

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN PACIENTES CON  
INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC SOMETIDOS A TRATAMIENTO CON  
INTERFERÓN  $\alpha$  2b PEGILADO Y RIBAVIRINA.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARÍA SARA SIXTOS ALONSO

DIRECTOR DE TESIS: Dr. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ

MÉXICO, D. F.

MARZO 2006

MÉXICO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



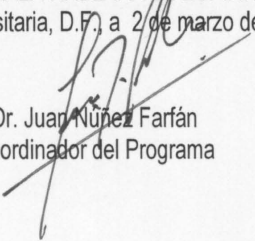
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno **SIXTOS ALONSO MARÍA SARA**, con número de cuenta **79080347** con la tesis titulada: "**Actividad de las células dendríticas en pacientes con infección crónica por VHC, sometidos a tratamiento con interferón  $\alpha$ -2b pegilado y ribavirina**", bajo la dirección del **Dr. David Kershenobich Stalnikowitz**.

Presidente:	Dr. Luis Llorente Peters
Vocal:	Dra. Margarita B. Dehesa Violante
Secretario:	Dr. David Kershenobich Stalnikowitz
Suplente:	Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Suplente:	Dr. Enrique Ortega Soto

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F. a 2 de marzo del 2006.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



## **COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Luis Llorente Peters**

**Dra. Margarita Dehesa Violante**

**Dr. David Kershenobich Stalnokowitz**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**

**Dr. Enrique Ortega Soto**

A Ramón Aureliano Alarcón

Y

a mis hijas Lucecita y Mariana

**A mis Padres**

**Isabel Alonso y Jesús Sixtos Trejo**

**A Moñita Alarcón y Margarita Marquet**

**A mis Hermanos:**

**Graciela, Gabriela, Carmen, Francisco, Benito y Miguel**

**Al Dr. David Kershenobich Stalnikowitz  
A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**

**Al Dr. Gumaro Cano Gutiérrez**

**A mis compañeras de trabajo por todo su apoyo  
QBP Araceli Martínez Castillo  
QFB. Socorro Cruz Castellanos  
Q. Rosa María Muñoz  
QFB. Tere Ramírez**

**A MVZ. Juan José Salazar**



# Índice

1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1 Epidemiología	9
2.2 Aspectos Clínicos de la infección por VHC	9
2.3 Diagnóstico del VHC	10
2.4 Tratamiento	11
2.5 Estructura y composición genética del VHC	13
2.6 Patogénesis de la Infección crónica porVHC	14
2.7 Respuesta inmune	16
2.8 Mecanismos de persistencia viral	17
2.9 Células Dendríticas	19
3. Objetivos	22
4. Hipótesis	23
5. Justificación	24
6. Material y Métodos	25
7. Resultados	29
8. Discusión	43
9. Conclusiones	47
10. Perspectivas de estudio	48
11. Bibliografía	49

## Resumen

El VHC es el principal agente etiológico de la hepatitis crónica. Hay evidencias de que la infección crónica por VHC puede modificar la actividad biológica de las células dendríticas (DC). En este estudio se determinó la actividad endocítica y capacidad aloestimuladora de DCs obtenidas de monocitos de pacientes con infección crónica por VHC de muestras: basal, 48 horas y 3 meses de tratamiento con interferón pegilado alfa 2b y ribavirina. Se seleccionaron 5 sujetos sanos como grupo control y 5 pacientes con infección crónica por VHC, se obtuvieron DC inmaduras y DC maduras por diferenciación y maduración celular "in vitro" de monocitos de sangre periférica. El estado de maduración se evaluó por la expresión de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR. Las DCs obtenidas de pacientes con infección crónica por VHC con Respuesta Viral Temprana (RVT) positiva al tratamiento, en condiciones basales diferenciaron y maduraron de manera similar al grupo control, a 48 horas tuvieron mayor expresión de las moléculas indicando el desarrollo de DC inmaduras preferentemente. Este efecto se pierde a los 3 meses de tratamiento. Los pacientes con RVT negativa tuvieron débil expresión de cada una de las moléculas. Sin embargo la actividad biológica en los 5 pacientes se mantiene por debajo a lo registrado en las DCs del grupo control. A 48 horas el tratamiento antiviral tiende a aumentar la diferenciación celular a DCi en pacientes con RVT, sin embargo no modifica la actividad endocítica y capacidad aloestimuladora de las DCs obtenidas de los pacientes.

# Introducción

## Epidemiología

El virus de la hepatitis C (VHC) es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica. La infección aguda frecuentemente es asintomática y aproximadamente el 80 % de los casos se convierten en portadores crónicos del virus. La progresión del daño hepático crónico por el VHC es variable y se caracteriza por el desarrollo de fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma (Lyra AC, Fan X, 2004).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay aproximadamente 200 millones de personas infectadas, lo cual corresponde al 3% de la población mundial. En México, la prevalencia de la infección por el VHC es del 1.2 millones de pacientes infectados (ENSA 2000, Carreteo-Velez, 2003).

La principal vía de transmisión del VHC es parenteral, por transfusión de sangre y/o sus derivados contaminados, en menor frecuencia es por el uso de jeringas contaminadas entre usuarios de drogas intravenosas, así como el uso de equipo mal esterilizado en procedimientos quirúrgicos, odontológicos, manicures, pedicures, tatuajes, perforaciones y acupuntura. La transmisión vertical madre e hijo es poco frecuente (Méndez N, 2005). La vía sexual es importante en casos de promiscuidad sexual.

Los grupos de riesgo son: receptores de órganos y transfusiones de sangre y/o sus derivados, pacientes en hemodiálisis, trabajadores de la salud, usuarios de drogas intravenosas. Se estima que el registro de prevalencia de la infección por VHC en los próximos años incrementa como consecuencia en el mejoramiento de los diferentes métodos de detección y diagnóstico de la enfermedad. Las complicaciones clínicas a largo plazo y la falla hepática terminal han convertido esta infección en un importante problema de salud pública (Méndez N, 2005).

## Aspectos clínicos de la infección por el VHC.

El periodo de incubación de la infección por VHC es de 5 a 12 semanas, las manifestaciones clínicas son mínimas y los signos que se presentan son inespecíficos, el más común es la sensación de fatiga, no hay ictericia y se estima que solamente el 20% de las infecciones agudas resuelven en forma espontánea y el 80% restante se establece como infección crónica después de 6 meses (Rehermann B, 2005).

La progresión del daño hepático crónico por la infección del VHC es variable pero se estima que es entre 15 y 20 años, hay inflamación hepática recurrente, desarrollo de fibrosis y se estima que del 10 al 20% de estos pacientes progresa a cirrosis hepática. Una vez que se establece la cirrosis, se presentan otras complicaciones clínicas como son: ascitis, hemorragia de várices y encefalopatía, las cuales marcan la transición de una enfermedad hepática compensada a una descompensada. La infección crónica también

esta asociada con el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular. El consumo de alcohol es un factor que contribuye en la progresión de la enfermedad y la hepatopatía en fase terminal por VHC, es actualmente la principal indicación para el trasplante hepático (Rehermann B, 2005).

## Diagnóstico del VHC

Actualmente se reconoce la importancia del diagnóstico oportuno de la infección crónica por el VHC para determinar el origen y para el manejo adecuado de las complicaciones clínicas de la lesión hepática progresiva (Pawlotsky JM, 2002). Así como para definir las estrategias de la terapia antiviral e implementar medidas encaminadas a reducir los factores de riesgo asociados con la transmisión (Méndez N, 2005).

Las pruebas empleadas para el diagnóstico de VHC son métodos sensibles y específicos, se dividen en métodos de escrutinio y moleculares (Gordillo RM 2004). Las pruebas de escrutinio detectan anticuerpos específicos contra diferentes epítopes del VHC. Son ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) de 3ª generación con sensibilidad y especificidad mayor al 98% y solamente indican exposición al VHC.

Actualmente existe en validación un ensayo inmunoenzimático para determinar anticuerpos contra el antígeno core del VHC, esta prueba es útil para diagnóstico de viremia en fase activa así como para el monitoreo de la respuesta al tratamiento antiviral y recidivas postratamiento ( Pradat P, 2004 Buti M, 2003).

Los métodos moleculares de tipo cuantitativo y cualitativo permiten determinar la presencia de RNA-VHC, cuantificar el número de copias del RNA-VHC (carga viral) así como para identificar el genotipo y subtipo del virus (Pawlotsky JM, 2002, Bullock GC,2002).

Para evaluar la severidad del daño hepático se ha propuesto un panel de marcadores bioquímicos séricos llamado Fibrotest (Forns X, 2003), el cual incluye diferentes marcadores de inflamación hepática como son: gamma glutamil transpeptidasa (GTP),  $\gamma$ -globulina, bilirrubina,  $\alpha$ -2 macroglobulina, haptoglobina y apolipoproteína A1.

Otros marcadores de daño tisular son metabolitos directamente involucrados en el proceso fibrogénico, como son el factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la colágena tipo I, III y IV, el ácido hialurónico (HA), la laminina, elastina, undulina, inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 1 y 2 (TIMP-1, TIMP-2). Sin embargo, la biopsia hepática es el único método directo que permite evaluar con un alto grado de confianza la severidad del daño hepático (Forns X, 2003).

## Tratamiento

El objetivo del tratamiento de la hepatitis crónica por VHC es la erradicación de la infección viral, la recuperación clínica y la protección inmune (McMahon Group, 2002). Sin embargo en la actualidad no hay una vacuna que permita prevenir la infección ni un tratamiento eficaz que garantice estos resultados.

La base de los diferentes tratamiento propuestos para la hepatitis crónica por VHC es el interferón, el cual se ha administrado como monoterapia o combinado con otros fármacos en diferentes esquemas y dosis con resultados limitados (Mc Mahon Group, 2002, Sánchez Tapia, 2004). La combinación de interferón pegilado (peg-IFN) y ribavirina tiene un efecto sinérgico e inducen una tasa de respuesta de casi el 60% en pacientes portadores del genotipo1 y mayor al 60 % en genotipos diferente al 1 (Ferenci P, 2005).

El peg-IFN es una molécula de Interferón- $\alpha$  acoplado a una molécula de polietilenglicol (peg) de 40kd (2a) o 12 Kd (2b), la estructura molecular que se obtiene, incrementa su vida media en circulación y mantiene concentraciones plasmáticas del fármaco por más tiempo, lo cual permite reducir la frecuencia en la administración del peg-INF a una dosis por semana.

El interferón actúa inhibiendo la replicación del VHC, modula la respuesta inmune ante los epitopes virales, bloquea la producción y liberación de viriones, también induce la muerte de las células infectadas a través de la activación de las células citotóxicas específicas al VHC (Lau JY, 2002). Sin embargo esta actividad no es necesariamente absoluta en todos los pacientes y este puede ser un factor en la variabilidad en la tasa de respuesta al tratamiento.

En cuanto al mecanismo de acción de la ribavirina (1- $\beta$ -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3 carboxamida), es aun controvertido ya que el efecto antiviral que tiene sobre el VHC es mínimo, sin embargo se ha propuesto que incrementa la inmunidad mediada por células T (CT), invierte la activación del fenotipo Th2 al Th1, inhibe la replicación del virus y eventualmente podría incrementar la tasa de mutaciones puntuales dando lugar un efecto de "error catastrófico" en la transcripción del genoma y causar así la inactivación total de la replicación del RNA viral (Drazan KE, 2000 and Lau J, 2002).

La dosis propuesta para el tratamiento de la hepatitis por virus C es de 80  $\mu$ g/semana de peg-Interferón  $\alpha$ -2b y 13 a 15 mg/Kg/día de Ribavirina por vía oral en dos tomas durante 24 semanas (Lin OS, 2001 y Mc Mahon Group 2002).

Actualmente el indicador de la eficacia del tratamiento es la respuesta viral sostenida (RVS), la cual se define como la ausencia de RNA-VHC en suero determinado por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 24 semanas después de terminado el tratamiento (Ferenci P, 2005).

Un factor pronóstico de RVS es la respuesta viral temprana (RVT) definida como la reducción en 2 log de la carga viral durante las primeras 12 semanas de tratamiento, actualmente es un indicador que formar parte de la vigilancia habitual del paciente en tratamiento. Se ha propuesto que los pacientes que no

obtienen RVT en la semana 12, tienen bajas posibilidades de presentar RVS y en ellos se debe revalorar la posibilidad de continuar o no la terapia. Se ha observado que la ausencia de una RVS esta asociada con patología hepática avanzada (McMahon Group 2002). La ausencia del RNA-VHC en suero relacionada con RVS requiere de vigilancia periódica, ya que hay pacientes que después de un período de tiempo vuelven a presentar actividad viral.

Las reacciones secundarias mas frecuentes a los tratamiento antivirales con peg-interferón- $\alpha$  y ribavirina son síndrome gripal, anormalidades hematológicas (disminución de leucocitos, anemia y plaquetopenia) y síntomas neuropsiquiátricos. La severidad de estos síntomas varían de un paciente a otro y son factores relacionados con la deserción al tratamiento (Linn OS, 2001).

## Estructura y composición genética del VHC

El virus de la hepatitis C (VHC) es una partícula de 50 nm, pertenece al género Hepacivirus de la familia *Flaviviridae*, su genoma es una molécula RNA monocatenario, lineal de sentido positivo con un peso molecular de 9.5 Kb, el cual codifica para la síntesis del RNA y de solo una lipoproteína viral que a su vez por proteólisis cotraduccional y postraduccional se fragmenta en 10 proteínas virales (Lyra AC, 2004)

Los extremos 5' y 3' son regiones del genoma del VHC no traducidas (UTR) y corresponden a secuencias altamente conservadas en todas las cepas del virus. La región intermedia a estos extremos, se le conoce como marco de lectura abierta y contiene la información genética para la síntesis del RNA viral y alternativamente para la traducción de la lipoproteína viral. En la región del extremo 5' del genoma del VHC se localizan los genes que codifican para las proteínas estructurales: la capsida o core y las glicoproteínas de envoltura viral E1 y E2 así como la proteína viral p7 (De Francesco R, 1999).

En la región del extremo 3' se encuentran los genes para la síntesis de las proteínas no estructurales; 2 (NS2), 3 (NS3) y 4A (NS4A) las cuales son una serina proteasa, una helicasa y un cofactor de la proteasa respectivamente, las proteínas no estructurales 4B y 5A (NS4B y NS5A) son cofactores de la replicación del virus y la región no estructural 5B (NS5B) es una RNA dependiente de la RNA polimerasa del virus. Entre las regiones E1 y E2 hay dos regiones de hipervariabilidad genómica 1 y 2 denominadas RHV1 y RHV2 (Drazan KE, 2000, Rehermann B, 2005)

### Genotipos

El VHC se encuentra clasificado en 6 genotipos mayores (del 1 al 6) y por lo menos en 70 subtipos (1a, 1b, 2a, 2b, 2c,...), a las regiones RHV1 y RHV2 se les ha adjudicado el origen de las cuasiespecies del VHC. El genotipo de mayor impacto epidemiológico es el 1 ya que es el de mayor prevalencia en el mundo y se le ha asociado con el curso más grave de la enfermedad mientras que los genotipos 2 y 3 son los que mejor respuesta tienen al tratamiento antiviral (Wertheimer AM, 2003, Bullock GC, 2002). Así el genotipo del VHC en un sujeto infectado tiene valor pronóstico a la terapia antiviral (Pawlotsky JM 2002, Buti M, 2004).

### Ciclo replicativo del VHC

El hepatocito humano es la principal célula blanco del VHC, es reservorio y sitio de replicación viral. También se ha propuesto que puede infectar otras poblaciones de células como: células mononucleares de sangre periférica, específicamente en monocitos, macrófagos, en células dendríticas, en células T (CT) y células B (CB). En circulación y médula ósea se han identificado partículas virales circulantes que forman complejos con inmunoglobulinas, lipoproteínas y plaquetas (Drazan KE, 2000)

Hay estudios que sugieren que la unión del VHC con la célula blanco, es a través de la interacción entre las proteínas E1 y E2 del virus y diversas moléculas de la membrana de la célula blanco que actúan como receptores. Entre las que se encuentran la glicoproteína CD81 presente en las CT asesinas naturales (TNK) y asesinas naturales (NK), linfocitos B (LB) y linfocitos T (LT), el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), el receptor atrapador o scavenger clase B tipo 1 (SR-BI) y la molécula de adhesión intracelular específica de la célula dendrítica (DC-SIGN) (Drazan KE, 2000) .

Una vez que se ha dado la interacción de las proteínas del virus con estas moléculas, la célula huésped lo introduce por endocitosis. La vesícula endocitaria lo deposita en el citoplasma y las proteínas de la envoltura y de la capsida se desdobl原因an y liberan al RNA-VHC (Reherman B, 2005).

El RNA-VHC se traduce alternativamente en una sola lipoproteína que contiene las proteínas estructurales y no estructurales del virus, estas son liberadas por proteólisis cotraduccional y postraduccional. La transcripción del genoma da origen a la nueva progenie viral. La capsida y el genoma se ensamblan para formar la partícula viral, la membrana exterior la adquiere de la membrana citoplasmática de la célula huésped cuando es exocitada al exterior de la célula. (Goffard AD, 2003).

A pesar de que se ha documentado el ciclo de replicación del VHC, aún se desconocen múltiples detalles relacionados con la interacción molecular, señalización y regulación entre la célula huésped y el virus.

### **Patogénesis de la infección crónica por VHC**

El hígado realiza múltiples funciones complejas y esenciales para la vida: recibe, procesa y almacena los nutrientes absorbidos en el tracto gastrointestinal. En respuesta a la demanda metabólica del organismo, libera metabolitos, sintetiza proteínas, ácidos biliares y colesterol. Es el principal sitio de detoxificación, catabolismo, regulación hormonal y se caracteriza por su alta capacidad de respuesta inflamatoria al daño de cualquier etiología (Drucker C. 2005).

El tejido hepático está constituido en un 70 a 80% por hepatocitos y junto con el ducto biliar realizan las funciones metabólicas y excretoras del hígado. Del 20 al 30% son células no parenquimatosas como: las células del sinusoides hepático, células de Kupffer (CK), células dendríticas y en menor número células asesinas naturales (NK) y células T asesinas naturales (NKT), linfocitos T y B encargadas de la función inmune de este órgano. El sistema inmune hepático es sumamente especializado ya que tiene la capacidad de responder y eliminar microorganismos patógenos, toxinas y eventualmente células tumorales en forma local. También se ha demostrado que tiende a desarrollar estados de tolerancia inmune (Drucker C. 2005).

Los agentes nocivos al hígado se dirigen preferentemente a los hepatocitos y células del conducto biliar, la respuesta al daño hepático involucra a otras células hepáticas como las células de Kupffer, endoteliales NK, NKT. Todas



ellas tienen actividad efectora y producen moléculas reactivas como citocinas, quimiocinas, icosanoides y especies reactivas de oxígeno (Colombo M, 2003).

Los procesos fisiológicos característicos del daño hepático son la muerte de células hepáticas, regeneración de hepatocitos, inflamación y fibrosis. El tejido hepático tiene una alta capacidad regenerativa siempre y cuando el agente agresor se elimine pero cuando esto no sucede desarrolla un proceso inflamatorio crónico y las consecuencias de este son el depósito de los componentes de la matriz extracelular (tejido fibroso), con el tiempo la arquitectura del tejido hepático se daña, su función se limita y hay muerte de las células hepáticas por mecanismos de necrosis, apoptosis o ambos. El daño hepático es como cualquier otro mecanismo de herida, si la pérdida celular es muy importante, el paciente muere antes de que ocurra la regeneración celular (Keeley S, 2003)

La fibrosis es una lesión en el tejido hepático equivalente a una cicatriz y se forma por depósitos de la matriz extracelular del hepatocito, principalmente por colágena tipo I, III, V y VI, fibronectina, undulina. Este depósito altera la arquitectura hepática ya que forman septos fibrosos entre las estructuras mesenquimatosas, modifica las conexiones vasculares y degenera en insuficiencia hepatocelular e hipertensión portal (Forns X, 2003)

Fisiológicamente este depósito limitan el flujo sanguíneo al hepatocito y con ello el aporte de oxígeno y nutrientes provocando la muerte celular y la continua formación de depósitos fibróticos. Cuando la fibrosis se generaliza en el tejido hepático cambia su arquitectura y disminuye drásticamente su función y da lugar a la cirrosis. En algunos casos, la cirrosis puede preceder al desarrollo de hepatocarcinoma. La gravedad del daño hepático y la velocidad de la progresión de la enfermedad varían ampliamente de un individuo a otro (Forns X, 2003).

## **Respuesta inmune**

Ante la presencia del VHC en los hepatocitos, las primeras células en actuar son las células NK inducidas por los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  (IFN  $\alpha$  y  $\beta$ ), IL-2, IL-12, estas células secretan IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , quimiocinas MIP-1  $\alpha/\beta$  e IP10, proporcionando así la primera línea de defensa ante la infección viral (Wang Q, 2005)

Las células NK y NKT no tienen receptores antígeno específicos del VHC pero ejercen citólisis irrestricta sobre las células infectadas por el virus. Se ha propuesto que CD81, glicoproteína de membrana de NK, NKT y otros tipos celulares, actúa como un receptor de la proteína E2-VHC. Esta unión bloquea la activación funcional de las células NK, disminuye su proliferación, la producción de citocinas y la liberación de gránulos citotóxicos (Triyani M. 2002).

Se ha demostrado que las subpoblaciones de células NK CD56+, CD3 hepáticas y las NKT CD56CD3+ disminuyen en número y capacidad secretora de IFN- $\gamma$  y citotoxicidad con la progresión del daño histológico por el VHC y en cirrosis hepática (Rehermman B, 2005).

Se ha propuesto que el VHC no tiene efecto citopático sobre las células que infecta, sino que el daño celular se debe a la respuesta inflamatoria del huésped ya que implica el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos y citocinas proinflamatorias, así como una gran actividad de los LT citotóxicos. Estos factores activan a las células estelares hepáticas, las cuales secretan grandes cantidades de matriz extracelular, inducen estrés oxidativo y provocan la muerte celular por necrosis dando lugar a la fibrosis (Nakamura I, 2000, Rehermann B, 2005).

La respuesta inmune adaptativa ante el VHC está regulada por las CT CD4+ a través de sus funciones efectoras, secretan IFN- $\gamma$ , citocinas Th1, promueven el reclutamiento de neutrófilos, su activación y la respuesta inflamatoria. Las citocinas Th2, regulan la producción de citocinas Th1 a través de la producción de IL-4 e IL-10. Se ha propuesto que el equilibrio en la regulación de la respuesta Th1/Th2 es uno de los mecanismos que podría condicionar la progresión del daño hepático por VHC (Boyer N, 2000).

Hay evidencias de que la intensidad de la respuesta antiviral CT CD4+ durante la infección aguda determina la progresión de la infección (Wertheimer AM, 2003). Los individuos que llegan a depurar el VHC y normalizan los niveles de ALT tienen una enérgica respuesta proliferativa de CT CD4+, principalmente contra los antígenos E2, NS3, NS4 y NS5. Mientras que la viremia persistente, está asociada con una débil respuesta CT CD4+ así como por la ausencia de respuesta de memoria CD4+ específicas al virus, condicionando así la reactivación de la infección y el daño hepático.

También se ha propuesto que hay una relación inversa entre las citocinas Th1 y carga viral: a mayor nivel de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) menor carga viral (RNA-VHC). En general se ha establecido que a una enérgica respuesta Th1 celular hay mayor probabilidad de eliminación del VHC y la persistencia de este, se asocia a una mayor respuesta tipo Th2 (Rehermann B, 2005).

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos, migran al tejido infectado, reconocen las células infectadas vía moléculas del CMH y suprimen la replicación viral, vía citólisis y citocinas antivirales. Se ha sugerido que el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  secretados por estas células tienen un efecto directo sobre la replicación viral en las células infectadas (Wang Q 2005)

La producción de anticuerpos específicos contra diversos antígenos virales como el Ag-core, y las proteínas E1 y E2 tienen un efecto neutralizante sobre las partículas virales libres y eventualmente puede proteger de la infección a otras células sanas, sin embargo no tienen ningún efecto sobre células infectadas y no determinan la resolución de la infección. Se ha documentado que a pesar de encontrar títulos altos de anticuerpos hay una franca progresión a la infección crónica y por el contrario, a títulos bajos se ha observado resolución espontánea de la infección. Por otra parte la baja eficiencia de los anticuerpos también se ha adjudicado a la elevada tasa de mutación del genoma viral (Rehermann B, 2005)

## **Mecanismos de persistencia del VHC.**

En términos generales de la respuesta inmune se han propuesto diversos mecanismos involucrados en la persistencia de la infección por el VHC y el daño celular hepático entre los se pueden mencionar:

- 1.- Una inadecuada respuesta inmune innata, relacionada con la disminución de la actividad de las células NK, NKT, LT citotóxicos y DC. Se ha propuesto que la unión de CD81 con E2-VHC tiene un efecto inhibitorio en la actividad citolítica y en la producción de INF por las células NK, así como la franca resistencia a los efectos del INF a pesar de que es un potente inductor del mismo (Boyer N, 2000).
- 2.- Se ha propuesto que las células dendríticas (DCs) pueden actuar como son reservorios del VHC (Wertheimer AM, 2003). Por lo que actividad biológica, endocitosis y la capacidad coestimuladora de estas células podría encontrarse disminuida en pacientes con infección crónica por VHC.
- 3.- El desarrollo de anticuerpos específicos a algunos antígenos del VHC como es : el antígeno core, E1, E2 y NS5B no confiere un efecto neutralizante a las partículas virales, ni inmunidad al huésped que favorezca la resolución de la infección.
- 4.- La posibilidad de que el VHC se pueda establecer y replicar en sitios extrahepáticos como: el bazo, órganos linfoides, riñón o páncreas, le permite evadir a las células del sistema inmune y permanecer latente por largos periodos de tiempo en el organismo huésped (Keeley S, 2003).
- 5.- La rápida diferenciación de respuesta Th1 a Th2 durante la fase aguda también esta asociada con la persistencia del virus (Nakamura I, 2000).
- 6.- La elevada frecuencia de mutaciones en el genoma del VHC que da origen a los diferentes genotipos, subtipos y cuasiespecies le permite evadir al sistema inmune (Boyer N, 2000).
- 7.- También se le confiere al VHC la capacidad de bloquear diferentes funciones efectoras de las células del sistema inmune como las de las células NK a través de la unión con CD81, así como la actividad biológica de las DC, entre otras (Wertheimer A, 2003).

## Células Dendríticas

Las células dendríticas (DC), son APC con capacidad de detectar y atrapar partículas, macromoléculas y microorganismos patógenos para procesarlos en fragmentos peptídicos. Sin embargo a diferencia de los macrófagos y LB sólo las DC tienen la capacidad de iniciar la respuesta inmune gracias a su excepcional capacidad de inducir la activación y diferenciación de las CT vírgenes a través de la presentación del antígeno asociado a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Théry C, 2001)

Las DC son de origen mieloide y linfoide, en circulación periférica sus precursores son los monocitos, en piel son las células de Langerhans y en tejido son las células interdigitantes (Ardavin C, 2001). La caracterización de estas células se basa en la expresión de ciertos agregados moleculares de diferenciación celular (Cluster differentiation CD) las cuales son glicoproteínas de membrana (Kunitani H, 2002).

Algunas de las moléculas de membrana más empleadas para identificar a las DC son: CD45, CD1a (receptor de antígenos lipídicos), CD14 (receptor de lipopolisacárido bacteriano), CD11c (integrina que actúa como receptor de la fracción C3bi del complemento del fibrinógeno y del factor X de la coagulación), CD123 (receptor de la subunidad alfa de la interleucina 3 (IL-3Ra)). La combinación de estos marcadores ha dado origen a una amplia variedad de subtipos y linajes de DC (Palucka C 2002).

Las DC se diferencian de sus precursores y maduran a través de dos estadios, como DC inmaduras (DCi) y como DC maduras (DCm). Cada estadio tiene características moleculares, morfológicas y funcionales bien definidas determinantes para su actividad biológica en la respuesta inmune (Ardavin C, 2000).

Como DCi se localizan en el tejido periférico y su principal actividad es detectar la presencia de microorganismos patógenos por lo que también se han definido como centinelas del sistema inmune. La activación y diferenciación de los precursores de las DCi se induce por la presencia de mediadores solubles proinflamatorios como el TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) factor estimulante de crecimiento de granulocitos macrófagos (GM-CSF) y proteínas de choque térmico, así como la activación de queratinocitos y células epiteliales en el sitio de infección o inflamación.

Las DCi reconocen a los microorganismos patógenos a través de patrones moleculares altamente conservados como carbohidratos, lípidos, lipopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos etc., expresados en la superficie de los microorganismos. El reconocimiento es a través de receptores específicos denominados receptores tipo Toll (TLRs), receptores de lectinas como DEC-205 y receptores de adhesión específicos de DCs, (DC-SIGN), receptores de manosa, de la fracción constante de Inmunoglobulinas (Fc) y del complemento. Los virus emplean mecanismos indirectos de reconocimiento

con las DC a través de una amplia variedad de moléculas de superficie y receptores que les permite anclarse y penetrar a la célula huésped (Palucka C, 2002 y Gatti E, 2003),

El procesamiento del antígeno tiene lugar en el fagosoma-lizosoma de la DCi y consiste en la digestión enzimática del patógeno endocitado y el resultado son múltiples fragmentos antigénicos del patógeno, asociados a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH- I o II). La selección de la molécula del MHC depende fundamentalmente de la naturaleza del antígeno de tal forma que los antígenos extracelulares son acoplados a moléculas MHC-II mientras que los antígenos intracelulares son acoplados a moléculas de CMH-I.

Los complejos antígeno-CMH son exocitados y traslocados a la membrana externa de la DCi. A partir de este momento la célula dendrítica disminuye su capacidad endocítica y procesadora de antígeno y puede iniciar su proceso de maduración (Palucka C, 2002)

La actividad endocítica de las DCi, es muy importante debido a que es una de las primeras barreras encaminadas a detener los agentes patógenos. Por lo que una adecuada diferenciación de sus precursores a este estadio, así como la expresión de los múltiples receptores de membrana son necesarios para fijar al patógeno, la elevada movilidad le permite desplazarse al sitio de la infección o lesión para atrapar al agente agresor. Como DCi presenta una débil expresión de los marcadores de diferenciación celular CD1a, CD83 propuesto como marcador de maduración de las DCs al igual que las moléculas de coestimulación C80, CD86 y HLA-DR, morfológicamente la célula aumenta de tamaño, presenta el desarrollo incipiente de dendritas, así como elevada activación de los receptores de membrana (Lechmann M, 2002).

Las (DCm), son células que ya expresan en su superficie los complejos antígeno-CMH (Ag-CMH) y requiere de la presencia de TNF- $\alpha$  o LPS como factores de maduración. En este estadio la DC ya no tiene actividad endocítica, disminuye la expresión de los receptores de antígeno y se desplazan a los órganos linfoides secundarios para presentar el complejo Ag-CMH a la CT CD4 vírgen. Durante su desplazamiento la DCm incrementa de manera importante la expresión de las moléculas de diferenciación CD1a, CD83, coestimulación: CD80, CD86, HLA-DR, CD40 y adhesión CD58 (LF-39), CD54 (ICAM-1 e ICAM-2). La expresión de estas moléculas es indispensable para que la interacción entre la DCm-Ag-CMH y la CT CD4 virgen sea efectiva en la inducción de la respuesta inmune específica: la presentación del Ag a través del CMH es la primera señal en la inducción de la respuesta inmune y la unión de las moléculas de coestimulación y adhesión de la DCm con sus ligandos en la CTCD4 es la segunda señal que confieren estabilidad al reconocimiento del antígeno (Kunitani H, 2002, Dilioglou S, 2003).

La ausencia de cualquiera de estas moléculas disminuye la eficiencia de la presentación del antígeno y por lo tanto la inducción de la respuesta inmune y puede generar estados de anergia a los antígenos procesados. Pero cuando

la interacción es efectiva hay liberación de mediadores solubles como el IFN- $\gamma$ , vIL-12, IL-4 e IL-10 cuya función es determinante en la señalización, activación y diferenciación celular (Knolle P, 2001).

### Células Dendríticas Hepáticas.

Las DC que se localizan en el hígado son de origen mieloide y linfoide y junto con los linfocitos conforman el sistema de vigilancia inmune en este órgano. En procesos agudos de infección o inflamación su tráfico es intenso y su activación crítica en la inducción de la respuesta inmune primaria (Knolle P, 2001).

En el tejido hepático las DCi se concentran en el área periportal y en el ducto biliar en donde ejercen una gran actividad endocítica. Su maduración es inducida por la presencia de virus, TNF- $\alpha$  y LPS, su migración hacia los nódulos linfáticos está dirigida por la proteína inflamatoria de macrófagos-3a (MIP-3a). Como células maduras expresan tanto moléculas de coestimulación como de adhesión (Kunitani I, 2002).

Se ha sugerido que las células de células de Kupffer secretan quimiocinas que atraen y fijan a las DC a través de una vía de adhesión selectiva que dirige su extravasación hacia el área porta para interactuar con las CT virgen. Como células efectoras las DC producen IL-12, aunque en presencia de factores como las prostaglandinas y la vitamina D maduran con una capacidad secretora de IL10 la cual dirige la diferenciación de CT al subtipo Th2 (Limmer A, 2001).

Se ha descrito que las DC en hígado pueden inducir la inmunidad a través de la activación de las CT CD4+ o inducir tolerancia inmune a través de la inactivación de CT autorreactivas por anergia o apoptosis. Sin embargo se desconocen las señales que determinan que una DC sea inmunogénica o tolerogénica (Kapsenberg 2003), las citocinas secretadas en estadios tempranos de la respuesta inmune primaria, son factores críticos en la inducción del tipo de respuesta ya que mientras que la IL-12 tiene efecto activador sobre las CT para orientar la respuesta hacia el subtipo Th1, la IL-4 induce la diferenciación hacia el subtipo Th2, este tipo de respuesta induce la secreción de citocinas que dirigen la respuesta humoral e inhiben la celular. Una de ellas es la IL-10 que se ha asociado con los efectos de la tolerancia (Limmer A, 2001).

# Objetivos

## 1.- Objetivo general

Determinar la actividad biológica (endocitosis y capacidad aloestimuladora) de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica de un grupo de pacientes con infección crónica por el virus de Hepatitis C que estén en tratamiento antiviral con peginterferón  $\alpha$  2b y ribavirina.

## 2.- Objetivos particulares

- 1.- Generar células dendríticas inmaduras y maduras a partir de monocitos de sangre periférica obtenida de pacientes con infección crónica por VHC en condiciones basales, a 48 horas y 3 meses de tratamiento antiviral.
- 2.- Determinar el efecto del tratamiento antiviral en el proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas obtenidas de pacientes con infección crónica por VHC en condiciones basales a 48 horas y 3 meses de tratamiento antiviral.
- 3.- Determinar si el tratamiento antiviral modifica la actividad endocítica de las Células Dendríticas inmaduras obtenidas de pacientes con infección crónica por VHC sometidos a tratamiento antiviral en condiciones basales, a 48hr y 12 semanas de tratamiento.
- 4.- Determinar si el tratamiento antiviral modifica la capacidad aloestimuladora de las células dendríticas maduras obtenidas de pacientes con infección crónica por VHC sometidos a tratamiento antiviral en condiciones basales, a 48hr y 12 semanas de tratamiento.

## **Hipótesis**

El tratamiento antiviral con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina puede inducir un proceso de diferenciación y maduración celular que incremente la actividad biológica de las células dendríticas, de pacientes con infección crónica por virus de hepatitis C en etapas tempranas al tratamiento.



## **Justificación**

El VHC es una de las primeras causas de enfermedad hepática crónica, el impacto personal, social y económico que conllevan las complicaciones clínicas como son la cirrosis y el hepatocarcinoma lo hacen un problema de salud pública.

La ausencia de una vacuna para prevenir la infección por VHC así como los tratamientos actuales de eficacia limitada en el manejo de la infección crónica, obligan a estudiar todos los factores que pueden estar relacionados con el establecimiento y progresión de la enfermedad.

Se ha propuesto que la calidad en la respuesta inmune del huésped contribuye de manera importante con la persistencia viral, la actividad biológica de diferentes poblaciones de células se encuentra limitada durante la infección crónica, entre ellas las células dendríticas clasificadas como APC cuya actividad es determinante en la inducción de la respuesta inmune específica.

En los últimos años se han propuesto que las DC pueden actuar como reservorios y posibles sitios de replicación del VHC, sin embargo, se desconocen las interacciones DCs-VHC que limitan su actividad biológica y el efecto permisivo que eventualmente puede participar en la progresión de la enfermedad. Por otra parte se ha documentado que estas células pueden llegar a desarrollar estados de tolerancia inmunológica, aunque también se desconoce si este hecho puede ser inducido por la actividad del virus y si tiene un efecto permisivo en la infección.

## **Material y Métodos**

### **I. Pacientes y Controles**

Se seleccionaron: un grupo control de 5 sujetos clínicamente sanos, sin evidencia de enfermedad autoinmune, negativos al consumo de alcohol a dosis mayor o igual a 80 grs/día y negativos al virus de hepatitis C (VHC), virus de hepatitis B (VHB) y al virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Y un grupo de 5 pacientes con infección crónica por VHC, negativos al VHB y al VIH. Como criterios de exclusión se observó que no tuvieran enfermedad hepática de etiología diferente al VHC, enfermedad autoinmune, negativos al consumo de alcohol a dosis mayor o igual a 80 g/día, niveles de Hemoglobina (Hb) < a 12 g/dl, cuenta de leucocitos < 1500/mm<sup>3</sup>, plaquetas < 100,000 mm<sup>3</sup> y alteraciones psiquiátricas (McMahon group, 2002).

Al grupo de pacientes se le determinó el genotipo VHC y la carga viral (RNA-VHC) basal por RT-PCR Cobas Amplicor Roche, se inicio tratamiento antiviral con Peg-interferón  $\alpha$ -2b y ribavirina a dosis de 80  $\mu$ g/semana por vía subcutánea y 13-15 mg/kg/día por vía oral respectivamente en dos tomas durante 24 semanas (Mc Mahon Group 2002)

### **II. Obtención y separación de monocitos como célula precursora de DCs**

De cada sujeto control y paciente se obtuvo una muestra de sangre periférica con anticoagulante (ácido etilendiamintetracético, EDTA) al 2%, se separaron las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) por gradiente de densidad usando Ficoll-Hypaque (Gorodezky C, 2003). Enseguida se purificaron los monocitos por depleción negativa con anticuerpos monoclonales anti-CD14, utilizando columnas magnéticas (Miltenyi-Biotec).

### **Diferenciación de monocitos a DCi**

Los monocitos CD14+, obtenidos y purificados por depleción negativa, se emplearon como células precursoras para generar DCs. Se incubaron 1X10<sup>6</sup> cel/ml) en placas de cultivo celular en medio RPMI-1640 suplementado con suero de ternera fetal (SCF) al 20%, L-glutamina 2mM, penicilina-estreptomicina al 1%. Se adicionó factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) 2400 U/ml e interleucina 4 (IL-4) 1500 U/ml, se incubaron a 37°C y  $\pm$ 5% CO<sub>2</sub> durante 7d para inducir la diferenciación a DCi (Pillarsetty V, 2003 y Ebner S, 2001). Se realizo recambio del medio de cultivo cada 48h. Al término de este período se realizaron ensayos de inmunotinción con anticuerpos monoclonales para las glicoproteínas de membrana CD1a, CD83 CD80, CD86 y HLA-DR propuestos como un panel de marcadores de diferenciación celular y maduración celular (Auffermann G, 2001).

La diferenciación celular también se evaluó por los cambios morfológicos observados en las células en cultivo, como aumento del tamaño celular,

desarrollo de dendritas en la periferia de la célula, la formación de agrupamientos de las células en cultivo y la adherencia a la placa así como la expresión de los marcadores de diferenciación y maduración celular expresados en términos de la intensidad media de fluorescencia (IMF). A los 7d de cultivo se determinó la actividad endocítica de las DCi obtenidas, específica de este estadio (Pillarisety VG, 2003).

### **Maduración de DCi a DCm.**

La maduración de las DCi obtenidas tras 7d de incubación, fue inducida con GM-CSF y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 10 ng/ml durante 48h de incubación en RPMI-1640 suplementado al 20% con SCF a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al final de este periodo se evaluaron las características morfológicas como el incremento en la longitud de las dendritas, en el tamaño celular y la pérdida de la adherencia celular a la placa de cultivo. Se realizó la inmunotinción con anticuerpos monoclonales para detectar los marcadores de diferenciación y maduración celular CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR expresados en la superficie de las DCs obtenidas en cultivo. La maduración de las DCs se interpretó como un segundo incremento en la expresión de cada uno de los marcadores, en este estadio se evaluó la capacidad aloestimuladora de las DCm en cultivos de mezcla de reacción de leucocitos (Morrison RS, 2003).

### **Inmunotinción de los marcadores de diferenciación y maduración de DCs**

La inmunotinción de los marcadores de diferenciación y maduración de DCs CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR se realizó en cada estadio de maduración monocitos CD14+, DCi y DCm de controles y de pacientes. En pacientes fue en muestras de los tiempos basal, 48h y 3m de tratamiento antiviral.

Se emplearon anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano para CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), PerCP o ficoeritrina (PE). Se emplearon controles de isotipo para cada fluorocromo (Pharmingen). El seguimiento del fenotipo de las DCs obtenidas en los diferentes estadios se realizó con anticuerpos monoclonales antihumano para CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>débi</sup> en monocitos, DCi y DCm, cuya expresión incrementa de manera progresiva en cada estadio de maduración celular.

Se obtuvieron 3-4 X10<sup>6</sup> células en cada estadio y se tiñeron con 10  $\mu$ l de cada anticuerpo monoclonal en 50  $\mu$ l de solución buffer de fosfatos IX (PBS IX) pH 7.3 adicionado con albúmina sérica bovina (0.1%) durante 20 minutos a 4°C, protegidos de la luz, al final de la incubación se lavaron y se fijaron en PBS IX adicionado con p-formaldehído al 1.5%

Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FacScan de Becton Dickinson. Se analizaron 10 000 eventos por ensayo y se registro la intensidad media de la fluorescencia debida a la expresión de cada marcador.

Los anticuerpos monoclonales empleados en nuestro protocolo, para identificar las células de interés y determinar su estado de diferenciación y maduración celular a través de la expresión de estos fueron los siguientes:

Marcador o glicoproteína de membrana	Monocito	i DCs	mDCs
Identificar DCs			
CD11c	++	+++	++++
CD123	bajo	+	+
CD1a	-	+	++
Marcador de maduración de DCs			
CD83	-	+	++
Marcador de coestimulación de DCs			
CD80	débil	++	+++
CD86	débil	++	+++
Marcador de presentación de antígeno			
HLA-DR	+	++	+++

DCi células dendríticas inmaduras, DCm células dendríticas maduras. Grado de expresión negativo, débil: expresión muy baja, + baja, ++alta +++muy alta ( Morrison RS, 2003).

### Ensayo de Endocitosis.

Para evaluar la actividad endocítica de las DCi se colocaron 2 cubreobjetos en la placa de cultivo y se mantuvieron durante los 7d del cultivo, las DCi adheridas a ellos se emplearon para realizar el ensayo de endocitosis directamente en las células adheridas al cubreobjetos.

Como antígeno de prueba se emplearon partículas de la pared de *Saccharomices cerevicea* (zymosan), previamente activado en suero normal 5mg/ml. El cubreobjetos con las DCi adheridas a su superficie, se incubaron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) junto con la suspensión de zymosan (100µl) durante 20 minutos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> al termino de este tiempo la reacción se detuvo con n-1-naftiletilendiamina (NEM) frío. El ensayo se realizó en presencia de EDTA y colchicina para obtener una distribución uniforme. Las células se fijan al cubreobjetos con etanol:formaldehído (9:1) y se tiñeron con colorantes fastgreen y metilgreen (2%) durante 7 minutos cada uno, se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante cada vez, se dejaron secar a temperatura ambiente y por microscopia de luz, se determino el porcentaje de células que endocitaron partículas de zymosan, tomando positivas a aquellas DCi en cuyo interior se aprecian de 3 a 5 partículas.

El ensayo se hizo por duplicado y paralelamente se trabajo un control negativo al cual se le adiciono NEM junto con la suspensión de zymosan, la incubación se efectuó a 4°C, los siguientes pasos del procedimiento se manejaron igual que la muestra problema.

### **Cultivo de mezcla de reacción de linfocitos (MRL) de CD4+ con DCm Microtécnica.**

Para evaluar la capacidad aloestimuladora de las DCm obtenidas en cultivo, se realizo un ensayo de mezcla de reacción de leucocitos (MLR) con CT CD4 + allogénicas de sangre periférica de un control sano obtenidas por depleción negativa con columnas magnéticas.

Las DCm obtenidas a 9 días de cultivo se cosecharon y se resuspendieron en RPMI-1640, SCF 20% 3-5 X10<sup>5</sup> células y se mezclaron con CT CD4+ en una proporción (1:1), en tubos de cultivo celular a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y se incubaron durante 5d, 16h previas al final del tiempo de incubación se pulsaron con 1 µCi de Timidina-H<sup>3</sup> (NUC Pharmaceutical), se detecto la incorporación de Timidina-H<sup>3</sup> en cuentas por minuto (cpm) en un contador de radiaciones beta (Beckmman) y se reportó como un índice de transformación celular (IT) obtenido a partir de las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en las células respondedoras/cpm células control negativo. (Gorodezky C, 2002 Tourkova I, 2001))

## RESULTADOS

Los datos demográficos de la población estudiada se muestran en la tabla 1. El grupo control sano estuvo constituido por 3 hombres y 2 mujeres con una edad promedio de  $32.5 \pm 6$  años, clínicamente sanos y negativos al VHC. El grupo de pacientes con infección crónica por VHC, se seleccionaron 2 hombres 3 mujeres con una edad promedio de 46.5 años, dos de ellos portadores del genotipo 1a, dos del genotipo 1b y uno del genotipo 3a. El grupo de pacientes recibió tratamiento antiviral con peg-interferón  $\alpha$ -2b y ribavirina durante tres meses a dosis de 1.5  $\mu$ g/kg de peso/semana por vía subcutánea y 13-15 mg/kg de peso/día por vía oral (Mc Mahon Group 2002).

### Resultados de la carga viral.

Se determinó la carga viral a cada uno de los pacientes con infección crónica por VHC en la muestra basal y a las 48h y 3m de tratamiento tabla 1. De los cinco pacientes estudiados, dos hombres y 1 mujer portadores de los genotipo 1a, 1b y 3a del VHC respectivamente disminuyeron la carga viral en más de 2 log a los 3 meses de tratamiento, de acuerdo a los criterios de los análisis de las guías 2002 para el tratamiento de hepatitis C (McMahon Group, 2002). Estos pacientes tuvieron RVT positiva al tratamiento (RVT<sup>pos</sup>). En los otros dos pacientes, mujeres con genotipos 1a y 1b la disminución en la carga viral fue menor a 2 log estos pacientes se identificaron con RVT negativa al tratamiento (RVT<sup>neg</sup>).

Pacientes VHC+	Genero	Edad (años)	Genotipo	Carga viral (RNA-VHC) UI/ml			Respuesta
				Basal	48 hr de Tx	3 meses de Tx	
1	F	45	3 <sup>a</sup>	145,348	226	87	RVT <sup>pos</sup>
2	F	50	1b	840,000	707,289	4,500	RVT <sup>neg</sup>
3	M	55	1 <sup>a</sup>	40,696	109	Negativo	RVT <sup>pos</sup>
4	F	45	1 <sup>a</sup>	409,884	153,404	5349	RVT <sup>neg</sup>
5	M	37	1b	6,279,070	1234	29	RVT <sup>pos</sup>

Tabla 1 Pacientes con infección crónica por VHC en tratamiento con peg-interferon  $\alpha$  2b y ribavirina carga viral (RNA-VHC) basal a 48 horas y 3 meses de tratamiento. (RVT<sup>pos</sup>) respuesta viral temprana positiva (RVT<sup>neg</sup>), respuesta viral temprana negativa a 3 meses de tratamiento.

A 48h del tratamiento en los pacientes identificados con RVT<sup>pos</sup> se observó un descenso muy importante, de casi 2 log) en la carga viral basal, mientras que los pacientes con RVT<sup>neg</sup> la carga viral se mantienen alta.

### Características morfológicas de las DCs derivadas de monocitos de sangre periférica

Aproximadamente el 15 a 20% de las CMNSP obtenidas de cada uno de los controles y pacientes fueron positivas para CD14+ y se identificaron como monocitos de SP a 7 días de cultivo, el 90% de estas células desarrollaron morfología característica de DCs (Ebner S, 2001), presentaron adherencia a la placa de cultivo y se desarrollaron en agrupamientos (“clusters”), se observó incremento en el tamaño celular así como desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas o dendritas en la periferia de la membrana celular. A 9d de cultivo, fase de maduración, las células se separaron y se liberaron al medio de cultivo, cualitativamente mostraron un segundo incremento en el tamaño de la célula y de las dendritas figuras 1 y 2. Las DCs obtenidas de sujetos sanos y de pacientes presentaron características morfológicas similares. Las células precursoras de pacientes y controles fueron positivas para CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>débil</sup>. En todos los estadios es un parámetro de identificación específicos de DCs (Pillarisetty VG, 2003)

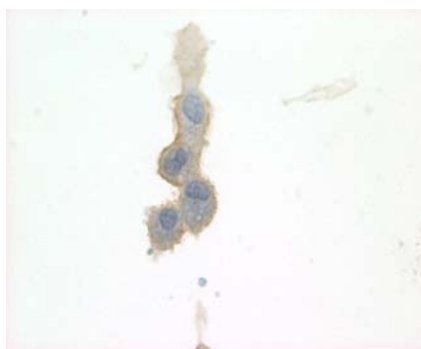


Figura 1 DCi 9 días de cultivo con GMCSF e IL-4  
tinción S-100



Figura 2 DCm 9 días de cultivo  
tinción S-100

## Imunotinción de los marcadores de diferenciación y maduración celular

Se determinó la expresión de cada uno de los marcadores de diferenciación y maduración celular CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR, en los monocitos y en las DCi y DCm obtenidas a 7 y 9 d de cultivo respectivamente con anticuerpos monoclonales específicos para cada molécula, marcados con un fluorocromo. La IMF registrada fue directamente proporcional a la expresión de cada marcador.

El evento de diferenciación celular de los monocitos a DCi se interpretó como el incremento en la IMF de cada uno de los marcadores en respuesta al estímulo de GM-CSF e IL-4 determinado a los 7d de cultivo. La maduración de DCi a DCm se interpretó como un segundo incremento en la IMF de cada uno

de los marcadores en respuesta al estímulo de TNF- $\alpha$  durante las 48 h previas al término de la incubación.

Se hizo análisis estadístico con prueba de T-Friedman y Wilcoxon para muestras relacionadas y no relacionadas con significancia estadística para  $p < 0.050$ . La diferenciación y maduración celular se evaluó como un evento continuo. El promedio de la IMF de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR en monocitos, CDi y DCm obtenidos de las muestras basal, 48h y 3m de tratamiento para cada grupo.

### **Inmunotinción de los marcadores de diferenciación y maduración celular de las DCs del grupo control sano**

De acuerdo a la expresión (IMF) de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR en las DCs obtenidas del grupo control tabla 2, presentaron diferenciación y maduración celular significativa  $p < 0.05$  en respuesta a los estímulos de IL-4, GM-CSF y TNF- $\alpha$ . El incremento en la expresión de cada uno de los marcadores fue progresivo y la diferencia de la IMF con el estadio de maduración previo fue significativo. (graficas 1-5).

### **Inmunotinción de los marcadores de diferenciación y maduración celular de las DCs de los pacientes con RVT<sup>pos</sup>**

La expresión (IMF) de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR en las DCs obtenidas de las muestras basal, a 48h y 3m derivadas de los pacientes con RVT<sup>pos</sup> al tratamiento con peg-interferón  $\alpha$ -2b y ribavirina tabla 2, muestran, con excepción de CD1a, que las DCs obtenidas de la muestra basal presentaron diferenciación y maduración celular significativa  $p < 0.05$  en respuesta a los estímulos de IL-4, GM-CSF y TNF- $\alpha$  la expresión de cada uno de los marcadores fue progresivo y la diferencia de la IMF de cada uno de ellos con el estadio predecesor fue significativo (graficas 1-5).

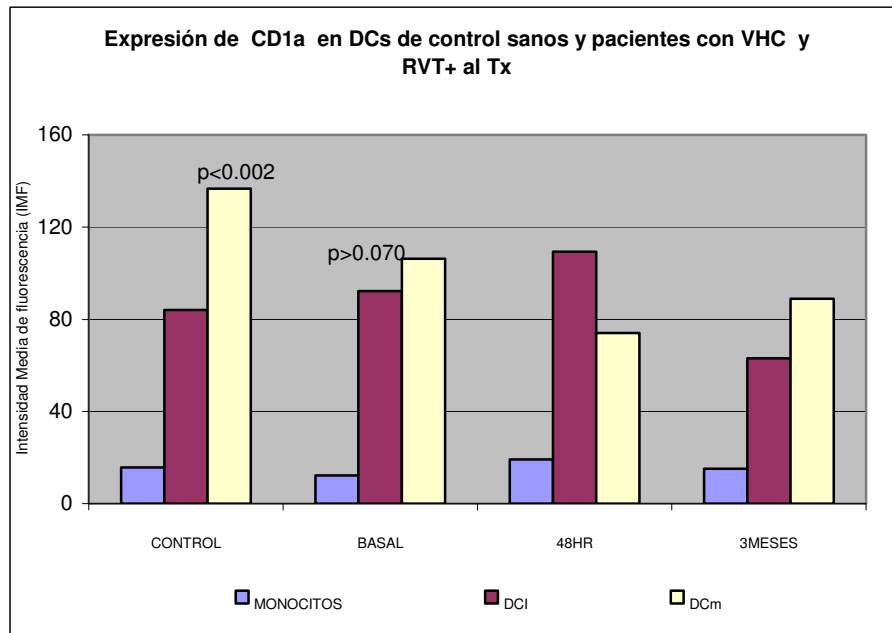
La IMF debida a la expresión de CD1, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR tiene su valor mas alto en las DCs obtenidas por diferenciación y maduración celular in "vitro" de las células obtenidas a 48h del tratamiento de pacientes aunque el proceso de diferenciación y maduración celular para estas células fue no significativo  $p > 0.05$  es decir la maduración celular en términos de CD1a, CD83 y CD80 fue parcial graficas 1-5

A 3m de tratamiento la expresión de cada uno de los marcadores en las DCs obtenidas fue menor que en las DCs basal y de 48h. La diferenciación y maduración celular fue no significativa ( $p > 0.07$ ) Las DCs obtenidas en esta muestra responden principalmente a los estímulos de diferenciación celular con IL-4 y GM-CSF, TNF- $\alpha$  no induce la maduración celular de las DCi (graficas 1-5).

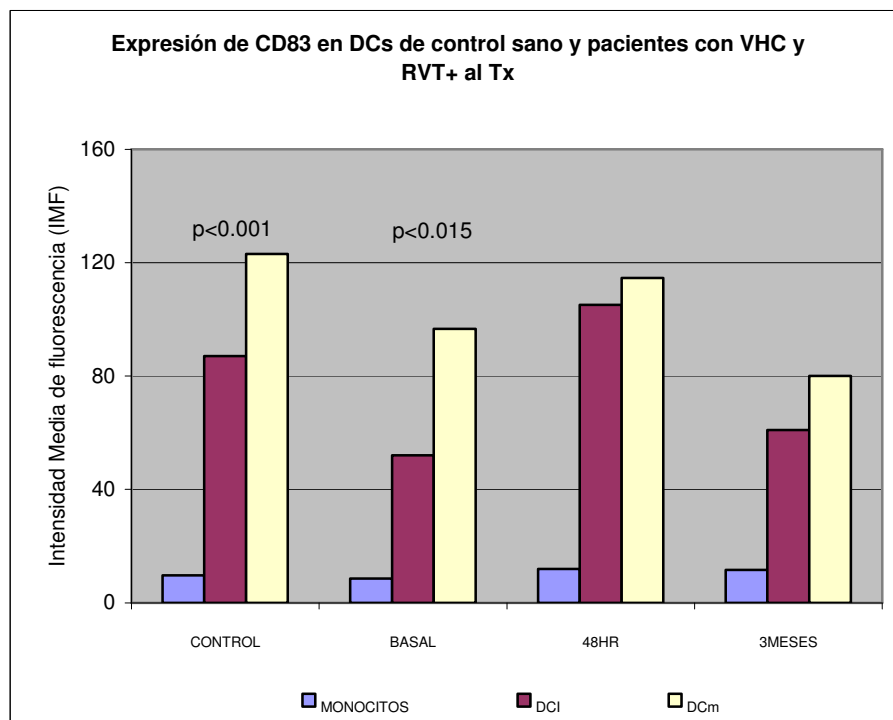


Marcadores de diferenciación y maduración celular en DCs	Monocitos IMF	DC inmaduras IMF	DC maduras IMF
<b>CD1a</b>			
Control sano	15.8 ± 9.7	84.11 ± 31	136.6 ± 51
RVT <sup>pos</sup> Basal	12.3 ± 3.2	92.3 ± 33.2	106.3 ± 49.5
48 h Tx	19.3 ± 6.4	109.3 ± 37.2	127 ± 50.68
3 meses Tx	15.3 ± 4	63.0 ± 2.8	89 ± 7
<b>CD83</b>			
Control sano	9.77 ± 4	87 ± 20	123 ± 38
RVT <sup>pos</sup> Basal	8.6 ± 2.8	52 ± 40.0	95.6 ± 51.6
48 h Tx	12 ± 2.6	105 ± 64	114.6 ± 52.15
3 meses Tx	11.6 ± 1.5	61 ± 3	80 ± 20
<b>CD80</b>			
Control sano	11.23 ± 8	86.31 ± 25	125 ± 40
RVT <sup>pos</sup> Basal	10.6 ± 3.0	53.6 ± 47	80.6 ± 39
48 h Tx	12 ± 4	92 ± 20.2	113 ± 46.8
3 meses Tx	11.6 ± 2.3	63.5 ± 19	78 ±
<b>CD86</b>			
Control sano	157 ± 42	278. ± 120	513 ± 130
RVT <sup>pos</sup> Basal	126.6 ± 51	327.3 ± 300	497 ± 61
48 h Tx	259.3 ± 78.51	469.6 ± 227	645 ± 487
3 meses Tx	147.3 ± 66	197.5 ± 130.8	199 ± 162
<b>HLA-DR</b>			
Control sano	134 ± 60	319 ± 100	508 ± 210
RVT <sup>pos</sup> Basal	97.3 ± 63.4	379.6 ± 245.6	827.3 ± 818
48 h Tx	130.6 ± 84.7	559 ± 313	792 ± 550
3 meses Tx	103.3 ± 54	330.5 ± 338	342 ± 287

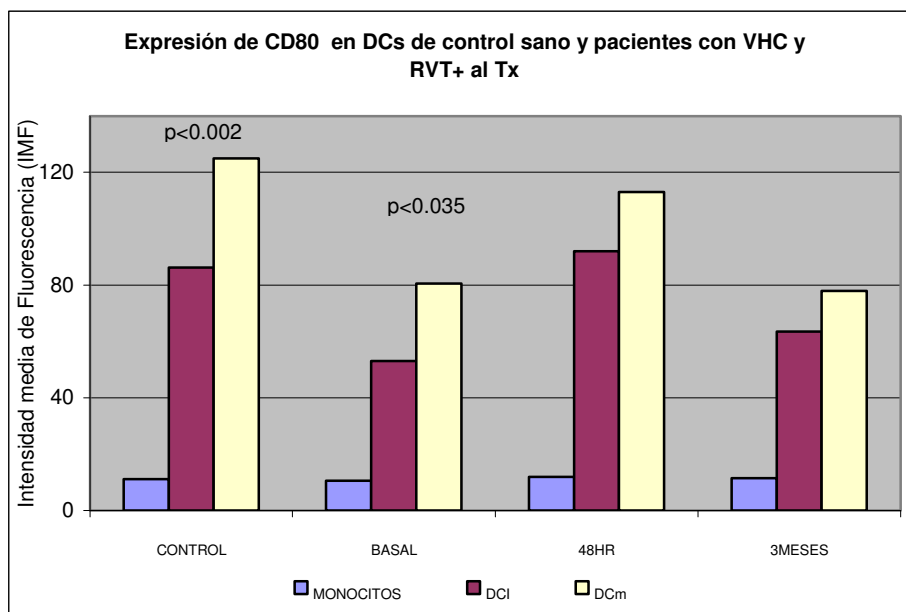
Tabla 2 Expresión de marcadores de diferenciación y maduración celular en monocitos, DCi células dendríticas inmaduras, DCm células dendríticas maduras de control sano y pacientes con respuesta viral temprana positiva (RVT<sup>pos</sup>) al tratamiento con peginterferon  $\alpha$ -2b y ribavirina. IMF intensidad media de fluorescencia.



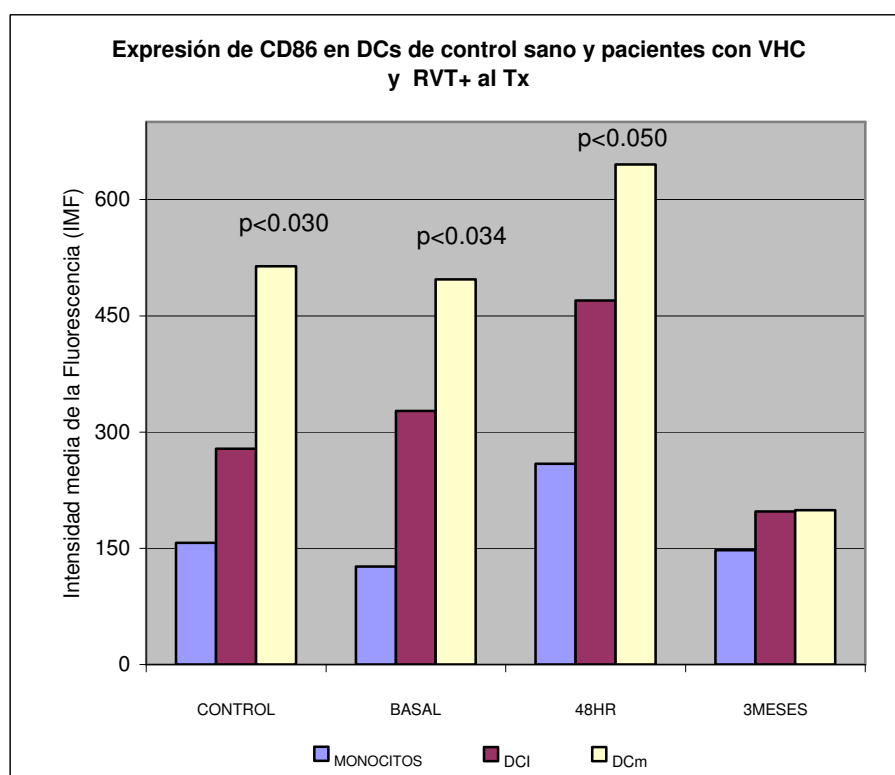
Gráfica 1. CD1a en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m: maduras, derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>pos</sup> : respuesta viral temprana positiva



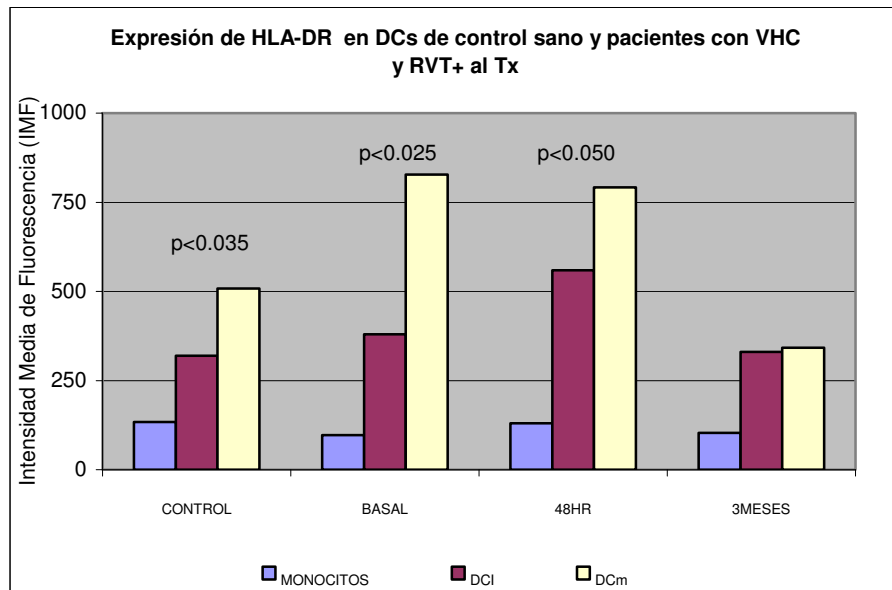
Gráfica 2. CD83 en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m: maduras, derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>pos</sup> : respuesta viral temprana positiva



Gráfica 3. CD80 en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m:maduras derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>POS</sup> : respuesta viral temprana positiva



Gráfica 4. CD86 en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m:maduras, derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>POS</sup> : respuesta viral temprana positiva



Grafica 5 HLA-DR en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m:maduras, derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>POS</sup>: respuesta viral temprana positiva

**Inmunotinción de los marcadores de diferenciación y maduración de las Dcs de los pacientes con RVT<sup>neg</sup>**

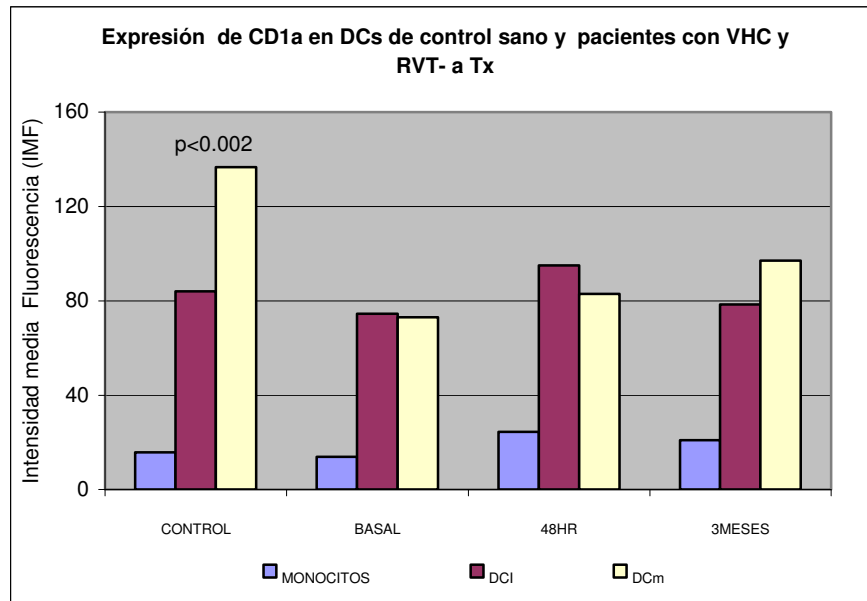
En la tabla 3 se muestra el promedio de la IMF debido a la expresión de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR en las DCs obtenidas de las muestras basal, 48h y 3m de tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina de los pacientes con infección crónica por VHC que tuvieron RVT<sup>neg</sup> al tratamiento.

Las DCs obtenidas en cultivo mostraron diferenciación celular a DCi en términos de la expresión de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR bajo el estímulo de IL-4 y GM-CSF y no responden al estímulo con TNF- $\alpha$  ya que las células no incrementan la IMF para cada marcador a 9d de cultivo. La expresión de cada marcador en las DCs de estos pacientes es menor comparada con los resultados del grupo control y de los pacientes con RVT<sup>pos</sup> graficas 6-10.

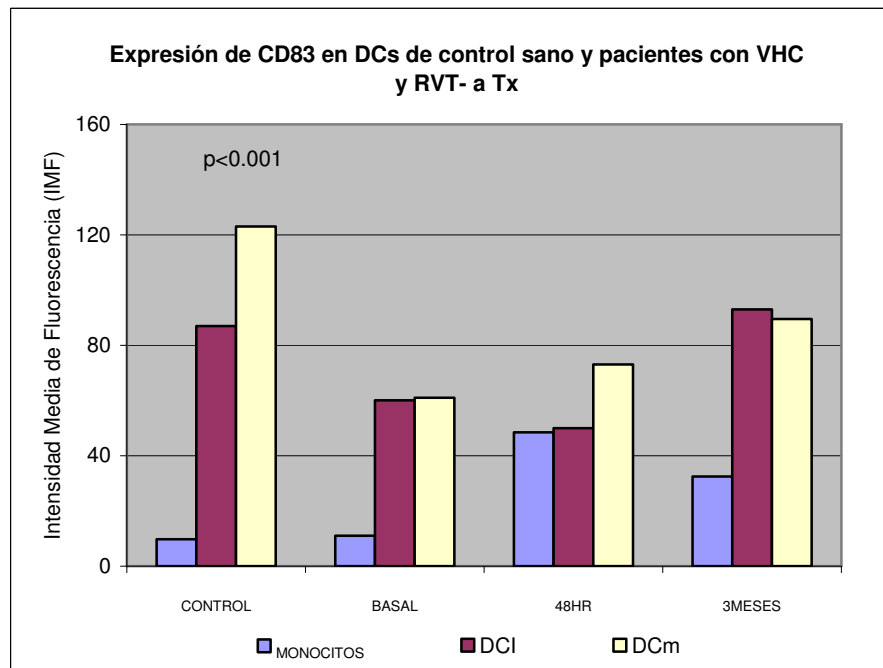
A 48h y 3m de tratamiento las DCs obtenidas de los pacientes con RVT<sup>neg</sup> se diferencian solamente a DCi pero no responden al estímulo de maduración celular con TNF- $\alpha$  graficas 6 a 10.

Expresión de Molécula de Diferenciación en RVT <sup>neg</sup>	Monocitos	DC inmaduras	DC maduras
	IMF	IMF	IMF
<b>CD1a</b>			
Basal	14 $\pm$ 5.6	74.5 $\pm$ 23.3	73 $\pm$ 12.7
48 h Tx	24.5 $\pm$ 3.5	95 $\pm$ 37.2	83 $\pm$ 50.68
3 meses Tx	21 $\pm$ 7	78.5 $\pm$ 17.6	97 $\pm$ 25.4
<b>CD83</b>			
Basal	11 $\pm$ 5.6	60 $\pm$ 11.3	61 $\pm$ 7
48 hrs Tx	48.5 $\pm$ 48.7	50 $\pm$ 15	73 $\pm$ 20
3 meses Tx	32.5 $\pm$ 37.4	93 $\pm$ 66	89.5 $\pm$ 33
<b>CD80</b>			
Basal	12 $\pm$ 4.2	61 $\pm$ 18	67 $\pm$ 9.8
48 h Tx	17.5 $\pm$ 0.7	78 $\pm$ 20.2	79 $\pm$ 46.8
3 meses Tx	13.5 $\pm$ 7.7	70.5 $\pm$ 19	80 $\pm$ 2.8
<b>CD86</b>			
Basal	154 $\pm$ 77.7	139 $\pm$ 63	79.5 $\pm$ 21.9
48 h Tx	337 $\pm$ 16	240 $\pm$	113. $\pm$
3 meses Tx	129.5 $\pm$ 43	306.5 $\pm$ 101	165.5 $\pm$ 86.9
<b>HLA-DR</b>			
Basal	141 $\pm$ 2	218.5 $\pm$ 184	183.58 $\pm$ 168
48 h Tx	186.5 $\pm$ 60	290 $\pm$ 120	254 $\pm$ 85
3 meses Tx	70 $\pm$ 65	520 $\pm$ 92	296.5 $\pm$ 160

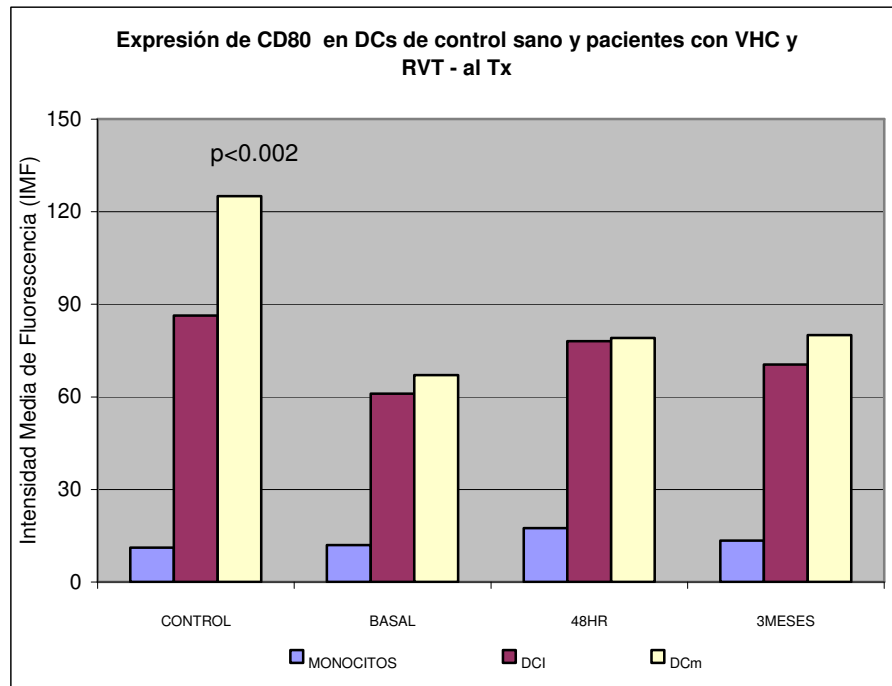
Tabla 3 Promedio de la IMF debida a la expresión de los marcadores de diferenciación y maduración celular en DCs obtenidas de pacientes con RVT<sup>neg</sup> con peg-interferon  $\alpha$ -2b y ribavirina



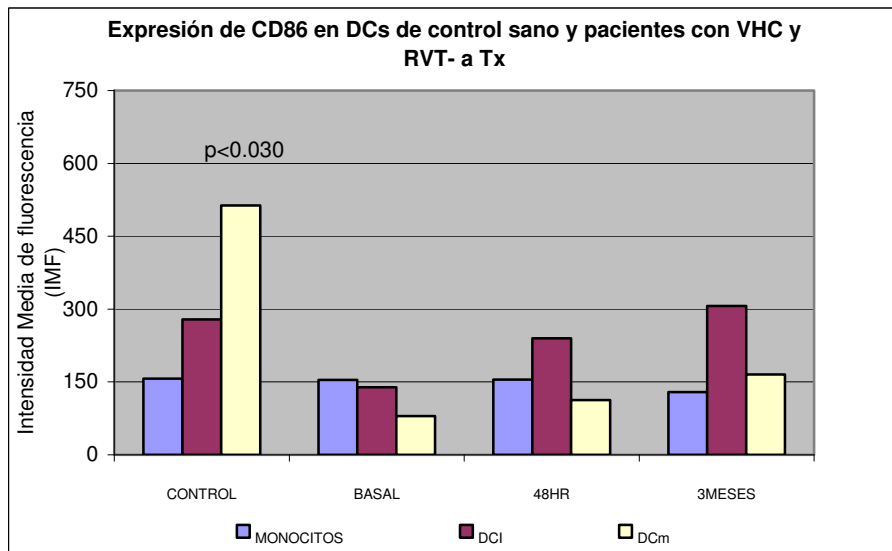
Gráfica 6. CD1a en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m:maduras, derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>neg</sup> : respuesta viral temprana negativa



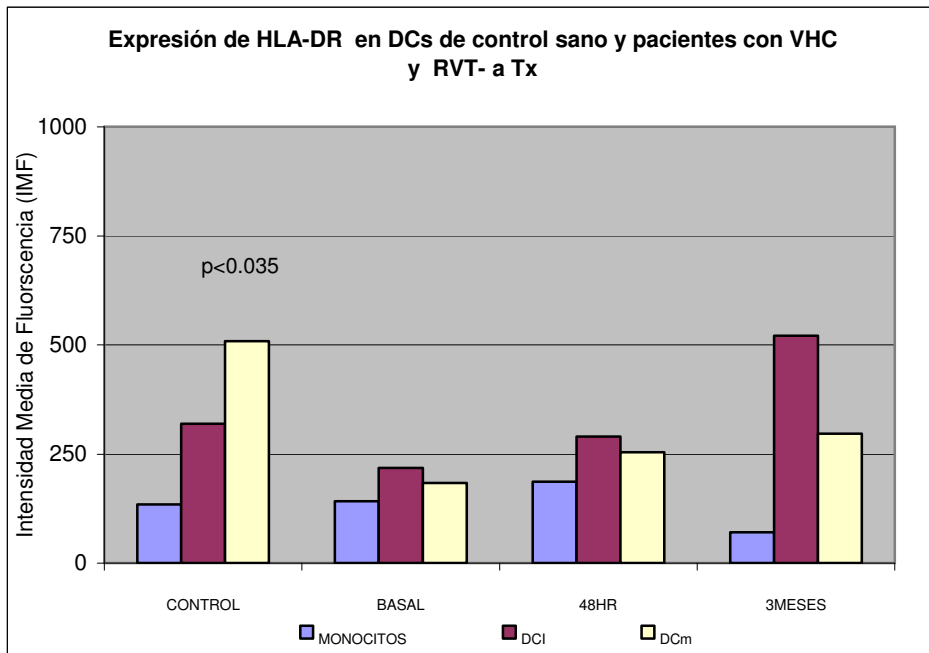
Gráfica 7. CD83 en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m:maduras derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>neg</sup> : respuesta viral temprana negativa



Gráfica 8. CD80 en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m: maduras derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>neg</sup> : respuesta viral temprana negativa



Gráfica 9. CD86 en Monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m: maduras derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>neg</sup> : respuesta viral temprana negativa



Gráfica 10. HLA-DR en monocitos y DCs células dendríticas i: inmaduras m:maduras derivadas de control sano y de pacientes con VHC + en muestras basal, 48h y 3 meses de Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. RVT<sup>neg</sup> : respuesta viral temprana negativa

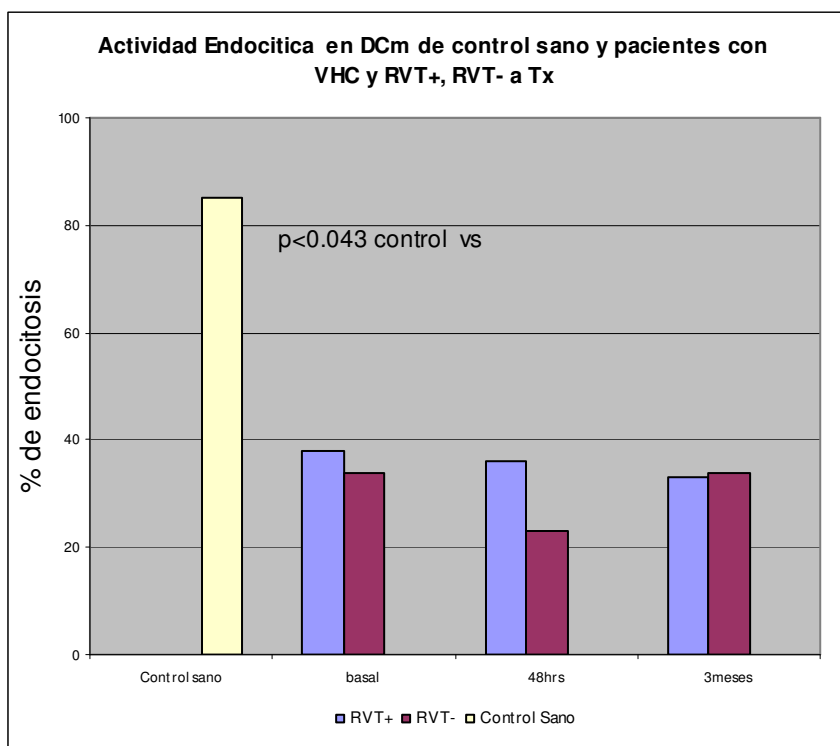


## Actividad endocítica de las DCi

En la tabla 3 se muestra el promedio de la actividad endocítica determinada en las DC inmaduras del grupo control, de pacientes con RVT<sup>pos</sup> y de pacientes con RVT<sup>neg</sup> al tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. El porcentaje de DCi con actividad endocítica del grupo control fue del 85.4 %  $\pm$  2.4, mientras que en pacientes se mantuvo en un rango de 27 al 48% , independientemente de la RVT al tratamiento, con una significancia estadística de  $p < 0.043$ . El tratamiento antiviral no incrementa la actividad endocítica en las DCi obtenidas a 48h y 3m.

<b>% de células dendríticas inmaduras (DCi) con actividad endocítica obtenidas control sano y pacientes con VHC en Tx con peg-interferón <math>\alpha</math>-2b y ribavirina.</b>							
Grupo control sano	Pacientes con VHC y RVT <sup>pos</sup> a Tx			Pacientes con VHC y RVT <sup>neg</sup> a Tx			
	Basal	48 h Tx	3 meses Tx		Basal	48 h	3 meses Tx
90				P-2	33	27	32
85	P1 48	39	10				
83	P3 38	43	45	P-4	35	20	36
85	P5 30	26	46				
84							
Promedio	85 $\pm$ 2.4	38.6 $\pm$ 9.01	36 $\pm$ 8.8		34 $\pm$ 1.4	23.5 $\pm$ 4.9	34 $\pm$ 2.8

Tabla 3 % de DCi derivadas de control sano, pacientes con VHC con con respuesta viral temprana (RVT<sup>pos</sup> y RVT<sup>neg</sup>) al Tratamiento (Tx) muestras  $p < 0.043$  para % endocitosis DCi control versus pacientes y  $p > 0.138$  de endocitosis DCi a 48h versus 3 meses de tratamiento.



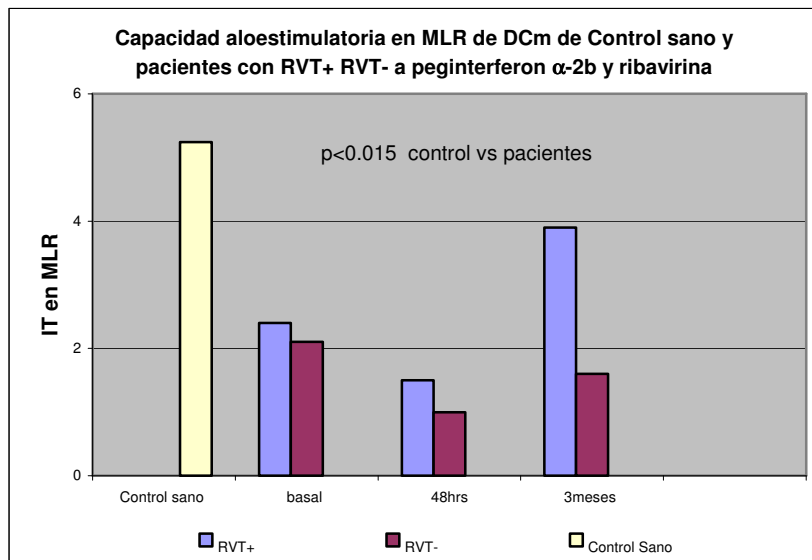
Grafica 11. % de células dendríticas inmaduras (DCi) con actividad endocítica derivadas de muestras basal, 48h y 3 meses de tratamiento Tx con peginterferón  $\alpha$ -2b y rivabirina

La tabla 4 resume la capacidad aloestimulatoria expresada como índice de transformación celular (IT) de las DCm obtenidas del grupo control, de pacientes con RVT<sup>pos</sup> y pacientes con RVT<sup>neg</sup> al tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. Las DCm del grupo control tienen capacidad de

aloestimulación sobre CTCD4+ es decir inducen proliferación celular por estimulación alogénica con un IT= 5.24 + 1.0, mientras que en el grupo de pacientes independientemente de la RVT, esta capacidad se encuentra significativamente mas baja ( $p < 0.015$ ) y solamente las DCm de grupo de pacientes con RVT<sup>neg</sup> a 3m del tratamiento tiende a incrementar esta actividad a  $3.9 \pm 1.3$

Capacidad aloestimuladora (IT) en cultivo de mezcla de reacción (MLR) de células dendríticas maduras DCm obtenidas de pacientes con VHC + en Tx peg-interferon $\alpha$ -2b y ribavirina								
Grupo control sano	Pacientes con VHC y RVT <sup>pos</sup> a Tx				Pacientes con VHC y RVT <sup>neg</sup> a Tx			
	Basal	48 hrs Tx	3 meses Tx		Basal	48 hrs	3 meses Tx	
5.3	1.9	1.7	3.1	P-2	2.4	0.85	1.3	
3.5	1.4	0.45	3.3	P-4	1.9	1.2	2.0	
5.4	3.9	2.5	5.5					
6.7								
Promedio	5.24 $\pm$ 1.0	2.4 $\pm$ 1.32	1.5 $\pm$ 1.0	3.9 $\pm$ 1.3	2.1 $\pm$ 0.35	1.0 $\pm$ 0.24	1.6 $\pm$ 0.49	

Tabla 4. Índice de Transformación celular (IT) de DCm derivadas de control sano, pacientes con VHC con respuesta viral temprana (RVT<sup>pos</sup> o RVT<sup>neg</sup>) al Tratamiento (Tx)  $p < 0.015$  IT de control versus pacientes y  $p > 0.138$  IT de basal vs 48h versus y basal vs 3 meses de tratamiento (t-Friedman)



Grafica 12. Índice de transformación celular (IT) como capacidad aloestimuladora en cultivos de mezcla de reacción de leucocitos (MLR) de células dendríticas maduras (DCm) y células T CD4+ de control, basal 48h y 3 meses de Tx con peginterferon  $\alpha$ -2b y ribavirina . Respuesta viral temprana (RVT)

## DISCUSIÓN

La infección aguda por el VHC tiene una elevada tasa de progresión a la infección crónica (Gordillo RM, 2004) y la calidad de la respuesta inmune del huésped y los factores asociados al virus para evadir los mecanismos de defensa son factores que se han relacionados con el daño hepático y la progresión de la enfermedad (Recherhmann B, 2005).

Se ha descrito que durante la infección crónica por el VHC la actividad efectora de algunas de las células del sistema inmune se encuentra disminuida (Barnes E, 2004). En nuestro estudio se evaluó la actividad biológica: endocitosis y capacidad aloestimuladora de las DCs obtenidas de pacientes con infección crónica por VHC en tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina y su relación con su estado de diferenciación y maduración celular. Las DCs como APC desarrollan un papel muy importante en la inducción de la respuesta inmune específica. La actividad biológica de estas células está determinada por la adecuada activación de sus precursores, la completa diferenciación y maduración celular bajo los estímulos antigénicos factores que determinan la expresión de las glicoproteínas de membrana que participan como receptores y ligandos específicos de la célula.

En base a procedimientos previos (Kanto T 1999, Ardavin C, 2001) el modelo empleado en nuestro estudio nos permitió generar DCs "in vitro" empleando como células precursoras monocitos CD14+ obtenidos de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con infección crónica por VHC tratados con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina. Se obtuvieron DCs de muestras basal, las 48h y 3m del tratamiento antiviral.

Los resultados obtenidos en sujetos sanos muestran que las condiciones experimentales empleadas permiten generar células dendríticas a partir de monocitos CD14+ con características morfológicas, fenotípicas y funcionales específicas de cada estadio (Abe M, 2001). Se determinó el fenotipo de DCi y DCm a 7 y 9d de cultivo en base a la expresión de las glicoproteínas de membrana CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR, que sin ser todas las glicoproteínas que se expresan en la membrana de DCs, si son de las más importantes en la inducción de la respuesta inmune específica.

El nivel de expresión de estos marcadores, principalmente las glicoproteínas CD80, CD86, HLA-DR y CD83 (Lechmann, 2001) permitió determinar el estado de maduración celular. Las glicoproteínas CD1a y HLA-DR indicaron además de la diferenciación el grado de maduración celular, ya que estos marcadores participan activamente en la presentación de antígenos de naturaleza lipídica y peptídica respectivamente (Moody DB, 2003). Los resultados obtenidos en las DCs control se emplearon como referencia de los resultados obtenidos en las DCs de pacientes con VHC en tratamiento antiviral.

De acuerdo a la expresión de cada una de las glicoproteínas de membrana en las DCs obtenidas de pacientes y RVT al tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina, los resultados se agruparon de la siguiente manera:

En 3 de los cinco pacientes estudiados, las DCs obtenidas en condiciones basales se diferenciaron y maduraron de manera similar a las DCs de sujetos sanos, presentaron RVT<sup>pos</sup> al término de 3 meses de tratamiento. Estas células expresan un fenotipo muy parecido a las DCs obtenidas del grupo control, inclusive la expresión de los marcadores de coestimulación y presentación CD86 y HLA-DR es mayor.

Las características del fenotipo de las DCs obtenidas a 7 y 9 d de cultivo es compatible con los resultados de las DC control así como las características morfológicas. Sin embargo la actividad biológica de las células de los pacientes con RVT<sup>pos</sup> es significativamente mas baja que las DCs control. Este hecho indica que la célula precursora, monocito CD14+, de los pacientes es susceptible a los estímulos de activación y diferenciación celular pero el fenotipo desarrollado en condiciones experimentales no determina la actividad biológica de la célula dendrítica.

Las DCs obtenidas de estos pacientes a 48h de la primera dosis de peginterferón  $\alpha$  2b y ribavirina, tienen una mejor respuesta a los estímulos de diferenciación celular con IL-4, GM-CSF. Las DCi obtenidas a 7d de cultivo tienen mayor expresión de cada una de las glicoproteínas de membrana comparada con las DCs de la muestra basal e inclusive del control. Sin embargo, la respuesta al estímulo con TNF- $\alpha$  como factor de maduración es menor ya que el fenotipo desarrollado a 9d de cultivo, indica que la expresión de CD1a y CD83 se mantiene constante. Mientras que la expresión CD80, CD86 y HLA-DR si incrementa. Se puede decir que las DCs obtenidas tienen un fenotipo de maduración parcial compatible con la baja actividad endocítica y coestimuladora de estas células registrado en las DCi y DCm a los 7 y 9 días respectivamente. Las DCs obtenidas de esta muestra fueron más susceptibles a los estímulos de diferenciación y maduración pero tampoco fue suficiente para modificar la actividad endocítica de DCi, compatible con el estado de maduración desarrollado.

A 3m de tratamiento, en las DCs obtenidas de estos pacientes (RVT<sup>pos</sup>), el proceso de diferenciación y maduración celular pierde eficiencia, la expresión de cada molécula es menor que las muestras basal y 48h de tratamiento. La expresión de CD86 y HLA-DR no incrementa en respuesta a TNF- $\alpha$ , el fenotipo de maduración es parcial y corresponde a DCi. Sin embargo, capacidad aloestimuladora de estas células tiende a incrementar solamente en un paciente.

Dos pacientes tuvieron RVT<sup>neg</sup> a 3m de tratamiento y las DCs obtenidas de en condiciones basales desarrollaron un proceso de diferenciación y maduración parcial limitado a DCi no hubo respuesta al estímulo de maduración con TNF- $\alpha$ , la expresión de los marcadores CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR es menor que el registrado en el control y en pacientes con RVT<sup>pos</sup> y se mantiene prácticamente constante. Este patrón de respuesta se mantiene en las DCs obtenidas a 48h y 3m del tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina.

La actividad endocítica y capacidad aloestimuladora, de las DCs de estos pacientes también es significativamente más baja que la registrada en las DCs obtenidas del grupo control y no se modifica a 48h y 3m de tratamiento. La RVT<sup>neg</sup> puede asociarse con un fenotipo de diferenciación y/o maduración de DCs parcial con débil expresión de moléculas de presentación y coestimulación.

En nuestro estudio las DCs obtenidas en cultivo por diferenciación y maduración celular de monocitos CD14+ de pacientes con infección crónica por VHC, en ausencia de tratamiento antiviral expresaron dos fenotipos que tienen relación directa con el tipo de RVT a 3m de tratamiento, sin embargo es necesario estudiar un mayor número de pacientes.

La diferencia del fenotipo de las DCs que se desarrollan en cultivo y la baja actividad biológica para las que funcionalmente son aptas estas células, esta determinada posiblemente por la integridad del estado biológico intracelular del monocito CD14+, ya que como célula precursora, la capacidad de diferenciación a los estímulos experimentales con IL-4, GM-CSF y TNF- $\alpha$  y eventualmente a los fármacos empleados en la terapia antiviral, determina el desarrollo morfológico, fenotípico y funcional de las DCs obtenidas en cultivo y muy probablemente "in vivo". Se ha descrito que el VHC puede alojarse en sitios extrahepáticos como las CMNSP, por lo que los monocitos de estos pacientes pueden ser portadores de la partícula del VHC, del RNA-VHC o bien de las proteínas-VHC y la presencia de estas estructuras moleculares ejerce un efecto de inhibición parcial o completo en la diferenciación y maduración celular así como en la actividad biológica de la DCs obtenida (Wang, 2005)

Se ha descrito que las glicoproteínas de membrana E1 y E2 del VHC pueden unirse eficientemente a diferentes receptores de membrana entre los que se encuentran CD81, receptor "scavenger" clase B tipo I y receptores de asialoglicoproteínas presentes en diferentes tipos de células. Recientemente se ha descrito que el receptor tipo lectina DC-SIGN específico de DC puede ser reconocido por E1 y E2 y a través de esta unión infectar a las DCs y eventualmente modular las funciones de esta célula. Por otra parte bajo ciertas circunstancias las DCs son célula que además de inducir inmunidad específica de manera enérgica eventualmente, también puede desarrollar estados de tolerancia inmune o anergia así que el desarrollo a CDi y la ausencia de respuesta a un factor de maduración celular como es TNF- $\alpha$  puede ser debido a la inhibición de su receptor o estar induciendo "per se" un estado de tolerancia a los antígenos del VHC.

Cabe señalar que la diferenciación y maduración celular de los monocitos para obtener las DCs "in vitro" dejan de recibir el estímulo del peginterferón  $\alpha$ -2b y la ribavirina, por lo que eventualmente el efecto de este, en la actividad biológica de DCs obtenidas esta ausente en el cultivo.

La disminución en la carga viral a 48h y 3 meses de tratamiento tampoco parece tener relación directa con la actividad biológica de las DCs, ya que mientras hay una marcada inhibición de la replicación viral, la actividad biológica de las DCs en cultivo no se modifica, por lo que la depuración del

VHC por los fármacos empleados en la terapia antiviral, podría no estar directamente relacionados con la actividad biológica de las DCs o sus precursores en etapas tempranas del tratamiento y el mecanismo de acción del interferón y la ribavirina está limitado a virus libres en circulación y no tienen efecto en esta población a pesar de que disminuye la carga viral en los pacientes con RVT<sup>pos</sup>

También es importante señalar que nuestro estudio a diferencia de otros, estuvo dirigido a estudiar el efecto del tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina en la actividad biológica de las DCs obtenidas en cultivo, en etapas muy tempranas del tratamiento antiviral: basal, 48h y 3m por el valor pronóstico de la RVT, aún cuando el tratamiento completo es de 6 meses por lo que los efectos a largo plazo se pueden subestimar. Sin embargo la relación de mayor utilidad encontrada en nuestro estudio es la capacidad de diferenciación y maduración celular de las DCs antes de iniciar tratamiento antiviral, reflejados en la expresión de los marcadores CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR y su relación directa con la RVT<sup>pos</sup>  $\alpha$ λ τραταμμεντο χον πεγιντερφερ (ν  $\alpha$ -2b y ribavirina.

## CONCLUSIONES

1. La expresión de las glicoproteínas de membrana CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR en las DCs de sujetos sanos nos permitió identificar fenotípicamente sus dos estadios de maduración: DCi y DCm obtenidas por diferenciación y maduración celular "in vitro" empleando monocitos CD14+ como células precursoras
2. La actividad biológica (endocitosis y capacidad aloestimuladora) de las DCs obtenidas de pacientes con infección crónica por VHC se encuentra significativamente mas baja que en las DCs obtenidas de sujetos sanos
3. Las DCs derivadas de pacientes con infección crónica por VHC obtenidas en condiciones basales con RVT<sup>pos</sup> al tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina tuvieron un proceso de diferenciación y maduración celular completo, similar a las DCs de sujetos sanos pero con menor nivel de expresión de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR.
4. Las DCs derivadas de pacientes con infección crónica por VHC obtenidas en condiciones basales con RVT<sup>neg</sup> al tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina tuvieron un proceso de diferenciación y maduración celular parcial limitado fenotípicamente a célula dendrítica inmadura y con baja expresión de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR.
5. El tratamiento con peginterferon  $\alpha$ -2b no modifica la actividad biológica de las DCs obtenidas "in vitro" a 48h y 3m, independientemente de la RVT.
6. El tratamiento con peginterferón  $\alpha$ -2b y ribavirina tiene su mayor impacto en las DCi obtenidas "in vitro". a 48h de la primera dosis ya que induce la diferenciación celular a DCi con una elevada expresión de CD1a, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR

## **PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO**

1. Analizar la actividad biológica de las DCs en un mayor número de pacientes con infección crónica por VHC en tratamiento antiviral.
2. Determinar la presencia de VHC en monocitos de sangre periférica así como en las DCs en sus dos estadios de maduración celular.
3. Determinar la relación con la expresión de algunos mediadores relacionados con la actividad de las DCs (citocinas).



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abe Masanori, Akbar F, Horiike N, Onji M, (2001). Induction of cytokine production and proliferation of memory lymphocytes by murine liver dendritic cell progenitors:role of these progenitors as immunogenic resident antigen-presenting cells in the liver. *J Hepatol.* 34:61-67
- 2.- Ardavin C, Martínez del Hoyo G, Martín P, Anjuére F, Arias CF, Marín AR, Ruiz S, Parillas V and Hernandez H (2001). Origin and differentiation of dendritic Cells. *Trends Immunol* 22(12):691-700
- 3.- Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S (2001). Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97(10):3171-3176
- 4.- Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspé G, (2001). Impaired Allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection *Gastroenterology* 120(2):512-524
- 5.- Barnes E, SalióM, Cerundulo V, MedlinJ, Murphy S, Dusheiko G, Klenerman P (2004). Impact of alpha interferon and ribavirin on the function of maturing dendritic Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (9): 3382-3389
- 6.- Bernd Arnold (2003). Parenchymal cells in immune and tolerance induction. *Immunol Letters* 89:225-228
- 7.- Boyer N and Marcellin P (2000). Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 32 (Suppl 1):98-112
- 8.- Bullock Grant C, Bruns David E, Haverstick Doris M (2002). Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescent resonance energy transfer probes. *Clinical Chemistry* 48 (12):2147-2154
- 9.- Buti M, (2004). Implicaciones actuales y futuras de la cinética de aclaración viral en el tratamiento de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 27 (Supl1):24-29
- 10.- Carreto Vélez MA, Carrada Bravo T Martínez Magdalena A 2003. Seoprevalencia de VHB, VHC y VIH en donadores de sangre en Irapuato, México. *Salud Pública de México* 45 (supl 5):S690-S693
- 11.- Colombo Massimo 2003. Hepatitis C infection and hepatocellular carcinoma. *Current Hepatitis Reports* 2:166-172
- 12.- De Francesco R (1999). Molecular virology of hepatitis C virus. *J Hepatol* 31 (Suppl 1): 47-53
- 13.- Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE, (2003). Function of CD80 and CD86

on monocyte and stem cell derived dendritic cells. *Exp Molecular Pathol* 75:217-227

- 14.- Drazan KE, (2000). Molecular biology of hepatitis C infection *Liver Transplantation* 6 (4): 396-406
- 15.- Ebner S, Neyer S, Hofer S, Nussbaumer W, Romani N, Heufler C (2001). Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood pasaged through leukocyte removal filters: an alternative to standar buffy coats. *J Immunol Methods* 252:93-104
- 16.- Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Goncales Jr FL, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Chaneac M, Reddy KR (2005). Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C Patientstreated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* in press.
- 17.- Forns X and Bataller R (2003). Can we Identify Liver Fibrosis in HCV infected patients without a liver biopsy? *Current Hepatis Reports* 2:145-151
- 18.- Gatti E, and Pierre P, (2003). Understanding the cell biology of antigen presentation the dendritic cell contribution. *Curr Opin cell biol* 15:468-473
- 19.- Gershwin ME, Vierling JM, Manns Mp. *Liver Immunol* 2002. Hanle Belfus, Inc. Philadelphia Cap 8. pag-99-114
- 20.- Goffard A, Dubuisson J (2003). Glycosylation of Hepatitis C virus envelope protein. *Biochimie* in press
- 21.- Gordillo RM, Gutiérrez J, Casal M, (2004). El virus de la hepatitis C como patógeno emergente I: diagnóstico mediante métodos de laboratorio. *Enf Emerg* 6 (1): 38-43
- 22.- Gorodezky C. 2003. Manual de técnicas de Genética Molecular e Histocompatibilidad. Departamento de Inmunogenética S.S.A.
- 23.- Hiasa Y, Horiike N, Fazle-Akbar SM, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y and Onji M (1998). Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells Expressing hepatitis C virus genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249(1):90-95
- 24.- Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A and Hori M (1999). Impaired allostimulatory capacity of Peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus infected individuals. *J Immunol* 162:5584-5591
- 25.- Kapsenberg ML (2003). Dendritic-cell control of pathogen driven T cell polarization. *Nature Rev Immunol* 3:984-993

- 26.- Kershenovich Stalnikowitz David (2005). Hígado, estructura y unidades funcionales capítulo 38. Fisiología médica Editorial El Manual Moderno 427-434
- 27.- Keeley Scott and Lake Jhon R (2003). Hepatitis C in the setting of kidney, heart, lung and bone marrow transplants. *Current Hepatitis Reports* 2:159-165
- 28.- Knolle Percy A y Limmer Andreas (2001). Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ resident liver endothelial cells. *Immunol Trends* 22 (8) : 432-437
- 29.- Kunitani H, Shimizu Y, Murata H, Higuchi K, and Watanabe A (2002). Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol* 36: 734-741
- 30.- Lin Otto S and Keeffe EB (2001). Current Treatment Strategies for Chronic Hepatitis B and C. *Annu Rev Med* 52:29-49
- 31.- Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z, (2002). Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection 2002. *Hepatology* 35 (5):1002-1009
- 32.- Lechmann Matthias Berchtold S, hauber J and Steinkasserer (2002). CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation *Immunology Trends* 23(6):273- 275
- 33.- Lechmann M, Krooshoop D, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G and Steinkasserer A, (2001). The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cell *J Exp Med* 194(12):1813-1821
- 34.- Limmer Andreas y Knolle Percy A (2001). Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ resident antigen presenting cell. *Arch.Immunol et Therapie Exp.* 49(supl 1) :S7-S11
- 35.- Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arebzana-Siesdedos F, Cosset FI, Altmeyer R, (2004). C-type Lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279 (3):32035-45
- 36.- Lyra AC, Fan X, and Di Biceglie AM (2004). Molecular biology and implication of hepatitis C virus *Braz. J Med Biol Res* 37(5)691-695
- 37.- McMahon Group (2002). Special report, management of hepatitis C: análisis of the 2002 NIH guidelines. *Gastroenterology and Endoscopy news* 53 (11)
- 38.- Méndez Sánchez N, Ponciano Rodríguez G, Chávez Tapia NC, Motola

- Kuba D, Almeda Valdés P Sánchez Lara K, Ramos MH, Uribe M. (2005). Prevalence of hepatitis C infection in a population of asymptomatic people in checkup unit in Mexico city. *Dig Dis Sci* 50(4):733-737
- 39.- Morrison RS, Cruse JM, Wang H, Lewis RE, (2003). Dendritic cells differentiation and proliferation: enhancement by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Exp Mol Pathol* 75:228-237
- 40.- Moody DB and Porcelli SA, (2003). Intracellular pathways of CD1 antigen presentation *Reviews Nature Publishing Group* 4:14-21
- 41.- Nakamura I and Imawari M, (2000). Cellular immune response in HCV infection. *J Gastroenterol* 35:881-889
- 42.- Pawlotsky Jean-Michel (2002). Molecular diagnosis of viral hepatitis *Gastroenterology* 122 (6):1554-1568
- 43.- Pachiadiakis I, Pollara G, Chain BM, Naoumov NV, (2005). Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infect Dis* 5(5):296-304
- 44.- Palucka K and Banchereau J (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 14:420-431
- 45- Pillarisetty VG, Miller G, Shah AB, DeMatteo RP, (2003). GM-CSF expands dendritic cells and their progenitors in mouse liver. *Hepatology* 37(3): 641-652
- 46- Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, ling MH, and Albrecht J, (2002). Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 122 (5):1303-1313
- 47.- Pradat, Maynard M, Butti M, Berthillon P, Picchio G, Tillmann HL, Wiegand J, Voirin N, Manns M, Esteban JI, Martinot M, Marcellin P, Trepo C. (2004) The predictive value of core antigen testing for the management of hepatitis C patients receiving pegylated interferon/ribavirin treatment. *J Med Virol* 73 (3):392-396
- 48- Rehmann B and Nascimbeni M, (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection (2005). *Nature Publishing Group* 5:215-229
- 49.-Thery C and Amigorena S, (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13:45-51
- 50.-Turley Shannon J, (2002) Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity *Curr Opin Immunol* 14:765-770

- 51.-Triyani M, Vergalla J, Davis AR, Hadlock KG, Fong S, Jake Liang T (2002). Structural Features of envelope proteins on hepatitis C virus like particles as Determined by anti-envelope monoclonal antibodies and CD81 binding. *Virology* 29:124-132
- 52.-Tsubouchi E, Akabar MF, Murakami H, Horiike N, and Onji M (2004). Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus HCV RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Clin Exp Immunol* 137:417-423
- 53- Tourkova IL, Yurkovevsky ZR, Shurin MR, Shurin GV (2001). Mechanisms of dendritic cells-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. *Immunol Letters* 78:75-82
- 54.- Uribe M, Méndez Sánchez (2002). Hepatitis C en México. *Rev Gastroenterol Méx.* 67(supl 2):S7-S8.
- 55.-Uridiales -Viedman M, Varela-Duran J, Cantero-Hinojosa J, Abad-Ortega JM, y De Haro Muñoz T, (1997). Beta-2-microglobulina, células Dendríticas S-100 positivas, eosinófilos y mastocitos en carcinomas escamosos y basocelulares de la piel. *Patología* 30(1):11-17
- 56.- Wang Quan-Chu, Feng Zhi-Hu, Zhou Yong-Xing, Nie Qing-He, (2005). Induction of hepatitis C virus- specific cytotoxic T and B cell responses by dendritic cells expressing modified antigen targeting receptor. *World J Gastroenterol* 11(4):557-560
- 57.- Wertimer Anne M. and Rosen R (2003). Immunity and persistence in hepatitis C virus infection. *Current Hepatitis Reports* 2:152-158
- 58.- Young S Hahn, (2003). Subversion of immune responses by hepatitis C virus: immunomodulatory strategies beyond evasion? *Curr Opin Immunol* 15:443-449