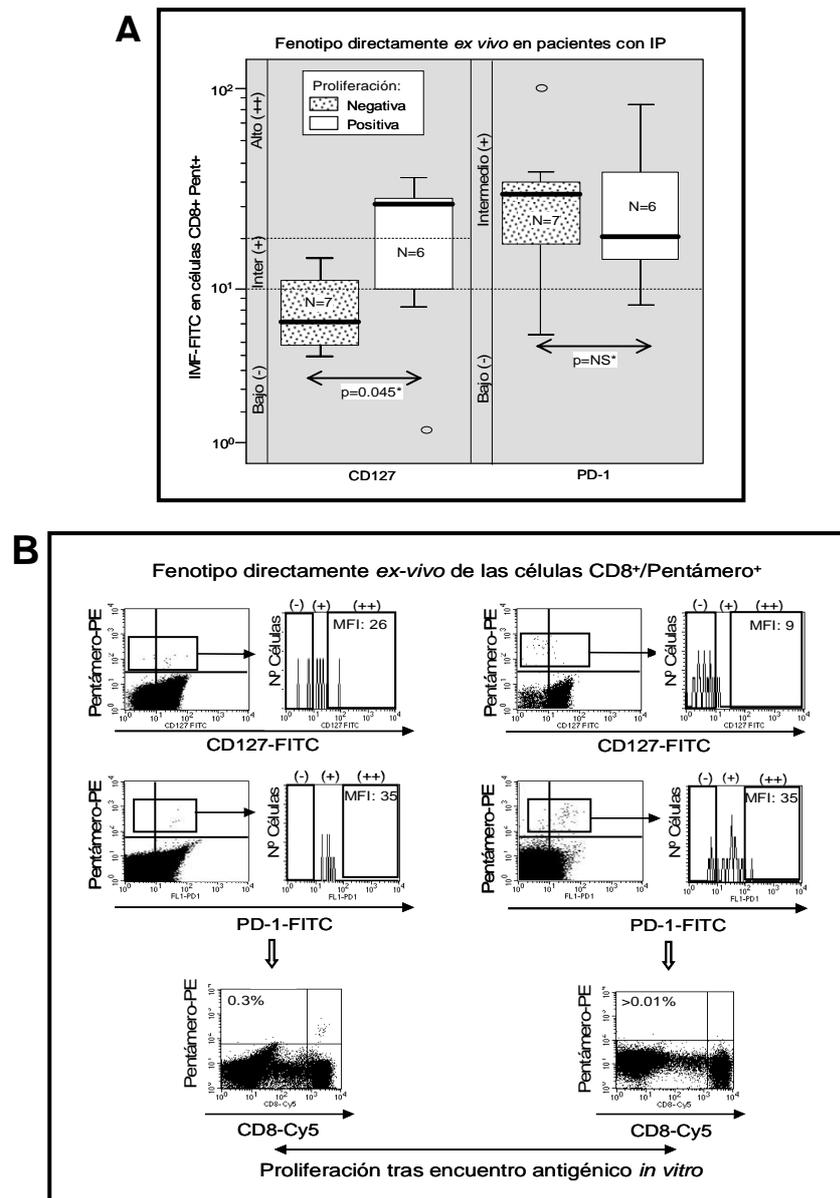


Fig. 29. Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ de sujetos con IP de acuerdo con el fenotipo PD-1/CD127.

(A) Diagrama de cajas que muestra la IMF de PD-1 y CD127 marcados con FITC de las células Pent⁺ de acuerdo con la capacidad proliferativa en pacientes con IP.

* Test U de Mann-Whitney. O: outlier. Inter: intermedio. NS: no significativo.

(B) Diagrama de puntos de Citometría de Flujo e histograma de la IMF de las células Pent⁺ de dos sujetos con IP con diferente expresión de CD127 y similar de PD-1.

A continuación estudiamos si este diferente fenotipo CD127 relacionado con la capacidad proliferativa, se debía a la presencia de mutaciones de escape en los epítomos virales, lo que provocaría que las células Pent⁺ no fueran capaces de reconocer el virus infectante y por tanto, no sufrirían la presión inmunológica favorecedora de anergia. Para ello, en 8 de 13 sujetos con IP y células Pent⁺ detectables directamente *ex-vivo*, se secuenciaron los epítomos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ del VHC que estas células eran capaces de reconocer. Los resultados mostraron la presencia de mutaciones en el epítomo NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ del VHC en la zona de interacción con el TCR, lo que podría ser causa de la disminución de la expresión de PD-1 ($p=0.034$) y del aumento de la expresión de CD127 ($p=0.048$) observado en estas células. Este fenómeno explicaría porque estas células eran capaces de proliferar cuando se estimulaban *in-vitro* con el epítomo “*wild type*” (Fig.30).

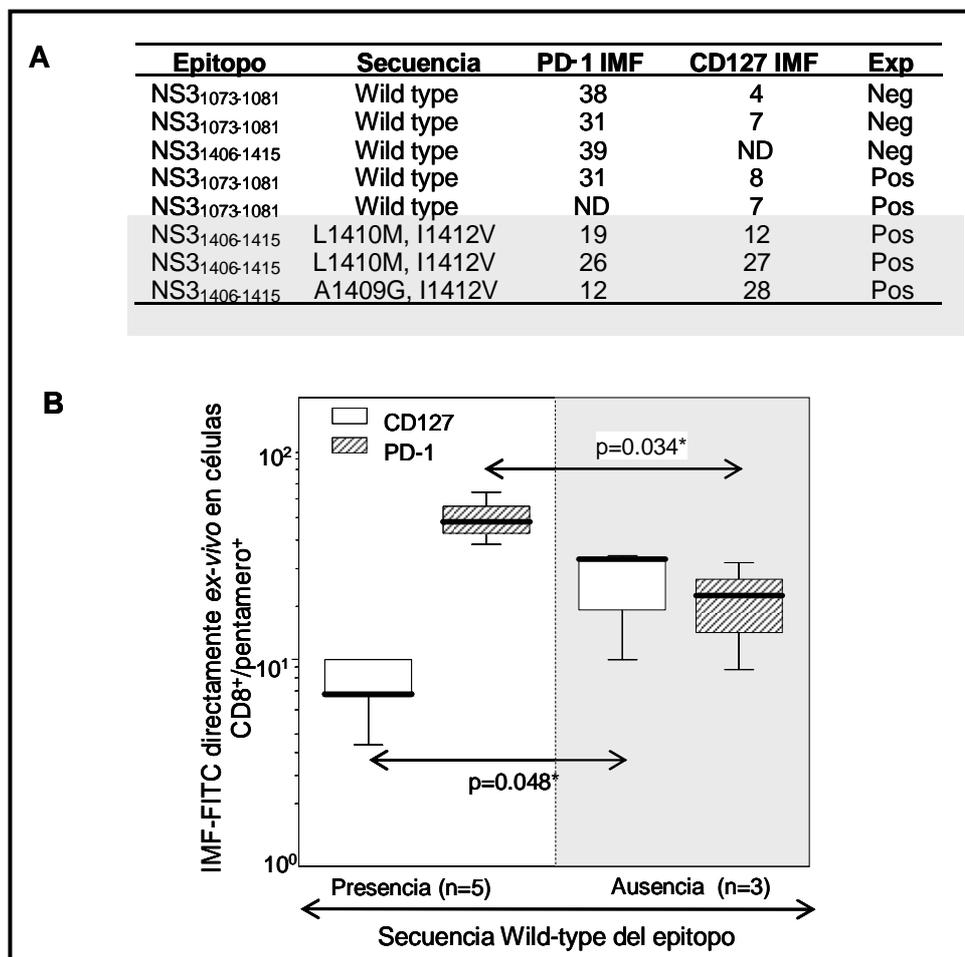


Fig. 30. Fenotipo PD-1/CD127 en las células Pent⁺ según la secuencia del epítomo del VHC.

(A) Tabla que muestra la IMF de PD-1 y CD127-FITC, la secuencia del epítomo del VHC y la capacidad de proliferación tras el encuentro antigénico en pacientes con IP con células Pent⁺ detectables directamente *ex-vivo*. Exp: Expansión. Pos: Positiva. Neg: Negativa

(B) Diagrama de cajas representando la IMF de PD-1 y CD127-FITC en las células Pent⁺ según la presencia o ausencia del epítomo wild type del VHC. * Test U de Mann-Whitney.

2.6. BLOQUEO DE LAS VÍAS DE ANERGIA Y APOPTOSIS

Puesto que las células Pent⁺ de los sujetos con IP capaces de reconocer al virus infectante presentan una mayor expresión de PD-1 y menor de CD127 y esto se traduce en una baja capacidad de proliferación, decidimos bloquear las vías en las que estas moléculas están involucradas para intentar recuperar la capacidad proliferativa de las células.

2.6.1. Bloqueo de la vía PD-1/PD-L1:

Analizamos el efecto del bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 en la proliferación de las células T CD8⁺ VHC específicas. Para ello incubamos las CMSP de pacientes con IP e IR con Ac anti-PD-L1 o con β -galactosidasa como control, durante la estimulación específica *in-vitro* con los péptidos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁.

En los sujetos con IP el tratamiento con Ac anti-PD-L1 incrementó significativamente de un 29% (8 de 27) hasta un 51% (14 de 27) el porcentaje de experimentos con proliferación de las células CD8⁺ Pent⁺ tras estimulación con los péptidos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ respecto a la estimulación en presencia de β -galactosidasa (p=0.023) (Fig.31). Sin embargo, este tratamiento no incrementó el porcentaje de casos con proliferación en los sujetos con IR tras estimulación con los

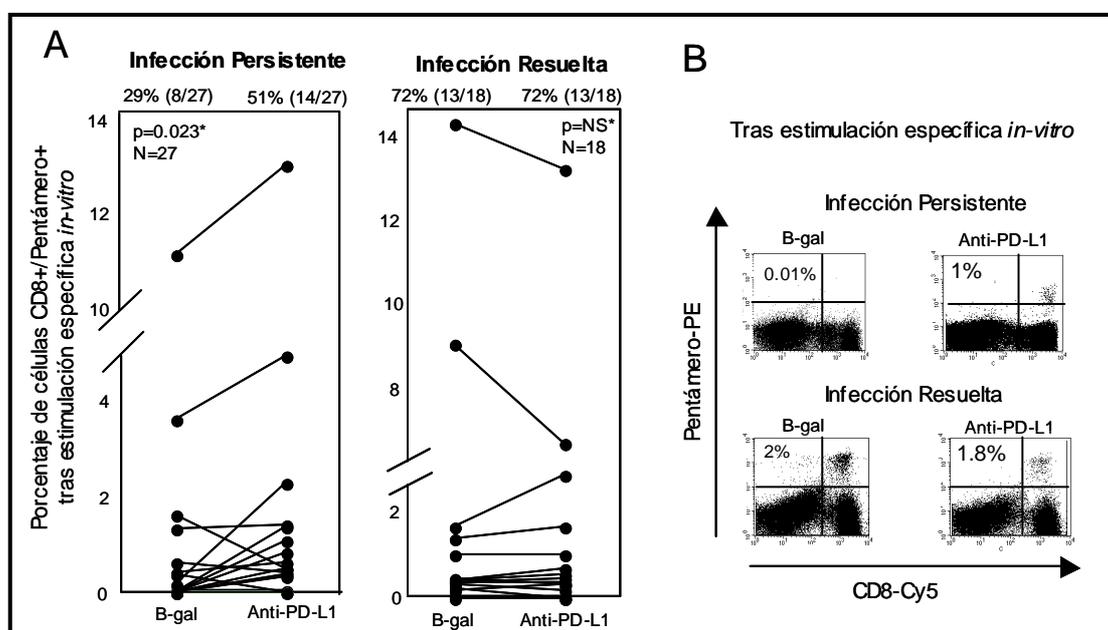


Fig. 31. Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia y ausencia de Ac anti-PD-L1.

(A) Diagramas que muestran la frecuencia de células Pent⁺ tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia de Ac anti-PD-L1 o β -galactosidasa (β -gal) como control, en pacientes con IP e IR.

*Test de Wilconxon. NS: no significativo.

(B) Diagrama de puntos representativo de CMSP marcadas con Pentámero-PE y Ac anti-CD8-Cy5 tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia de β -gal o Ac anti-PD-L1 de un paciente con IP y otro con IR.

mismos péptidos (72%; 13 de 18 antes y después de tratamiento) ($p=ns$), probablemente debido a la baja expresión de PD-1 en las células Pent⁺ en estos sujetos (Fig.31).

2.6.2 Inhibición de la apoptosis:

Como se ha mencionado con anterioridad, los sujetos con IP con capacidad para reconocer al virus infectante presentaban una baja expresión de CD127 en las células Pent⁺ lo que podría favorecer la apoptosis de estas células, ya que la privación de IL-7 favorece la liberación de moléculas pro-apoptóticas. Por esta razón, para contrarrestar el efecto pro-apoptótico de la ausencia de expresión de la molécula CD127 se bloquearon las vías apoptóticas. Se estimularon las CMSP de pacientes con IP e IR de forma específica con los péptidos NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ en presencia o ausencia de un inhibidor de pancaspasas (z-VAD-fmk), utilizándose β -galactosidasa como control. Los resultados mostraron una proliferación de las células Pent⁺ en el 54% (7 de 13) de los experimentos realizados tras el bloqueo de la apoptosis, siendo esta tasa de proliferación significativamente mayor que en el grupo control (23%, 3 de 13) ($p=0.012$) (Fig.32).

Sin embargo, este tratamiento anti-apoptótico no afectó a la capacidad de proliferación de las células Pent⁺ de sujetos con IR tras el encuentro antigénico 73% (8 de 11 tanto en presencia como en ausencia de z-VAD-fmk) ($p=ns$) (Fig.32).

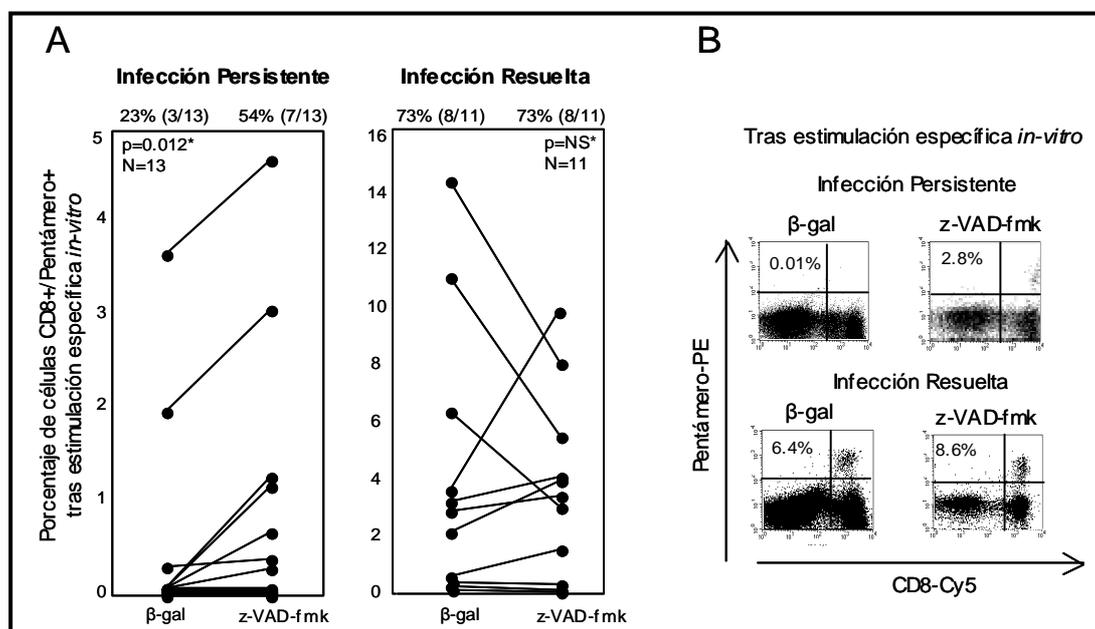


Fig. 32. Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia y ausencia del inhibidor de la apoptosis z-VAD-fmk.

(A) Diagramas que muestran la frecuencia de células Pent⁺ tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia de z-VAD-fmk o β -galactosidasa (β -gal) como control, en pacientes con IP e IR.

*Test de Wilconxon. NS: no significativo.

(B) Diagrama de puntos representativo de CMSP marcadas con Pentámero-PE y Ac anti-CD8-Cy5 tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia de β -gal o z-VAD-fmk de un paciente representativo de cada grupo (IP e IR).

Además, directamente *ex-vivo* y tras estimulación específica *in-vitro* en presencia del inhibidor z-VAD-fmk, se analizó la expresión de la molécula pro-apoptótica Bim, en células Pent⁺ de sujetos con IP (n=11) e IR (n=7). Los resultados mostraron que, directamente *ex-vivo*, la expresión de Bim en las células Pent⁺ de sujetos con IP era mayor (IMF: 166; IQR: 151) que la de las células de sujetos con IR (IMF: 118; IQR: 93) (p=ns), aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa, probablemente debido al tamaño de la muestra. Sin embargo, la expresión de Bim en células Pent⁺ de sujetos con IP, tras estimulación específica *in-vitro* en presencia de z-VAD-fmk, fue mayor (IMF: 221; IQR: 331) que la de estas mismas células en sujetos con IR (IMF: 77; IQR: 32) (p<0.001) (Fig.33).

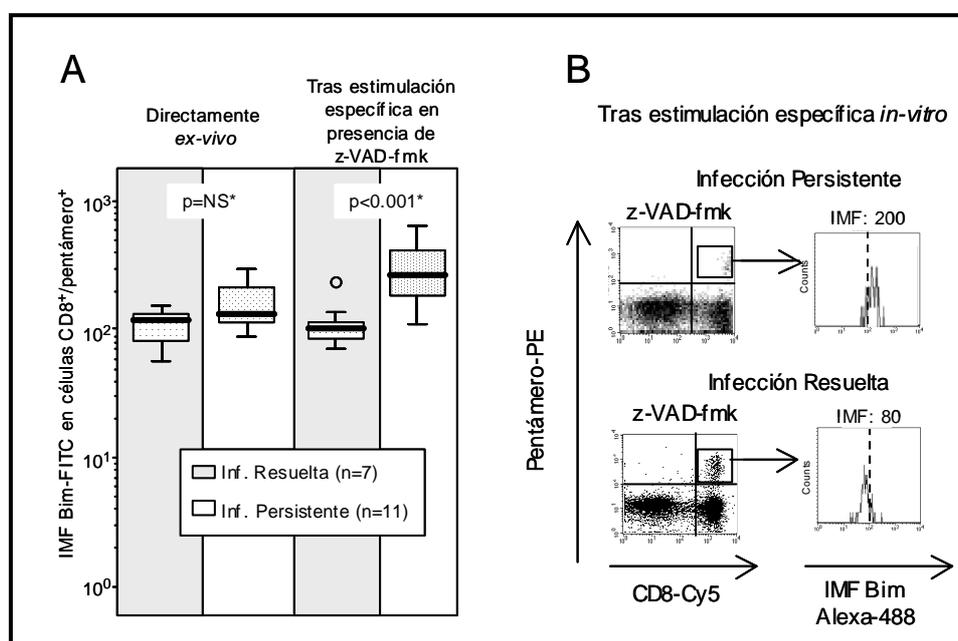


Fig. 33. Expresión de la molécula pro-apoptótica Bim en las células Pent⁺ directamente *ex-vivo* y tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia del inhibidor de la apoptosis z-VAD-fmk.

(A) Diagrama de cajas que muestra la IMF de Bim-Alexa 488 en las células CD8⁺ Pent⁺ directamente *ex-vivo* y tras estimulación específica en presencia de z-VAD-fmk en sujetos con IP e IR. * Test U de Mann-Whitney. NS: no significativo. Inf: Infección.

(B) Diagrama de puntos representativo de CMSP marcadas con Pentámero-PE y Ac anti-CD8-Cy5 tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia de z-VAD-fmk e histogramas que muestran la IMF de Bim-Alexa 488 en las células CD8⁺ Pent⁺ de un paciente con IP y otro con IR.

V. DISCUSIÓN

La respuesta celular citotóxica específica juega un papel muy importante en el control de la infección por VHC, ya que reconoce específicamente a la célula infectada pudiendo destruirla por mecanismos citolíticos (135, 136), y es capaz además, de inhibir la replicación viral empleando mecanismos no citolíticos (283).

Aunque las células citotóxicas específicas son importantes en todas las infecciones virales, su papel es más relevante en el caso de virus no citopáticos. En la infección por un virus citopático, la capacidad de recuperación de la primoinfección reside principalmente en la acción de las citoquinas antivirales, que frenan la infección viral al hacer resistentes a las células no infectadas contra la penetración y replicación del virus, y contra el daño causado por éste (284). Sin embargo, en la infección por virus no citopáticos, la situación es controlada principalmente por las células citotóxicas CD8⁺ que destruyen la célula infectada antes de que descargue la nueva generación de virus. La ausencia de daño celular convierte al virus no citopático en un agente oculto para el sistema inmune, haciendo fundamental la actuación de las células CD8⁺ citotóxicas para controlarlo (284). Tanto es así, que en la infección por LCMV (virus no citopático) hasta un 50% de los linfocitos CD8⁺ esplénicos son LCMV específicos cuando el huésped es capaz de controlar el virus (143).

Durante la infección crónica por VHC esta respuesta celular citotóxica específica se encuentra alterada. Varios estudios demuestran que aquellos sujetos que controlan la infección desarrollan una respuesta celular citotóxica específica intensa, policlonal y multiespecífica (145-149), mientras que en los sujetos con infección persistente esta respuesta se caracteriza por ser débil, oligoclonal, oligoespecífica, con alteraciones en su capacidad proliferativa y citotóxica, y en su habilidad para secretar IFN- γ y TNF- β (150-154). Además, trabajos realizados tanto en humanos como en chimpancés (144, 283), demuestran que durante la fase aguda de la infección por VHC, en el momento en el que se desarrolla una respuesta VHC específica con capacidad de producir IFN- γ , se produce la disminución de la CV y posteriormente el aclaramiento de la infección (Fig.34).

Todos estos datos demuestran que esta respuesta es fundamental en el control de la infección por VHC, sin embargo, en la mayoría de las primoinfecciones, el virus es capaz de alterar esta respuesta como mecanismo de escape viral. La presencia de una presión viral sostenida sobre la respuesta citotóxica conduce a una fase de anergia seguida por una fase de muerte por apoptosis. En este proceso podría estar implicada la inducción temprana de la expresión de moléculas coestimuladoras negativas como PD-1 y el descenso en la expresión del receptor anti-apoptótico de la IL-7.

Es por ello que con este trabajo hemos tratado de definir el papel que desarrollan estas moléculas en la reactividad de las células citotóxicas VHC específicas y si es posible mejorar sus capacidades efectoras durante la infección crónica, actuando sobre las vías moduladas por estos receptores.

A pesar de la importancia de esta respuesta en el control de la infección, en nuestro estudio no se observan diferencias en la frecuencia de las células CD8⁺ VHC-específicas directamente *ex-vivo* en sangre periférica, entre sujetos con infección resuelta e infección crónica, sin embargo, en la mayoría de estos últimos, las células CD8⁺ VHC específicas se encuentran en el hígado. Estos datos sugieren que en estos sujetos la respuesta celular citotóxica específica no se encuentra eliminada, como se había descrito previamente en otros estudios (198), a pesar de los procesos apoptóticos que tienen lugar en el hígado, sino que existe un secuestro intrahepático de células CD8⁺ VHC específicas. El hecho de que estas células no estén completamente delecionadas en los sujetos con infección crónica es importante a la hora de intentar desarrollar estrategias encaminadas a su restauración funcional.

La similitud en la baja frecuencia de células CD8⁺ VHC-específicas *ex-vivo* en sangre periférica entre sujetos con infección crónica y resuelta se ajusta perfectamente a las predicciones de los modelos matemáticos que describen la interacción entre las células T citotóxicas virus específicas y el virus. Según estos modelos (285), en una

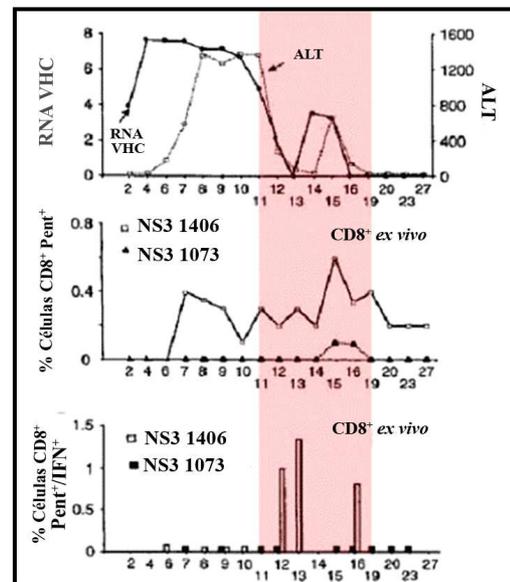


Fig. 34 Cinética de la respuesta VHC específica y producción de IFN- γ durante la resolución de la fase aguda de la infección. Thimme R et al. Figura publicada originalmente en *J exp Med*. doi: 10.1084/jem.194.10.139.

infección viral persistente por un virus no citopático, como en el caso del VHC, existen dos tipos de sujetos. Los denominados respondedores débiles y los respondedores fuertes (Fig.35).

Los respondedores fuertes presentan una correcta reactividad tras el encuentro con el virus, con lo que reducen rápidamente la CV. Tras este descenso, se alcanza un estado de equilibrio en el que la frecuencia de células T CD8⁺ virus específicas también desciende al disminuir el estímulo antigénico. Sin embargo, en los respondedores débiles la capacidad de respuesta tras el encuentro con el virus está muy reducida, por lo que la CV permanece en todo momento elevada, como consecuencia de la baja frecuencia de células T CD8⁺ virus específicas

No obstante, más importante que el número absoluto de células T CD8⁺ citotóxicas virus específicas que posee el sujeto infectado, es la capacidad de respuesta de éstas, definida como capacidad de expansión clonal, de migración al lugar de la infección y de desarrollo de las habilidades efectoras adecuadas para mantener al virus bajo control y responder rápidamente a las variaciones en la cinética de replicación viral.

Por esto, en nuestro estudio hemos analizado estas propiedades, observando que durante la infección crónica, las células CD8⁺ VHC específicas presentan alteraciones tanto en su capacidad de expansión clonal como en su capacidad para producir citoquinas antivirales como IFN- γ .

La alteración en la capacidad de proliferación de las células CD8⁺ VHC específicas observada durante la infección crónica, ha sido también descrita durante la fase aguda de la infección (286). En esta fase, las células muestran un fenotipo muy activado (HLA-DR⁺, CD45RA⁻, CCR7⁻), lo que probablemente indica que se trata de células efectoras que tras realizar su función van a sufrir un proceso de muerte por apoptosis (286). Esta situación podría ocurrir también durante la infección crónica pudiendo ser la causa del agotamiento funcional de las células CD8⁺ VHC específicas,

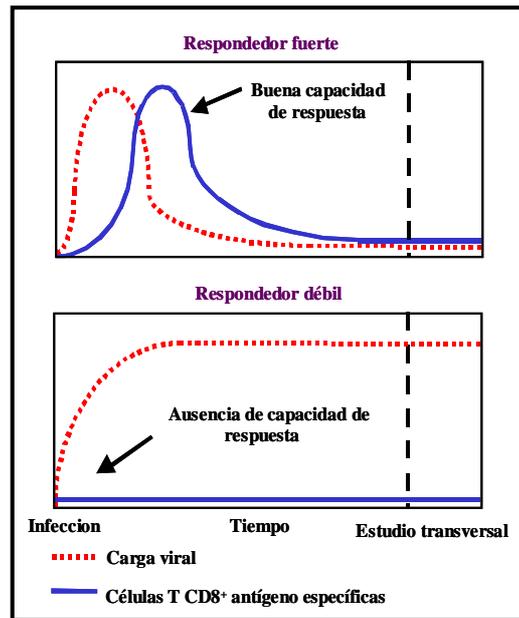


Fig. 35. Representación de la cinética viral y celular citotóxica teórica en un modelo de respuesta inmune fuerte y débil.

lo que en último término facilita la persistencia del VHC en el organismo. Según resultados publicados recientemente (287), las células CD8⁺ VHC específicas de sujetos que han resuelto la infección, son capaces de proliferar y presentan un fenotipo de memoria central (CD45RA⁻, CCR7⁺). Estas células constituyen un reservorio que permite que la respuesta celular sea más rápida frente a una nueva infección(144). Por el contrario, las células CD8⁺ VHC específicas de sujetos que no resuelven la infección son escasas, con un fenotipo casi diferenciado (CD45RA⁺, CCR7⁻) y sin capacidad para proliferar, pudiendo ser reclutadas al lugar de la infección (287).

La presencia de células CD8⁺ VHC específicas en sujetos que han resuelto la infección parece tener especial importancia, ya que podría mantener al virus bajo control. Varios trabajos sugieren que tras tratamiento antiviral, el VHC no es erradicado completamente, como se demuestra en otros estudios (288, 289), sino que varios años después de la resolución de la infección siguen existiendo trazas virales en pequeños reservorios (290-292), pudiendo ser las células CD8⁺ VHC específicas las encargadas de mantener al virus controlado o de finalizar el trabajo iniciado por el tratamiento anti-VHC.

La alteración funcional de las células CD8⁺ VHC específicas durante la infección persistente, podría deberse a la inducción de un estado de anergia o agotamiento funcional de las células, debido a la presión inmunológica ejercida por el virus, como se ha demostrado en la infección por LCMV (195). En este estado, las células tienen disminuida su capacidad proliferativa y su capacidad de secreción de citoquinas, mostrando predisposición a morir por mecanismos apoptóticos (198). En este modelo de anergia juega un papel muy importante la expresión de la molécula coestimuladora negativa PD-1 (218).

Además de la inducción de un estado de anergia, estudios realizados en sujetos con infección por VHB, demuestran que la alteración de la respuesta citotóxica específica también puede ser debida a la inducción de un estado pro-apoptótico en el que está implicado el receptor de la IL-7 (CD127) (293).

Varios trabajos han evaluado en profundidad el papel de la molécula PD-1 en la infección por VHC, sin embargo no se ha descrito el papel que podría desarrollar la molécula CD127 en la reactividad de las células citotóxicas durante la infección por VHC. Por ello, en este trabajo nos hemos centrado en el estudio de estas dos moléculas.

En cuanto a la molécula PD-1, Urbani y colaboradores (225) fueron los primeros en caracterizar su expresión en sujetos con infección aguda por el VHC, demostrando la

sobreexpresión de esta molécula en las células CD8⁺ VHC específicas de sangre periférica de sujetos en los que la infección se cronifica. Además, las células CD8⁺ VHC específicas intrahepáticas de sujetos que posteriormente aclaraban el virus, presentaban una mayor expresión de PD-1 y menor de CD127 comparada con sangre periférica.

Los resultados de nuestro estudio, derivados de una cohorte de sujetos mayor, se asemejan a los publicados por Urbani. Durante la infección crónica, las células CD8⁺ VHC específicas de sangre periférica e intrahepáticas, presentan una expresión elevada de PD-1 y disminuida de CD127, siendo esta tendencia más acusada en las células del compartimento intrahepático, lo cual podría favorecer el desarrollo de un estado de anergia y apoptosis. Por el contrario, en la infección resuelta el PD-1 está disminuido y el CD127 aumentado. Por tanto, al igual que se ha descrito recientemente en la infección por LCMV (294), lo que probablemente ocurra es un reclutamiento continuo al hígado de células VHC específicas recién generadas para mantener la población de células CD8⁺ VHC específicas en este compartimento.

Estos resultados son comparables con los observados en otras infecciones virales como la causada por el VIH (219, 221, 295), LCMV (296), CMV y VEB (270). En el caso de la infección por VIH se ha demostrado la existencia de una correlación entre la CV y la expresión de PD-1 en las células CD8⁺ VIH específicas (297), también demostrada durante la infección por VHC (298). Sin embargo, nuestro estudio, además de corroborar la existencia de esta correlación positiva entre la CV del VHC y la expresión de PD-1 durante la infección crónica, es el primero que demuestra la existencia de una correlación negativa entre la CV del VHC y la expresión de CD127 en las células CD8⁺ VHC específicas. Además, como hemos comentado con anterioridad, existe un gradiente de expresión de las moléculas PD-1 y CD127 entre sangre periférica y el compartimento intrahepático durante la infección crónica, por lo que podemos afirmar que el nivel de antigenemia es capaz de regular la expresión de estas dos moléculas en las células CD8⁺ VHC específicas, siendo esta modulación más intensa en el sitio de replicación del VHC, donde la antigenemia es mayor.

Además, durante la infección crónica, las células CD8⁺ VHC específicas tienen alterada su capacidad para producir IFN- γ tras el encuentro antigénico. Los resultados de nuestro estudio revelan que esta alteración se relaciona con la expresión de PD-1 y CD127, ya que existe una correlación negativa y positiva entre la capacidad de

producción de IFN- γ y la expresión de PD-1 y CD127 respectivamente, en las células CD8⁺ VHC específicas, aunque esta última no llega a tener significación estadística.

A pesar de las alteraciones funcionales que presentan las células CD8⁺ VHC específicas durante la infección crónica, en nuestro estudio observamos que algunos sujetos mantienen células citotóxicas específicas con capacidad de proliferación tras el encuentro antigénico, aunque estas células sean incapaces de controlar la infección. Estas células se caracterizan por una elevada expresión de CD127. Estos resultados difieren de lo publicado por Urbani y colaboradores (299), que únicamente han demostrado la existencia de células CD8⁺ VHC específicas con elevada expresión de CD127 en sujetos capaces de aclarar el virus pero no en los que el virus persiste. Por otro lado, las células CD8⁺ VHC específicas CD127⁻ no mantienen esta capacidad de proliferación. Estos resultados concuerdan con lo publicado en otras infecciones, como la causada por el VIH o el LCMV (300), donde la expresión de CD127 es un indicador de la funcionalidad de las células T CD8⁺.

Un estudio reciente (301) sugiere que la elevada expresión de CD127 en las células CD8⁺ VHC específicas durante la infección crónica, podría deberse a la ausencia de presión inmunológica, provocada por la presencia de mutaciones de escape del virus, por lo que, las células CD8⁺ VHC específicas no serían capaces de reconocerlo y eliminarlo. Los resultados de nuestro trabajo confirman estos datos, ya que observamos mutaciones de escape en los epítomos del VHC en la zona de interacción con el TCR. Estas mutaciones impedirían que las células CD8⁺ VHC específicas contra los epítomos “wild type” reconocieran al virus infectante ante la ausencia de presión inmunológica y no se induciría el PD-1 ni se suprimiría la expresión de CD127.

En estos casos, además de una sobreexpresión de CD127, observamos que, a pesar de que estas células CD8⁺ VHC específicas no son capaces de reconocer el virus, debido a las mutaciones que ha sufrido éste, siguen manteniendo una elevada expresión de PD-1, lo que sugiere que además de la estimulación del TCR podría existir otro mecanismo implicado en la sobreexpresión de PD-1 durante la infección por VHC. Una explicación podría ser la implicación de la proteína del *core* del VHC en la modulación de la expresión de PD-1. Se ha demostrado que esta proteína se une al receptor del sistema del complemento gC1q (gC1qR) alterando la capacidad de proliferación de las células T (302) a través de la regulación a la baja del receptor de la IL-2 (303).

Un ensayo realizado en un modelo de ratón (304), en el que la proteína del *core* del VHC es expresada en el hígado del animal, demuestra la existencia de un infiltrado de células citotóxicas que sobreexpresan PD-1 y que son incapaces de aclarar el virus. Sin embargo, los ratones que no expresan la proteína del *core* del VHC en el hígado, también presentan este infiltrado de células, aunque estas no expresan PD-1 y son capaces de controlar la infección viral. Por lo que estos datos sugieren que la proteína del *core* del VHC podría desempeñar un papel importante en la inducción temprana de PD-1 en las células T de manera no antígeno específica, principalmente en el hígado, donde esta proteína se expresa (305, 306).

En relación con este mecanismo no específico de inducción de la expresión de PD-1, experimentos *in-vitro*, demuestran que en presencia de la proteína del *core* del VHC, se produce una sobreexpresión de PD-1 y PD-L1 en las células T activadas. Esta regulación del PD-1 es la responsable de las alteraciones en la capacidad proliferativa de las células T (307), sin embargo, este fenómeno puede ser parcialmente restaurado tras el bloqueo de la interacción entre la proteína del *core* y el gC1qR (307). Estos resultados apoyan la hipótesis de que esta interacción coopera con la continua estimulación del TCR para provocar una temprana sobreexpresión del PD-1 durante la infección por VHC.

Además, varios trabajos demuestran que esta sobreexpresión de PD-1 no sólo se observa en las células CD8⁺ VHC específicas sino también en la población total de células CD8⁺ de sujetos con infección crónica por VHC (227, 308). Por lo que parece claro que el VHC es capaz de inducir la expresión de PD-1 tanto mediante mecanismos dependientes de especificidad como de manera inespecífica.

En nuestro estudio, las células CD8⁺ VHC específicas con capacidad de proliferación tras estimulación antigénica en pacientes con infección crónica, presentan una expresión de PD-1 y CD127 mayor que las células de sujetos que han resuelto la infección. En estos casos asumimos que estas células mantienen su capacidad proliferativa y el fenotipo CD127⁺ porque no son capaces de reconocer al virus infectante. Sin embargo, la reducción en la expresión de CD127 tras el encuentro antigénico, aunque se mínima, es difícil de interpretar. Cabría esperar que las células CD8⁺ VHC específicas al recibir el estímulo *in-vitro* se activaran y disminuyeran su expresión de CD127, en medida al menos similar, a la de las células CD8⁺ VHC específicas de sujetos con infección resuelta. Sin embargo, nuestros resultados demuestran lo contrario. Probablemente esto se deba a que las células CD8⁺ VHC

específicas CD127⁺ de ambos grupos provengan de diferentes poblaciones con distinto grado de diferenciación. El estado de las células CD8⁺ está influenciado por la estimulación antigénica (309, 310), por lo tanto, en el caso de que el VHC presente mutaciones de escape durante la infección crónica en los epítomos diana, la ausencia de estimulación antigénica podría provocar un fenotipo naïve-temprano en las células CD8⁺ VHC específicas (CD127 elevado con respecto al de sujetos que han resuelto la infección), mientras que las células de sujetos con infección resuelta, presentarían un fenotipo temprano-intermedio, probablemente mediado por residuos virales, que tras la estimulación antigénica, estaría preparado para transformarse en un fenotipo de memoria efector, caracterizado por un fenotipo CD127 bajo.

Todos los resultados descritos, demuestran, en concordancia con la literatura previa, que la respuesta citotóxica VHC específica se encuentra alterada en sujetos con infección crónica por VHC (alteración de la capacidad proliferativa y de producción de citoquinas tipo-1) y que esta alteración está relacionada con la expresión de las moléculas PD-1 y CD127. Por ello, nos planteamos en este trabajo el estudio de estrategias encaminadas a restaurar la reactividad de las células T CD8⁺ VHC específicas PD-1⁺/CD127⁻, mediante la modulación de las vías reguladas por estas moléculas.

Durante la infección crónica, la unión de la molécula PD-1 con su ligando bloquea la señal de transducción a través del TCR (159) provocando la anergia de las células CD8⁺ VHC específicas. En nuestro estudio, los experimentos *in-vitro* en los que se bloquea esta interacción mediante el tratamiento con Ac anti-PD-L1, muestran un incremento de la reactividad de las células CD8⁺ VHC específicas en sujetos con infección crónica, que como hemos señalado, es el grupo de sujetos con mayor expresión de PD-1. Este bloqueo, sin embargo, no produjo un incremento de la proliferación en sujetos con infección resuelta en los que habíamos observado una baja expresión de PD-1.

Además de la restauración de la capacidad de proliferación, varios trabajos (226, 227, 311) demuestran que tras el bloqueo *in-vitro* de la vía PD-1/PD-L1, las células CD8⁺ VHC específicas de sujetos con infección crónica son capaces de producir más IFN- γ , perforina, IL-2 e IL-13.

Sin embargo, las células CD8⁺ VHC específicas intrahepáticas de los sujetos con infección crónica, muestran unos niveles de PD-1 y unas alteraciones funcionales mucho mayores que las células de sangre periférica. Estudios previos no han sido capaces de restaurar las funciones efectoras de estas células con el bloqueo de la interacción entre PD-1 y su ligando (226). En estudios realizados en sujetos con infección aguda por VHC, se observa una situación similar a la descrita (226). Estos resultados sugieren que el nivel de expresión de PD-1 y la compartimentalización puede definir el grado de agotamiento funcional de las células CD8⁺ VHC específicas y el potencial para restaurar estas funciones mediante el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1.

Una hipótesis que explicaría esta elevada expresión de PD-1 y la alteración masiva de las funciones efectoras en el hígado, podría deberse a que en este compartimento se produce un encuentro masivo con los antígenos del VHC, mientras que en sangre periférica, estas células presentan una expresión moderada de PD-1 debido a que están expuestas a menor antigenemia. En la infección aguda, las células CD8⁺ VHC específicas de sangre periférica también están sometidas a una elevada exposición antigénica, de ahí que presenten una mayor expresión de PD-1 (145). Por lo tanto, podemos sugerir que el nivel de expresión de PD-1 define una jerarquía en la funcionalidad de las células CD8⁺ VHC específicas, probablemente basado en el grado de exposición antigénica en los distintos compartimentos.

Otra posibilidad que explicaría porqué las células CD8⁺ VHC específicas intrahepáticas son incapaces de restaurar sus funciones efectoras a pesar del bloqueo de la vía PD-1/PD-L1, es que existan otras moléculas implicadas en la inducción de la anergia de estas células. Se ha demostrado que la elevada estimulación antigénica que se produce en el hígado induce la expresión de otra molécula coestimuladora negativa como es el CTLA-4 (226), la cual podría seguir induciendo un estado de anergia en las células citotóxicas a pesar del bloqueo de la vía PD-1/PD-L1. Por tanto, sería lógico pensar que la restauración funcional de las células CD8⁺ VHC específicas intrahepáticas podría lograrse mediante el bloqueo combinado de diferentes moléculas coestimuladoras negativas. En esta línea, un estudio reciente, publicado por Nakamoto y colaboradores (312), demuestra que efectivamente, el bloqueo combinado de las moléculas coestimuladoras negativas PD-1 y CTLA-4 restablece la funcionalidad de las células específicas intrahepáticas en sujetos con infección crónica, aumentando su capacidad de proliferación y su capacidad para producir citoquinas (IFN- γ y TNF- β) y moléculas implicadas en la histólisis (perforina y CD107a).

Actualmente, varios trabajos analizan la posibilidad de que la modulación de la vía PD-1/PD-L1 pudiera mejorar la respuesta citotóxica contra infecciones virales persistentes, ya sea directamente, utilizando sólo Ac anti-PD-L1, o en combinación con una vacuna terapéutica. Estos trabajos demuestran cómo la administración de la vacuna terapéutica sola, no promueve la inducción de una respuesta citotóxica vigorosa, debido al estado de tolerancia en el que se encuentran las células CD8⁺ específicas (313, 314). Sin embargo, en un modelo animal con infección por LCMV (315), se observa como la administración de la vacuna terapéutica en combinación con el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 mejora la capacidad de proliferación y la funcionalidad de las células CD8⁺ LCMV específicas, acelerando así el control de la infección.

Experimentos realizados en chimpancés infectados por el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), demuestran que la administración de Ac anti-PD-L1 durante la fase crónica de la infección, produce una rápida proliferación y restauración de las células CD8⁺ SIV específicas (316, 317).

Aunque todos estos resultados parecen ser muy prometedores, el bloqueo de las moléculas coestimuladoras negativas podría conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes y linfoproliferativas (318, 319), lo cual limitaría el uso de esta estrategia como una herramienta terapéutica en seres humanos. Por ello, son necesarios estudios exhaustivos en modelos experimentales antes de que el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 pueda ser adecuado para el tratamiento de la infección crónica por el VHC.

Además del papel que juega el PD-1 en la anergia de las células CD8⁺ VHC específicas, nuestro estudio demuestra la implicación de otra molécula, el receptor CD127 (IL-7R), en la alteración de la respuesta citotóxica VHC específica.

Varios trabajos (225, 271, 272, 320) demuestran que durante la infección crónica, las células CD8⁺ VHC específicas además de presentar una elevada expresión de PD-1, presentan una baja expresión de CD127, en concordancia con nuestros datos. Esto sugiere que los procesos de anergia y apoptosis se encuentran estrechamente relacionados y que probablemente sea necesario actuar sobre ambas vías para restaurar la respuesta citotóxica específica.

En otras infecciones persistentes por virus hepatotropos, como la causada por el VHB (274), se ha demostrado que el bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis podría ser uno de los mecanismos necesarios para restaurar la respuesta citotóxica específica. En este trabajo, se ha observado que las células CD8⁺ VHB específicas CD127⁻ se

encuentran en un estado próximo a la apoptosis, debido a que presentan una regulación a la baja de la molécula anti-apoptótica Mcl-1 y una regulación al alta de la molécula pro-apoptótica Bim, debido a la deprivación de IL-7 (201, 274). Sin embargo, las células CD8⁺ VHB específicas CD127⁺ mantienen la capacidad para proliferar tras el encuentro antigénico por lo que se cree que estas células podrían estar protegidas frente a la apoptosis, ya que tienen inducida la expresión de la molécula anti-apoptótica Mcl-1. Este fenotipo CD127 de las células citotóxicas VHB específicas es similar al que observamos en las células de pacientes con infección crónica por VHC capaces de reconocer los epítomos virales del virus infectante.

Por ello, nos planteamos que el bloqueo de la vía de la apoptosis podría mejorar la respuesta citotóxica específica frente al VHC de manera similar a como ocurre en el estudio de Lopes y colaboradores (274).

Nuestro estudio es el primero en demostrar la posibilidad de restaurar la funcionalidad de las células CD8⁺ VHC específicas CD127⁻ de los sujetos con infección crónica, gracias al bloqueo *in-vitro* de la apoptosis mediante el inhibidor de pancaspasas z-VAD-fmk. Además, también es el primero en demostrar que estas células muestran una elevada expresión de la molécula pro-apoptótica Bim, lo que sugiere que, al igual que sucede en la infección por VHB, la inducción de la apoptosis juega un papel importante en la alteración funcional de las células CD8⁺ VHC específicas CD127⁻ durante la infección crónica.

La deprivación de citoquinas en las células T produce una activación de la apoptosis por vía de la mitocondria, regulada por proteínas de la familia de Bcl-2. La actividad de la molécula pro-apoptótica Bim es contrarrestada por su unión a la proteína anti-apoptótica Mcl-1 (321), sin embargo, en el caso de la sobreexpresión de Bim, este bloqueo no sería completo, induciéndose así la apoptosis. Por todo esto, nuestros datos sugieren que la deprivación de IL-7 produce una sobreexpresión de Bim durante la infección persistente por VHC en las células CD8⁺ VHC específicas. Esto explicaría la escasa actividad de estas células tras el encuentro antigénico, debido a su proximidad a morir, ya que tienen inducida la vía de la apoptosis.

Por tanto, sería interesante estudiar en profundidad estrategias encaminadas a bloquear el efecto pro-apoptótico, producido por la deprivación de IL-7, para intentar restaurar la respuesta CD8⁺ VHC específica *in-vivo* durante la infección crónica por VHC en asociación con la modulación de otras vías inductoras de anergia.

Una posible estrategia a utilizar podría ser el uso del inhibidor de pancaspasas z-VAD-fmk, ya que hemos comprobado que, al menos *in-vitro*, es capaz de restaurar las funciones efectoras de las células CD8⁺ VHC específicas. Sin embargo, es necesario estudiar en profundidad el bloqueo de la apoptosis, ya que existen datos que demuestran que su supresión podría favorecer el desarrollo y evolución de procesos tumorales (322), por lo que es necesario el desarrollo de mecanismo moduladores de la apoptosis de forma selectiva en la población celular adecuada.

En esta línea, un trabajo reciente (323), muestra como las células T VEB específicas presentan una elevada expresión de la molécula pro-apoptótica Bim tras ser activadas con el péptido específico, siendo esta sobreexpresión mediada por la activación de la proteína quinasa C (PKC) y de la calcineurina. Sin embargo, cuando se utilizan los inmunosupresores ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus (FK506) se produce un bloqueo de la activación de estas proteínas y por tanto no se induce la expresión de Bim, evitándose de este modo la activación de la apoptosis en las células T.

A la vista de estos resultados, cabría la posibilidad de utilizar esta estrategia, en combinación con el tratamiento anti-VHC estándar, para bloquear la apoptosis favoreciendo así la restauración de las células CD8⁺ VHC específicas lo cual podría influir en el desarrollo de respuesta virológica sostenida.

En resumen, en este trabajo se demuestra que la respuesta citotóxica VHC específica durante la infección crónica por VHC no se encuentra eliminada, sino que está secuestrada en el compartimento intrahepático mostrando una serie de alteraciones funcionales. Estas alteraciones están relacionadas con la sobreexpresión de PD-1 y la baja expresión de CD127. Concretamente, las células CD8⁺ VHC específicas capaces de reconocer al virus infectante presentan un fenotipo PD-1⁺, CD127⁻, Bim⁺. El bloqueo *in-vitro* de la vía PD-1/PD-L1 y de la apoptosis es capaz de restaurar la funcionalidad de estas células, por lo que la modulación de estas dos vías podría considerarse en un futuro como una herramienta terapéutica en el tratamiento de la infección crónica por VHC.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- La respuesta celular citotóxica VHC específica durante la infección crónica no se encuentra eliminada sino que está secuestrada en el compartimento intrahepático, siendo su frecuencia muy baja en el compartimento periférico.
- 2.- Esta respuesta, durante la infección crónica, se caracteriza por la alteración de sus funciones efectoras, no siendo capaz de proliferar ni de producir citoquinas tipo-1 tras el encuentro antigénico.
- 3.- La infección por VHC induce la expresión de la molécula pro-anérgica PD-1, inhibe la expresión de la molécula anti-apoptótica CD127 e incrementa la expresión de la molécula pro-apoptótica Bim en las células CD8⁺ VHC específicas durante la infección crónica por VHC.
- 4.- La intensidad de la modulación del fenotipo PD-1/CD127 se correlaciona con el grado de alteración de la respuesta citotóxica específica.
- 5.- El bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 y de la apoptosis restablece *in-vitro* las funciones efectoras de las células CD8⁺ VHC específicas con fenotipo PD-1⁺/CD127 características de la infección crónica por VHC que son capaces de reconocer al virus infectante.

Por tanto, la infección persistente por VHC altera la respuesta celular citotóxica específica favoreciendo un estado de anergia y pro-apoptótico mediante la modulación de la expresión de las moléculas PD-1 y CD127. La actuación farmacológica sobre las vías gobernadas por estas moléculas permite restablecer la respuesta citotóxica específica *in-vitro* en la infección crónica por VHC.

VII. APÉNDICES

1. ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<u>Páginas</u>
• Fig. 1. Distribución mundial de la infección por VHC	2
• Fig. 2. Vías de transmisión de la infección por VHC	3
• Fig. 3. Representación esquemática de la historia natural de la infección por VHC	4
• Fig. 4. Estructura genómica del VHC	6
• Fig. 5. Ciclo vital del VHC	8
• Fig. 6. Atenuación de la respuesta inmune innata mediada por IFN- β por parte de las distintas proteínas del VHC	11
• Fig. 7. Mecanismos utilizados por el VHC para interferir en la función de las células dendríticas	13
• Fig. 8. Esquema de la cinética de las células T CD8 ⁺ específicas durante la infección en un paciente con resolución de la infección	20
• Fig. 9. Ruta de presentación del HLA-I en la membrana plasmática.	22
• Fig. 10. Interacción entre receptores expresados por la célula T y sus ligados expresados por la CPA.	23
• Fig. 11. Agotamiento de las células T CD8 ⁺ específicas durante la infección viral crónica	25
• Fig. 12. Estructura e interacción entre PD-1 y PD-L1	27
• Fig. 13. Estructura del receptor de la IL-7 y ruta de señalización.	30
• Fig. 14. Histograma de un paciente HLA-A2 negativo y otro positivo	45
• Fig. 15. Esquema del complejo pentamérico HLA-A2/ péptido NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅ ...	46
• Fig. 16. Esquema de la visualización directa de la célula T citotóxica mediante marcaje con complejos pentaméricos HLA-A2 / péptido NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅	47
• Fig. 17. Parámetros de las condiciones utilizadas en la “nested PCR”	51
• Fig. 18. Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra la amplificación de las regiones NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3 ₁₀₇₃₋₁₀₈₁	52
• Fig. 19. Gráficos de puntos que muestra la especificidad de los complejos pentaméricos para detectar las células CD8 ⁺ Pent-NS3 ₁₄₀₆₋₁₄₁₅ específicas en dos líneas celulares de un mismo sujeto	57

- **Fig. 20.** Gráfico de puntos de la tinción de los clones NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y CMV pp65495-504 específicos con los complejos pentaméricos HLA-A2 / NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ más anticuerpos anti-CD8 57
- **Fig. 21.** Análisis directamente *ex-vivo* de la frecuencia y fenotipo PD-1/CD127 en las células CD8⁺ VHC específicas según el grado de control de la infección 62
- **Fig. 22.** Análisis directamente *ex-vivo* de la frecuencia y fenotipo PD-1/CD127 en las células CD8⁺ VHC específicas según el grado de control de la infección 63
- **Fig. 23.** Análisis directamente *ex-vivo* de la correlación entre la CV del VHC y la expresión de las moléculas PD-1 y CD127 64
- **Fig. 24.** Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ tras estimulación *in-vitro* antígeno específica según el grado de control viral 66
- **Fig. 25.** Producción de IFN- γ por las células Pent⁺ tras estimulación específica *in-vitro* de acuerdo con el fenotipo PD-1/CD127 67
- **Fig. 26.** Correlación entre la producción de IFN- γ por las células Pent⁺ tras estimulación específica *in-vitro* y el fenotipo PD-1/CD127 67
- **Fig. 27.** Fenotipo de las células CD8⁺ / NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ Pentámero⁺ tras estimulación específica *in-vitro*. 68
- **Fig. 28.** Asociación entre fenotipo PD-1/CD127 directamente *ex-vivo* y la capacidad de proliferación de las células CD8⁺ Pent⁺ 69
- **Fig. 29.** Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ de sujetos con IP de acuerdo con el fenotipo PD-1/CD127 70
- **Fig. 30.** Fenotipo PD-1/CD127 en las células Pent⁺ según la secuencia del epítipo del VHC 71
- **Fig. 31.** Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia y ausencia de Ac anti-PD-L1 72
- **Fig. 32.** Capacidad de proliferación de las células Pent⁺ tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia y ausencia del inhibidor de la apoptosis z-VAD-fmk 73

Páginas

- **Fig. 33.** Expresión de la molécula pro-apoptótica Bim en las células Pent⁺ directamente *ex-vivo* y tras estimulación antigénica *in-vitro* en presencia del inhibidor de la apoptosis z-VAD-fmk 74
- **Fig. 34.** Cinética de la respuesta VHC específica y producción de IFN- γ durante la resolución de la fase aguda de la infección 77
- **Fig. 35.** Representación de la cinética viral y celular citotóxica teórica en un modelo de respuesta inmune fuerte y débil 78

2. ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Medios y tampones utilizados en los experimentos 43
- **Tabla 2.** Descripción de la secuencia de los primers utilizados para la amplificación y secuenciación de las regiones NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ y NS3₁₀₇₃₋₁₀₈₁ del RNA del VHC 51
- **Tabla 3.** Características clínicas de los sujetos del estudio 59
- **Tabla 4.** Frecuencia de pacientes con células pentámero⁺ detectables contra tres epítopos inmunodominantes del VHC directamente *ex-vivo* y frecuencia de estas células en los pacientes con células pentámero⁺ detectables 61
- **Tabla 5.** Valores de IMF de PD-1 y CD127 directamente *ex-vivo* en sangre periférica e hígado de los dos grupos de sujetos 64
- **Tabla 6.** Valores de IMF de PD-1 y CD127 tras estimulación específica *in-vitro* en las CD8⁺ Pent-NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅⁺ y en la población total de CD8⁺ en los dos grupos de estudio (IP, IR e Inmunidad natural) 69

3. PUBLICACIONES

Los datos de esta tesis doctoral han sido publicados y presentados parcialmente en los siguientes artículos y reuniones de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado:

ARTÍCULOS EN REVISTAS (Factor impacto acumulado: 14.85)

- 1.- Larrubia J. R., **Benito-Martínez S.**, Miquel J, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, González-Praetorius A, Albertos S, García-Garzón S, Lokhande M and Parra-Cid T. Bim-mediated apoptosis and PD-1/PD-L1 pathway impair reactivity of PD1+/CD127- HCV-specific CD8+ cells targeting the virus in chronic hepatitis C virus infection. **Cell Immunol** **2011**; 269: 104-114. ISSN 0008-8749. Factor de impacto: 2.7.
- 2.- Larrubia JR, **Benito-Martínez S**, Miquel J, Calvino M, Sanz de Villalobos E, Parra-Cid T. Costimulatory molecule PD-1 in the cytotoxic response during chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol** **2009**; 15(41): 5129-5140. ISSN 1007-9327. Factor de impacto: 2.092.
- 3.- J. R. Larrubia, **S. Benito-Martínez**, J. Miquel-Plaza, E. Sanz-de-Villalobos, F. González-Mateos, T. Parra. Cytokines-their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. **Rev Esp Enferm Dig** **2009**; 101(5): 343-351. ISSN 1130-0108. Factor de impacto: 1.263.
- 4.- **Benito S**, Sanz-de-Villalobos E, González-Mateos F, Calvino M, García-Garzón S, Bienvenido A, Parra T, Larrubia JR. Análisis de la respuesta celular citotóxica específica en la infección crónica por VHC mediante tecnología pentamérica. **Revista de la ACAD** **2009**; 25(2): 45-52. ISSN: 0213-1463.
- 5.- Larrubia JR, **Benito-Martínez S**, Calvino M, Sanz de Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol** **2008**; 14(47): 7149-7159. ISSN 1007-9327. Factor de impacto: 2.092.

- 6.- Larrubia J. R., Calvino M., **Benito S.**, Sanz-de-Villalobos E., Perna C., Pérez-Hornedo J., González-Mateos F., García-Garzón S., Bienvenido A., Parra T. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. **J Hepatol** **2007**; 47: 632-641. ISSN: 0168-8278. Factor de impacto: 6.7.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- 1.- J.R. Larrubia, **S. Benito**, M. Lokhande, J. Miquel, M. Calvino, E. Sanz-de-Villalobos, A. González-Praetorius, S. Albertos, S. García-Garzón, T. Parra-Cid. Enhancement of CD127⁺ HCV-specific cytotoxic response through Bim-mediated apoptosis blocking in persistent HCV infection. **J Hepatol** **2011**; 54(S1): 112. ISSN: 0168-8278.
- 2.- J.R. Larrubia, **S. Benito**, M. Lokhande, J. Miquel, M. Calvino, E. Sanz-de-Villalobos, A. González-Praetorius, S. Albertos, S. García-Garzón, T. Parra-Cid. Sustained virologic response in high viraemic genotype-1 HCV infection correlates with peripheral HCV-specific cytotoxic response restoration. **J Hepatol** **2011**; 54(S1): 121. ISSN: 0168-8278.
- 3.- J.R. Larrubia, **S. Benito**, M. Lokhande, J. Miquel, M. Calvino, E. Sanz-de-Villalobos, A. González-Praetorius, S. Albertos, S. García-Garzón, T. Parra-Cid. Detection of a HCV-specific cytotoxic response during the first twelve weeks of anti-HCV treatment correlates with sustained virologic response. **J Hepatol** **2011**; 54(S1): 111-112. ISSN: 0168-8278.
- 4.- J.R. Larrubia, **S. Benito**, J. Miquel, M. Calvino, E. Sanz-de-Villalobos, A. González-Praetorius, S. Albertos, T. Parra-Cid. Longitudinal analysis of PD-1 expression on HCV-specific CD8⁺ cells during anti-HCV treatment according to virologic outcome. **J Hepatol** **2010**; 52(S1): S264. ISSN: 0168-8278.

- 5.- J.R. Larrubia, **S. Benito**, J. Miquel, M. Calvino, E. Sanz-de-Villalobos, A. González-Praetorius, S. Albertos, T. Parra-Cid. CD127/PD-1 phenotype defines the HCV-specific cytotoxic T cell reactivity after antigen encounter during chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatol** **2010**; 52 (S1): S264-S265. ISSN: 0168-8278.
- 6.- **S Benito**, T Parra, J Miquel, E Sanz-de-Villalobos, M Calvino, ML García-Buey, F González-Mateos, A González-Praetorius, S. Albertos, JR Larrubia. Relationship between virologic relapse and cytotoxic T cell reactivity after peg-interferon plus ribavirin end-of-treatment response in chronic hepatitis c virus infection. **J Hepatol** **2009**; 50 (S1): S317. ISSN: 0168-8278.
- 7.- **S Benito**, T Parra, J Miquel, E Sanz-de-Villalobos, M Calvino, ML García-Buey, F González-Mateos, A González-Praetorius, S. Albertos, JR Larrubia. Amino acid substitutions within a hepatitis c virus immunodominant HLA-class I restricted epitope are due to selective immunological pressure. **J Hepatol** **2009**; 50 (S1): S317. ISSN: 0168-8278.
- 8.- **S Benito**, T Parra, J Miquel, E Sanz-de-Villalobos, M Calvino, ML García-Buey, F González-Mateos, A González-Praetorius, S. Albertos, JR Larrubia. HCV-core protein modulates cytotoxic T cell response through PD1/PD-L1 pathway. **J Hepatol** **2009**; 50 (S1): S318. ISSN: 0168-8278.
- 9.- **Benito S**, Larrubia JR, Sanz de Villalobos E, Calvino M, García-Buey ML, García-Garzón S, González-Mateos F, González-Praetorius A, Miquel J, Bienvenido A, Parra T. Negative costimulatory molecule PD-1 up-regulation on CD8+ cells during persistent HCV infection. **J Hepatol** **2008**; 48 (S2): S52. ISSN: 0168-8278.
- 10.- **Benito S**, Larrubia JR, Sanz de Villalobos E, Calvino M, García-Buey ML, González-Mateos F, González-Praetorius A, Miquel J, Bienvenido A, Parra T. Association between HCV infection control and development of an specific cytotoxic cellular reservoir PD1 negative. **J Hepatol** **2008**; 48 (S2): S224. ISSN: 0168-8278.

- 11.- **Benito S**, Larrubia JR, Sanz de Villalobos E, Calvino M, García-Buey ML, García-Garzón S, González-Mateos F, González-Praetorius A, Miquel J, Bienvenido A, Parra T. Peg-Interferon-alpha plus ribavirin treatment induces a central memory specific CD8+ T cell reservoir in chronic hepatitis C patients with sustained virologic response. **J Hepatol** 2008; 48 (S2): S224. ISSN: 0168-8278.
- 12.- Calvino M, **Benito S**, Parra T, Pérez de Hornedo J, Arias A, Sanz de Villalobos E, González-Mateos F, García-Garzón S, Perna C, Bienvenido A, Larrubia JR. Role of CCR5 and CXCR3 chemokine receptors expression on CD8+ cells during chronic hepatitis C. **J Hepatol** 2007; 46 (S1): 170. ISSN: 0168-8278.
- 13.- M. Calvino, J. R. Larrubia, E. Sanz, J. Pérez, **S. Benito**, F. González, C. Perna, M. Montes, M. Rodríguez-Zapata, T. Parra, A. Bienvenido. T cell chemokine receptor expression and chemotaxis, associated to Th1/Tc1 response, in HCV infection and HIV-HCV co-infection. **J Hepatol** 2006; 44 (S2): 160. ISSN: 0168-8278.
- 14.- M. Calvino, J. R. Larrubia, E. Sanz, C. Perna, J. Pérez, **S. Benito**, F. González, T. Parra, A. Bienvenido. Chemokine receptor expression on T cells according to inflammatory activity and liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatol** 2006; 44 (S2): 161. ISSN: 0168-8278.

4. FINANCIACIÓN

A continuación se enumeran las ayudas recibidas para la financiación del proyecto y de la doctoranda:

- **Financiación del proyecto:**

Este trabajo ha sido financiado con las siguientes ayudas de investigación:

1. **Cuantificación y Expansión Clonal de Linfocitos T CD8+ Antígeno Específicos contra el VHC. Análisis por Tecnología Pentamérica.**

Exp: BECA ACAD 2006

Financiado: Asociación Castellana de Aparato Digestivo.

Inicio: 2006. Duración: un año.

Cantidad financiada: 4.000 euros.

Investigador principal: **Dr. Juan Ramón Larrubia.**

2. La molécula coestimuladora negativa PD-1 en la regulación de la respuesta citotóxica específica en la infección persistente por VHC. Relación con la respuesta al tratamiento antiviral.

Exp: FISCAM PI-2007/32

Financiado por la Junta de Comunidades de Castilla- La Mancha

Inicio: 2008. Duración: 3 años.

Cantidad financiada: 57.328 euros.

Investigador principal: **Dr. Juan Ramón Larrubia.**

3. Análisis de la vía PD-1/PD-L1 en las células Treg como mecanismo de escape del VHC a la respuesta celular citotóxica específica.

Exp: 2548/2008

Financiado por la Fundación Médica Mutua Madrileña

Inicio: 2008. Duración: 3 años.

Cantidad financiada: 31.500 euros.

Investigador principal: **Dr. Juan Ramón Larrubia.**

• **Financiación de la Doctoranda**

La doctoranda, Selma Benito Martínez, ha disfrutado las siguientes ayudas de investigación:

- Convenio de cooperación en Investigación entre el Hospital Universitario de Guadalajara y Schering Plough S.A. Junio 2005-Abril 2008.
- Contrato predoctoral de “Incorporación de Jóvenes Investigadores a Grupos de Investigación de Castilla La-Mancha”, concedida por la Fundación para la Investigación Sanitaria en Castilla la Mancha, FISCAM. Expediente: *MOV-2007/JI/18*. Abril 2008-Actualidad.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004;39(1):5-19.
2. Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet*. 1998;351(9099):351-5.
3. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29 Suppl 1:74-81.
4. Sacristan B, Gastanares MI, Elena A, Sacristan M, Barcenilla J, Garcia JC, et al. [Seroepidemiologic study of hepatitis C virus infection in a general population from the region of La Rioja, Spain]. *Med Clin (Barc)*. 1996; 107(9):331-5.
5. Dominguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salleras L. Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *J Med Virol*. 2001;65(4):688-93.
6. Riestra S, Fernandez E, Leiva P, Garcia S, Ocio G, Rodrigo L. Prevalence of hepatitis C virus infection in the general population of northern Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(5):477-81.
7. Sola R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jordi R, et al. [Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study]. *Med Clin (Barc)*. 2002;119(3):90-5.
8. Bruguera M, Forns X. [Hepatitis C in Spain]. *Med Clin (Barc)*. 2006 17;127(3):113-7.
9. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S93-8.
10. Conte D, Fraquelli M, Prati D, Colucci A, Minola E. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology*. 2000;31(3):751-5.
11. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S35-46.
12. Seeff LB. The natural history of hepatitis C-A quandary. *Hepatology*. 1998;28(6):1710-2.
13. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology*. 2000;32(1):91-6.
14. Nguyen MH, Whittemore AS, Garcia RT, Tawfeek SA, Ning J, Lam S, et al. Role of ethnicity in risk for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(9):820-4.
15. Vogt M, Lang T, Frosner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery

before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med.* 1999; ;341(12):866-70.

16. Koretz RL, Abbey H, Coleman E, Gitnick G. Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med.* 1993;119(2):110-5.

17. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, et al. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology.* 1995;21(3):639-44.

18. Massard J, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006;44(1 Suppl):S19-24.

19. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol.* 2001;34(5):730-9.

20. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996;23(6):1334-40.

21. Bissell DM. Sex and hepatic fibrosis. *Hepatology.* 1999;29(3):988-9.

22. Di Martino V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, Charlotte F, et al. Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology.* 2004;40(6):1426-33.

23. Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology.* 1998;28(3):805-9.

24. Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology.* 1999;30(4):1054-8.

25. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology.* 1997;112(2):463-72.

26. Serfaty L, Aumaitre H, Chazouilleres O, Bonnand AM, Rosmorduc O, Poupon RE, et al. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology.* 1998;27(5):1435-40.

27. Benvegnu L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut.* 2004;53(5):744-9.

28. El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med.* 1999 ;340(10):745-50.

29. Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Omata M. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology*. 1995;21(3):650-5.
30. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;22;358(9286):958-65.
31. Hayashi N, Takehara T. Antiviral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future. *J Gastroenterol*. 2006;41(1):17-27.
32. Weigand K, Stremmel W, Encke J. Treatment of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13(13):1897-905.
33. Craxi A. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2011
34. Bacon BR, GS, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S. HCV RESPOND-2 final results: high sustained virologic response among genotype 1 previous nonresponders and relapsers to peginterferon/ribavirin when retreated with boceprevir plus PegIntron/ribavirin. *Hepatology*. 2010;52:430A.
35. Jacobson IM, MJ, Dusheiko GM, Di Bisceglie AM, Reddy R, Bzowej NH. Telaprevir in combination with peginterferon and ribavirin in genotype 1 HCV treatment-naive patients: final results of Phase 3 advance study. *Hepatology*. 2010;52:427A.
36. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):96-102.
37. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-62.
38. Brown EA, Zhang H, Ping LH, Lemon SM. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(19):5041-5.
39. Pavio N, Lai MM. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci*. 2003;28(3):287-304.
40. De Francesco R, Neddermann P, Tomei L, Steinkuhler C, Gallinari P, Folgori A. Biochemical and immunologic properties of the nonstructural proteins of the hepatitis C virus: implications for development of antiviral agents and vaccines. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):69-83.
41. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(8):3392-6.

42. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis.* 1995;15(1):41-63.
43. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* 1992;66(5):3225-9.
44. Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, Kinoshita M, Ninomiya T, Ohta K, et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1995;48(9):820-5.
45. Blight K, Lesniewski RR, LaBrooy JT, Gowans EJ. Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology.* 1994;20(3):553-7.
46. Deforges S, Evlashev A, Perret M, Sodoyer M, Pouzol S, Scoazec JY, et al. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 9):2515-23.
47. Forton DM, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. *Metab Brain Dis.* 2004;19(3-4):383-91.
48. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 1998;282(5390):938-41.
49. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 2002;21(19):5017-25.
50. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol.* 2006;80(5):2418-28.
51. Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, et al. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(39):14067-72.
52. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41003-12.
53. Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol.* 2003;77(1):546-59.
54. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 2007; 446(7137):801-5.

55. Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, et al. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol*. 2008;82(10):5007-20.
56. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007;9(9):1089-97.
57. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2000;14(2):241-54.
58. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol*. 2011;19(2):95-103.
59. Tang H, Grise H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(2):49-65.
60. Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem*. 2007; 282(51):37158-69.
61. Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*. 2010; 51(1):43-53.
62. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*. 2007;81(24):13783-93.
63. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001; 413(6857):732-8.
64. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*. 2008; 454(7203):523-7.
65. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:1-20.
66. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1745-54.
67. Guo JT, Sohn JA, Zhu Q, Seeger C. Mechanism of the interferon alpha response against hepatitis C virus replicons. *Virology*. 2004; 325(1):71-81.
68. Taylor DR, Puig M, Darnell ME, Mihalik K, Feinstone SM. New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol*. 2005;79(10):6291-8.

69. Hui DJ, Bhasker CR, Merrick WC, Sen GC. Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39477-82.
70. Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R, Jr., Wang C, Ware F, Sodora DL, et al. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4650-5.
71. Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol.* 2009;83(8):3719-33.
72. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2992-7.
73. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* 2003;300(5622):1145-8.
74. Lin W, Kim SS, Yeung E, Kamegaya Y, Blackard JT, Kim KA, et al. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol.* 2006;80(18):9226-35.
75. Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, et al. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J.* 2003;17(3):488-90.
76. Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol.* 1999;73(10):8469-75.
77. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol.* 2001;75(13):6095-106.
78. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology.* 1997 ;230(2):217-27.
79. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science.* 1999;285(5424):107-10.
80. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev.* 2000;174:5-20.
81. Ortaldo JR, Bere EW, Hodge D, Young HA. Activating Ly-49 NK receptors: central role in cytokine and chemokine production. *J Immunol.* 2001;166(8):4994-9.

82. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:189-220.
83. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):957-64.
84. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science.* 1999;284(5415):825-9.
85. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2003;77(1):68-76.
86. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med.* 2002;195(1):35-41.
87. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med.* 2002;195(1):43-9.
88. Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzl FP, Lederman MM, et al. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol.* 2004;172(8):4907-16.
89. Larrubia JR, Benito-Martinez S, Miquel-Plaza J, Sanz-de-Villalobos E, Gonzalez-Mateos F, Parra T. Cytokines - their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009;101(5):343-51.
90. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Jung MC, Gruener N, Wachtler M, Backmund M, et al. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2005;41(3):643-51.
91. Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, et al. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology.* 2006;49(1-2):58-63.
92. Szabo G, Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology.* 2005;210(2-4):237-47.
93. Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee R, Schlicht HJ, et al. HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(23):10445-9.
94. Mizukoshi E, Rehermann B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol.* 2001;36(12):799-808.

95. Rubin RA, Falestiny M, Malet PF. Chronic hepatitis C. Advances in diagnostic testing and therapy. *Arch Intern Med.* 1994;154(4):387-92.
96. Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, et al. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis.* 2004;189(10):1846-55.
97. Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, et al. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14199-204.
98. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* 2003;197(5):633-42.
99. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzera A, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15394-9.
100. Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, et al. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology.* 1996;223(2):409-12.
101. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 1999;116(1):135-43.
102. Farci P, Alter HJ, Wong DC, Miller RH, Govindarajan S, Engle R, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 2;91(16):7792-6.
103. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science.* 2000;288(5464):339-44.
104. Ramsay AJ, Ruby J, Ramshaw IA. A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunol Today.* 1993;14(4):155-7.
105. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol.* 2000;1(3):199-205.
106. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 1999;117(4):933-41.

107. Diepolder HM, Zchoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Gerlach T, Pape GR. The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C. *J Mol Med.* 1996;74(10):583-8.
108. Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology.* 1997;25(2):449-58.
109. Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, et al. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology.* 2002;35(1):190-8.
110. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 2001;193(11):1285-94.
111. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
112. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med.* 2004;199(10):1401-8.
113. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198(12):1875-86.
114. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med.* 2002;196(2):255-60.
115. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):239-44.
116. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature.* 2002;420(6915):502-7.
117. Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol.* 2004;78(5):2454-9.
118. Li B, Greene MI. Special regulatory T-cell review: FOXP3 biochemistry in regulatory T cells--how diverse signals regulate suppression. *Immunology.* 2008;123(1):17-9.
119. Perrella A, Vitiello L, Atripaldi L, Conti P, Sbreglia C, Altamura S, et al. Elevated CD4+/CD25+ T cell frequency and function during acute hepatitis C presage chronic evolution. *Gut.* 2006;55(9):1370-1.

120. Claassen MA, de Knecht RJ, Tilanus HW, Janssen HL, Boonstra A. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *J Hepatol.* 2010;52(3):315-21.
121. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;166(12):7282-9.
122. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005;201(7):1061-7.
123. Taniguchi H, Kato N, Otsuka M, Goto T, Yoshida H, Shiratori Y, et al. Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription. *J Med Virol.* 2004;72(1):52-9.
124. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005;79(12):7860-7.
125. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology.* 2003;38(6):1437-48.
126. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2004;40(5):1062-71.
127. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1849-61.
128. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001;194(4):519-27.
129. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-77.
130. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis.* 2004;190(3):624-31.

131. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-45.
132. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133-41.
133. Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, et al. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science.* 2008;321(5887):408-11.
134. Rowan AG, Fletcher JM, Ryan EJ, Moran B, Hegarty JE, O'Farrelly C, et al. Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. *J Immunol.* 2008;181(7):4485-94.
135. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 1994;76(2):287-99.
136. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994;265(5171):528-30.
137. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 2006;45(4):183-91.
138. Williams DB, Vassilakos A, Suh WK. Peptide presentation by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol.* 1996;6(7):267-73.
139. Moskophidis D, Kioussis D. Contribution of virus-specific CD8+ cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model. *J Exp Med.* 1998;188(2):223-32.
140. Veerapu NS, Raghuraman S, Liang TJ, Heller T, Rehermann B. Sporadic reappearance of minute amounts of hepatitis C virus RNA after successful therapy stimulates cellular immune responses. *Gastroenterology.* 2011;140(2):676-85 e1.
141. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med.* 1996;2(10):1104-8.
142. Moskophidis D, Bategay M, van den Broek M, Laine E, Hoffmann-Rohrer U, Zinkernagel RM. Role of virus and host variables in virus persistence or immunopathological disease caused by a non-cytolytic virus. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 2):381-91.
143. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 1998;8(2):177-87.

144. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2003;197(12):1645-55.
145. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*. 2000;191(9):1499-512.
146. Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, et al. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2004;127(3):924-36.
147. Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, et al. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis*. 2000;181(5):1528-36.
148. Cucchiari M, Kammer AR, Grabscheid B, Diepolder HM, Gerlach TJ, Gruner N, et al. Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cell Immunol*. 2000;203(2):111-23.
149. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999;10(4):439-49.
150. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*. 2005;436(7053):946-52.
151. Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol*. 2005;32(2):75-85.
152. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, et al. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol*. 2000;30(9):2479-87.
153. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, et al. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol*. 2001;75(12):5550-8.
154. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2002;169(6):3447-58.
155. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):251-62.
156. van Lier RA, ten Berge IJ, Gamadia LE. Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):931-9.

157. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med*. 2001;194(7):953-66.
158. Willberg C, Barnes E, Klenerman P. HCV immunology--death and the maiden T cell. *Cell Death Differ*. 2003;10 Suppl 1:S39-47.
159. Larrubia JR, Benito-Martinez S, Miquel J, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Costimulatory molecule programmed death-1 in the cytotoxic response during chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2009;15(41):5129-40.
160. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
161. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001 Mar 23;291(5512):2413-7.
162. Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature*. 1994;369(6482):648-52.
163. Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science*. 1999;286(5443):1377-81.
164. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med*. 2002;195(12):1541-8.
165. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8732-7.
166. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med*. 2002;195(12):1523-32.
167. Bachmann MF, Barner M, Viola A, Kopf M. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol*. 1999;29(1):291-9.
168. Oehen S, Brduscha-Riem K. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol*. 1998;161(10):5338-46.
169. Cho BK, Wang C, Sugawa S, Eisen HN, Chen J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):2976-81.

170. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell*. 2002 ;111(6):837-51.
171. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*. 2003;4(3):225-34.
172. Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 2003;110(2):163-9.
173. Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):75-9.
174. Abele R, Tampe R. Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461(2):405-19.
175. van Endert PM, Saveanu L, Hewitt EW, Lehner P. Powering the peptide pump: TAP crosstalk with energetic nucleotides. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(9):454-61.
176. Spiliotis ET, Manley H, Osorio M, Zuniga MC, Edidin M. Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity*. 2000;13(6):841-51.
177. Chan AC, Shaw AS. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol*. 1996;8(3):394-401.
178. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 1994;76(2):263-74.
179. Kane LP, Lin J, Weiss A. It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol*. 2002;23(8):413-20.
180. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
181. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:305-34.
182. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):116-26.
183. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
184. Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11(2):203-10.
185. Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(3):391-6.

186. Liang L, Sha WC. The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(3):384-90.
187. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-48.
188. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:29-53.
189. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):193-209.
190. Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):265-73.
191. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* 2003;3(8):609-20.
192. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-35.
193. Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaja M, et al. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2000;191(3):495-502.
194. Fuller MJ, Khanolkar A, Tebo AE, Zajac AJ. Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J Immunol.* 2004;172(7):4204-14.
195. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med.* 1998;187(9):1383-93.
196. Srinivasan M, Frauwirth KA. Peripheral tolerance in CD8+ T cells. *Cytokine.* 2009;46(2):147-59.
197. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol.* 2004;78(11):5535-45.
198. Radziewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Obideen K, Wehbi M, et al. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol.* 2008;82(20):9808-22.
199. Wedemeyer H, Mizukoshi E, Davis AR, Bennink JR, Rehermann B. Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol.* 2001;75(23):11392-400.

200. Hohn H, Kortsik C, Tully G, Nilges K, Necker A, Freitag K, et al. Longitudinal analysis of Mycobacterium tuberculosis 19-kDa antigen-specific T cells in patients with pulmonary tuberculosis: association with disease activity and cross-reactivity to a peptide from HIVenv gp120. *Eur J Immunol.* 2003;33(6):1613-23.
201. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature.* 2003;426(6967):671-6.
202. Kim K, Lee CK, Sayers TJ, Muegge K, Durum SK. The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol.* 1998;160(12):5735-41.
203. Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, Muegge K, Durum SK. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14476-81.
204. Li WQ, Jiang Q, Khaled AR, Keller JR, Durum SK. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29160-6.
205. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996;8(5):765-72.
206. Grakoui A, John Wherry E, Hanson HL, Walker C, Ahmed R. Turning on the off switch: regulation of anti-viral T cell responses in the liver by the PD-1/PD-L1 pathway. *J Hepatol.* 2006 Oct;45(4):468-72.
207. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* 2006;27(4):195-201.
208. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13866-71.
209. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004;173(2):945-54.
210. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002;32(3):634-43.
211. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261-8.

212. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002;84(1):57-62.
213. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol.* 2002;169(10):5538-45.
214. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol.* 2003;33(10):2706-16.
215. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Lochmuller H, Melms A, et al. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J.* 2003;17(13):1892-4.
216. Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Ansari MJ, Akiba H, Tushima F, et al. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2003;198(1):71-8.
217. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.* 1998;188(12):2205-13.
218. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439(7077):682-7.
219. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006;12(10):1198-202.
220. Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol.* 2008;45(4):963-70.
221. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350-4.
222. Li YG, Chen LE, Chen GF, Wang FS. [Expressions and significance of B7-H1 and programmed death-1 in lymphocytes from patients with chronic hepatitis B virus infection]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2007;15(10):738-41.
223. Boni C, Fusicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol.* 2007;81(8):4215-25.

224. Kasprowicz V, Schulze Zur Wiesch J, Kuntzen T, Nolan BE, Longworth S, Berical A, et al. High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol*. 2008;82(6):3154-60.
225. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol*. 2006;80(22):11398-403.
226. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology*. 2008;134(7):1927-37, 37 e1-2.
227. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol*. 2007;81(17):9249-58.
228. Folgori A, Spada E, Pezzanera M, Ruggeri L, Mele A, Garbuglia AR, et al. Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance. *Gut*. 2006;55(7):1012-9.
229. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol*. 1991;32:223-54.
230. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456-62.
231. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
232. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000 ;256(1):12-8.
233. Kuwano K, Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22(2):147-9.
234. Holz LE, Bowen DG, Bertolino P. Mechanisms of T cell death in the liver: to Bim or not to Bim? *Dig Dis*. 2010;28(1):14-24.
235. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275(5303):1132-6.
236. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 2002;9(2):423-32.

237. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-89.
238. Okada H, Suh WK, Jin J, Woo M, Du C, Elia A, et al. Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2002;22(10):3509-17.
239. Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol*. 2005;174(11):6571-6.
240. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, et al. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*. 1988 333(6173):571-3.
241. Maraskovsky E, Teepe M, Morrissey PJ, Braddy S, Miller RE, Lynch DH, et al. Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *J Immunol*. 1996;157(12):5315-23.
242. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*. 1994;180(5):1955-60.
243. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-) B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*. 1998;20(4):394-7.
244. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2000;1(5):426-32.
245. Schluns KS, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):269-79.
246. Okamoto Y, Douek DC, McFarland RD, Koup RA. IL-7, the thymus, and naive T cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002;512:81-90.
247. Wiles MV, Ruiz P, Imhof BA. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol*. 1992;22(4):1037-42.
248. Gutierrez-Ramos JC, Toribio ML, Martinez C. Early T-cell development. *Nature*. 1993;361(6409):213.
249. Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, et al. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med*. 1993;178(3):1109-14.
250. Murray AM, Simm B, Beagley KW. Cytokine gene expression in murine fetal intestine: potential for extrathymic T cell development. *Cytokine*. 1998;10(5):337-45.
251. Michaelson MD, Mehler MF, Xu H, Gross RE, Kessler JA. Interleukin-7 is trophic for embryonic neurons and is expressed in developing brain. *Dev Biol*. 1996 Oct 10;179(1):251-63.

252. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, et al. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2945-53.
253. Golden-Mason L, Kelly AM, Traynor O, McEntee G, Kelly J, Hegarty JE, et al. Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine*. 2001;14(3):143-51.
254. Kroncke R, Loppnow H, Flad HD, Gerdes J. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol*. 1996;26(10):2541-4.
255. Kovanen PE, Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev*. 2004;202:67-83.
256. Boussiotis VA, Barber DL, Nakarai T, Freeman GJ, Gribben JG, Bernstein GM, et al. Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science*. 1994;266(5187):1039-42.
257. Leonard WJ. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol*. 2001;73(3):271-7.
258. Kittipatarin C, Khaled AR. Interlinking interleukin-7. *Cytokine*. 2007;39(1):75-83.
259. Khaled AR, Bulavin DV, Kittipatarin C, Li WQ, Alvarez M, Kim K, et al. Cytokine-driven cell cycling is mediated through Cdc25A. *J Cell Biol*. 2005;169(5):755-63.
260. Li WQ, Jiang Q, Aleem E, Kaldis P, Khaled AR, Durum SK. IL-7 promotes T cell proliferation through destabilization of p27Kip1. *J Exp Med*. 2006;203(3):573-82.
261. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1191-8.
262. Xue HH, Kovanen PE, Pise-Masison CA, Berg M, Radovich MF, Brady JN, et al. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13759-64.
263. Park JH, Yu Q, Erman B, Appelbaum JS, Montoya-Durango D, Grimes HL, et al. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity*. 2004;21(2):289-302.
264. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*. 2002;415(6874):922-6.

265. Erlacher M, Labi V, Manzl C, Bock G, Tzankov A, Hacker G, et al. Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med.* 2006;203(13):2939-51.
266. Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, et al. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* 2003;38(6):899-914.
267. Pellegrini M, Bouillet P, Robati M, Belz GT, Davey GM, Strasser A. Loss of Bim increases T cell production and function in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 2004;200(9):1189-95.
268. Li WQ, Guszczynski T, Hixon JA, Durum SK. Interleukin-7 regulates Bim proapoptotic activity in peripheral T-cell survival. *Mol Cell Biol.* 2010;30(3):590-600.
269. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 2001;15(12):1481-6.
270. van Leeuwen EM, de Bree GJ, Remmerswaal EB, Yong SL, Tesselaar K, ten Berge IJ, et al. IL-7 receptor alpha chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8+ T cells. *Blood.* 2005;106(6):2091-8.
271. Bengsch B, Spangenberg HC, Kersting N, Neumann-Haefelin C, Panther E, von Weizsacker F, et al. Analysis of CD127 and KLRG1 expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells reveals the existence of different memory T-cell subsets in the peripheral blood and liver. *J Virol.* 2007;81(2):945-53.
272. Radziejewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, et al. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol.* 2007;81(6):2545-53.
273. Wojciechowski S, Jordan MB, Zhu Y, White J, Zajac AJ, Hildeman DA. Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *Eur J Immunol.* 2006;36(7):1694-706.
274. Lopes AR, Kellam P, Das A, Dunn C, Kwan A, Turner J, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest.* 2008 May;118(5):1835-45.
275. Charlton MR, Pockros PJ, Harrison SA. Impact of obesity on treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2006;43(6):1177-86.
276. Romero-Gomez M. Insulin resistance and hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2006;12(44):7075-80.
277. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol.* 1991 Nov;13(3):372-4.

278. Larrubia JR, Calvino M, Benito S, Sanz-de-Villalobos E, Perna C, Perez-Hornedo J, et al. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2007;47(5):632-41.
279. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Grakoui A, Rice CM, Choo QL, et al. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2311-21.
280. Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T, Penna A, Boni C, et al. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology.* 2001;33(6):1533-43.
281. Himoudi N, Abraham JD, Fournillier A, Lone YC, Joubert A, Op De Beeck A, et al. Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection. *J Virol.* 2002;76(24):12735-46.
282. Morishima C, Musey L, Elizaga M, Gaba K, Allison M, Carithers RL, et al. Hepatitis C virus-specific cytolytic T cell responses after antiviral therapy. *Clin Immunol.* 2003;108(3):211-20.
283. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194(10):1395-406.
284. Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science.* 1996 Jan 12;271(5246):173-8.
285. Nowak MA, Bangham CR. Population dynamics of immune responses to persistent viruses. *Science.* 1996;272(5258):74-9.
286. Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, et al. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol.* 2002;76(24):12423-34.
287. Caetano J, Martinho A, Paiva A, Pais B, Valente C, Luxo C. Differences in hepatitis C virus (HCV)-specific CD8 T-cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV. *J Virol.* 2008;82(15):7567-77.
288. Bernardin F, Tobler L, Walsh I, Williams JD, Busch M, Delwart E. Clearance of hepatitis C virus RNA from the peripheral blood mononuclear cells of blood donors who spontaneously or therapeutically control their plasma viremia. *Hepatology.* 2008;47(5):1446-52.

289. Maylin S, Martinot-Peignoux M, Moucari R, Boyer N, Ripault MP, Cazals-Hatem D, et al. Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2008;135(3):821-9.
290. Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol*. 2004;78(11):5867-74.
291. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, Kubicka J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005;41(1):106-14.
292. Pham TN, King D, Macparland SA, McGrath JS, Reddy SB, Bursey FR, et al. Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection. *Gastroenterology*. 2008;134(3):812-22.
293. Dzhagalov I, Dunkle A, He YW. The anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 promotes T lymphocyte survival at multiple stages. *J Immunol*. 2008;181(1):521-8.
294. Vezys V, Masopust D, Kembell CC, Barber DL, O'Mara LA, Larsen CP, et al. Continuous recruitment of naive T cells contributes to heterogeneity of antiviral CD8 T cells during persistent infection. *J Exp Med*. 2006;203(10):2263-9.
295. Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S, et al. Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8⁺ T cells in HIV-infected individuals. *J Immunol*. 2005;174(5):2900-9.
296. Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Lohning M, Junt T, et al. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol*. 2005;35(3):738-45.
297. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med*. 2006;203(10):2281-92.
298. Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2007;45(3):588-601.
299. Urbani S, Amadei B, Fiscaro P, Tola D, Orlandini A, Sacchelli L, et al. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology*. 2006;44(1):126-39.
300. Fuller MJ, Hildeman DA, Sabbaj S, Gaddis DE, Tebo AE, Shang L, et al. Cutting edge: emergence of CD127^{high} functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *J Immunol*. 2005;174(10):5926-30.

301. Kasprowicz V, Kang YH, Lucas M, Schulze zur Wiesch J, Kuntzen T, Fleming V, et al. Hepatitis C virus (HCV) sequence variation induces an HCV-specific T-cell phenotype analogous to spontaneous resolution. *J Virol.* 2010;84(3):1656-63.
302. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest.* 2000;106(10):1239-49.
303. Sundstrom S, Ota S, Dimberg LY, Masucci MG, Bergqvist A. Hepatitis C virus core protein induces an anergic state characterized by decreased interleukin-2 production and perturbation of mitogen-activated protein kinase responses. *J Virol.* 2005;79(4):2230-9.
304. Lukens JR, Cruise MW, Lassen MG, Hahn YS. Blockade of PD-1/B7-H1 interaction restores effector CD8+ T cell responses in a hepatitis C virus core murine model. *J Immunol.* 2008;180(7):4875-84.
305. Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, et al. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol.* 2001;75(17):8240-50.
306. Masalova OV, Atanadze SN, Samokhvalov EI, Petrakova NV, Kalinina TI, Smirnov VD, et al. Detection of hepatitis C virus core protein circulating within different virus particle populations. *J Med Virol.* 1998;55(1):1-6.
307. Yao ZQ, King E, Prayther D, Yin D, Moorman J. T cell dysfunction by hepatitis C virus core protein involves PD-1/PDL-1 signaling. *Viral Immunol.* 2007 Summer;20(2):276-87.
308. Golden-Mason L, Klarquist J, Wahed AS, Rosen HR. Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J Immunol.* 2008;180(6):3637-41.
309. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 2002;8(4):379-85.
310. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A.* 2008;73(11):975-83.
311. Jeong HY, Lee YJ, Seo SK, Lee SW, Park SJ, Lee JN, et al. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukoc Biol.* 2008;83(3):755-64.
312. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000313.

313. von Herrath MG, Berger DP, Homann D, Tishon T, Sette A, Oldstone MB. Vaccination to treat persistent viral infection. *Virology*. 2000;268(2):411-9.
314. Dikici B, Kalayci AG, Ozgenc F, Bosnak M, Davutoglu M, Ece A, et al. Therapeutic vaccination in the immunotolerant phase of children with chronic hepatitis B infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(4):345-9.
315. Ha SJ, Mueller SN, Wherry EJ, Barber DL, Aubert RD, Sharpe AH, et al. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. *J Exp Med*. 2008;205(3):543-55.
316. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, et al. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*. 2009;458(7235):206-10.
317. Finnefrock AC, Tang A, Li F, Freed DC, Feng M, Cox KS, et al. PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination. *J Immunol*. 2009;182(2):980-7.
318. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
319. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001;291(5502):319-22.
320. Badr G, Bedard N, Abdel-Hakeem MS, Trautmann L, Willems B, Villeneuve JP, et al. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells. *J Virol*. 2008;82(20):10017-31.
321. Jamil S, Wang SW, Bondy L, Mojtabavi S, Duronio V. Prevention of cytokine withdrawal-induced apoptosis by Mcl-1 requires interaction between Mcl-1 and Bim. *Biochem Cell Biol*. 2009;88(5):809-18.
322. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994;73(8):2013-26.
323. Sandalova E, Wei CH, Masucci MG, Levitsky V. Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3011-6.