



Universidad de La Habana

Facultad de Biología

**Respuesta inmune específica contra el virus de la hepatitis C en
individuos crónicamente infectados y su modificación mediante
intervenciones terapéuticas que incluyen la preparación vacunal
CIGB-230**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Biológicas

Autora: Ms. C. Yalena Amador Cañizares

Tutor: Dr. C. Santiago Dueñas Carrera



Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana

2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y especialmente a mis padres, por su confianza en mí y su apoyo incondicional.

A mi tutor el Dr. Santiago Dueñas por no vacilar en aceptar esta tarea a pesar de que cuenta con muy poco tiempo libre para sí mismo y por todo lo que me enseñó siendo mi más despiadado oponente.

A mis oponentes de predefensas Iris Valdés, Alexis Musacchio, Lisset Hermida y Ana María Hernández, por contribuir constructivamente a la mejoría del documento y su presentación final.

A mis compañeras Gillian, Ingrid, Liz, Ivis y Aina y mis estudiantes Julián y Mariacarla que compartieron conmigo horas de trabajo experimental.

A Carmen Valenzuela y Ángela Tuero por sus contribuciones e invaluable enseñanzas que contribuyeron a mi mejor comprensión de la estadística.

A mis compañeros Ángel y Eddy, quienes me brindaron siempre su apoyo y compartieron también sus conocimientos.

A mi amiga la Dr Marusia Stefanova, quien constituye para mí un ejemplo a seguir como investigadora.

A Milaid, Ronar y Andrade, compañeros de contiendas, de quienes también he aprendido mucho.

A Aileen, Celia, Ismariley por los agradables ratos de esparcimiento y por manifestarme siempre su confianza.

A Félix, por incentivar en mí el deseo de superación con sus eternos por qué...

A Olaida y Denisse, quienes me acogieron en su familia y hacen llevaderos algunos de los gajes de mi oficio.

A mis profesoras de siempre, Dania Prieto y Tamara Tcherva, quienes guiaron mis primeros pasos en el mundo de las investigaciones y cuyas enseñanzas siempre he tenido y seguiré teniendo en cuenta.

A la profesora Georgina Espinosa por su eterna disposición a ayudarme amablemente en este difícil camino.

Y finalmente a los pacientes, que confiaron en nosotros y sin cuya participación, este trabajo no hubiera sido posible.

*Dedicado al Dr. Jorge Ovies por su ejemplo
y porque sé que estaría orgulloso de mí*

SÍNTESIS

La preparación vacunal CIGB-230 está constituida por la combinación de un plasmidio que expresa las proteínas estructurales del virus de la hepatitis C (VHC), con una variante recombinante de la proteína de la cápsida del propio virus. Esta preparación ha demostrado su inmunogenicidad en modelos animales, con protección en modelo de reto con virus sustituto en ratones. En el presente trabajo se estudió por primera vez la respuesta inmune específica contra antígenos del VHC en pacientes cubanos crónicamente infectados, inmunizados con la preparación vacunal CIGB-230, como monoterapia y en combinación con la terapia con IFN- α -2b y ribavirina, respectivamente. Desde antes del tratamiento la respuesta humoral fue detectable contra varios de los antígenos evaluados en la mayoría de los pacientes. La respuesta celular fue poco frecuente, no sostenida y generalmente monoespecífica. Se demostró por primera vez la capacidad de la preparación vacunal para incrementar la actividad de los anticuerpos neutralizantes contra el VHC, en el contexto de monoterapia y en triterapia con IFN- α -2b y ribavirina, así como la diversificación antigénica de la respuesta celular por la monoterapia. En el contexto de la terapia antiviral se observó además la inducción de respuestas de secreción de IFN- γ y proliferativas *de novo* contra antígenos virales. Además se evidenció que esta preparación vacunal en esquema de 6 dosis a partir de la semana 12 de la terapia antiviral indujo incrementos en la respuesta de anticuerpos neutralizantes y de secreción de IFN- γ que se asociaron a la respuesta virológica sostenida. Este trabajo hace aportes a la caracterización de la respuesta inmune específica contra el VHC en pacientes cubanos crónicamente infectados, así como al conocimiento de la capacidad de la preparación vacunal CIGB-230 para modificarla y contribuye a la proyección de estrategias racionales de intervención activa en los pacientes crónicamente infectados por el VHC.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
SÍNTESIS	ii
ÍNDICE.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
1.1 Virología molecular.....	7
1.2 Ciclo viral.....	10
1.3 Historia natural.....	13
1.4 Epidemiología.....	16
1.5 Respuesta inmune.....	18
1.5.1 Respuesta innata.....	18
1.5.2 Respuesta de anticuerpos.....	19
1.5.3 Respuesta celular.....	22
1.6 Tratamientos antivirales.....	27
1.7 Desarrollo de vacunas terapéuticas contra el VHC.....	31
1.8 Generalidades de la vacunación con ADN.....	35
1.9 Preparación vacunal CIGB-230.....	37
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.1 Proteínas recombinantes.....	39
2.2 Muestras de sangre.....	39
2.3 Obtención de muestras de suero.....	43
2.4 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida contra antígenos del VHC.....	44
2.5 Purificación de anticuerpos a partir de muestras de suero.....	46
2.6 Evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes.....	46
2.6.1 Ensayo de inhibición del número de unidades formadoras de focos (UFF) de pseudopartículas del VHC (psVHC).....	46
2.6.2 Ensayo de inhibición del número de UFF de partículas del VHC obtenidas de cultivo celular (VHCcc).....	47
2.7 Conteos de leucocitos y linfocitos.....	48
2.8 Aislamiento, conservación y preparación de células mononucleares de sangre periférica.....	48
2.9 Evaluación de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica contra antígenos del VHC.....	49
2.10 Evaluación de la respuesta de secreción de IFN- γ de células mononucleares de sangre periférica contra antígenos del VHC.....	50
2.10.1 Evaluación de muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.....	50
2.10.2 Evaluación de muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación de IFN- α -2b y ribavirina.....	52
2.11 Análisis estadístico.....	54
3 RESULTADOS.....	55
3.1 Respuesta inmune detectada en muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia y su asociación con las respuestas virológica e histológica.....	55

3.1.1	Evaluación de la presencia de anticuerpos específicos contra el VHC.....	55
3.1.2	Evaluación de la respuesta de secreción IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica específicas contra el VHC	58
3.1.3	Evaluación de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica CD4 ⁺ y CD8 ⁺ específicas contra el VHC	60
3.1.4	Asociaciones entre la respuesta inmune y las respuestas virológica e histológica en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.....	64
3.2	Respuesta inmune detectada en muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina y su asociación con las respuestas virológica e histológica.....	67
3.2.1	Evaluación de la presencia de anticuerpos específicos contra el VHC.....	67
3.2.2	Evaluación de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica específicas contra el VHC	72
3.2.3	Evaluación de la respuesta de secreción IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica específicas contra el VHC	75
3.2.4	Respuesta inmune específica contra el VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina, en dependencia de la respuesta virológica al tratamiento.....	79
3.2.5	Asociaciones entre la respuesta inmune y la histología hepática en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina	82
4	DISCUSIÓN	85
	CONCLUSIONES	99
	RECOMENDACIONES	100
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
	AUTOBIBLIOGRAFÍA	116
1.	Relacionada con la tesis	116
2.	No relacionada con la tesis.....	116
	ANEXOS	117

ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ALAT: alanina aminotransferasa
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- CFP: células formadoras de puntos
- CFSE: del inglés carboxyfluorescein succinimidyl ester
- CMV: citomegalovirus
- Con A: concanavalina A
- DE: desviación estándar
- DO: densidad óptica
- ELISA: del inglés enzyme linked immunosorbent assay
- ELISPOT: del inglés enzyme linked immunospot assay
- HLA: del inglés human leucocyte antigen
- IE: índice de estimulación
- IFN: interferón
- IFN-peg: interferón pegilado
- IL: interleuquina
- NK: del inglés natural killer
- PBS: del inglés phosphate buffered saline
- psVHC: pseudopartículas del VHC
- RHV1: región hipervariable 1
- RNT: región no traducible
- RQ: rango intercuartílico
- RVS: respuesta virológica sostenida
- RVTc: respuesta virológica temprana completa
- S6: grupo de tratamiento con seis dosis de CIGB-230 a partir de la semana 0 de la terapia antiviral
- S9: grupo de tratamiento con nueve dosis de CIGB-230 a partir de la semana 0 de la terapia antiviral
- SFB: suero fetal bovino
- SIER: sitio interno de entrada al ribosoma
- SR-B1: del inglés scavenger receptor class B type 1
- T0: tiempo de evaluación correspondiente a la línea base
- T6: grupo de tratamiento con seis dosis de CIGB-230 a partir de la semana 12 de la terapia antiviral
- T9: grupo de tratamiento con nueve dosis de CIGB-230 a partir de la semana 12 de la terapia antiviral
- T24: tiempo de evaluación correspondiente a la semana 24 de tratamiento
- T48: tiempo de evaluación correspondiente a la semana 48 de tratamiento
- T72: tiempo de evaluación correspondiente a la semana 72 de tratamiento
- TAED-C: terapia antiviral específicamente dirigida contra el VHC
- TGF- β : del inglés transforming growth factor beta
- Th: del inglés T helper
- TLR: del inglés toll like receptor
- Tr1: del inglés T regulator 1
- UFF: unidades formadoras de focos
- UI: unidades internacionales
- VHA: virus de la hepatitis A
- VHB: virus de la hepatitis B
- VHC: virus de la hepatitis C
- VHCcc: partículas del VHC obtenidas de cultivo celular
- VIH: virus de inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC) constituye un grave problema de salud mundial, ya que se estima que infecta aproximadamente a 170 millones de personas en todo el orbe (Naggie, 2012). En nuestro país, según reportes de la Organización Mundial de la Salud, en el año 1997 el 0,8% de la población poseía anticuerpos anti-VHC, mientras que en grupos especiales, como los hemodializados, la detección de anticuerpos podía llegar hasta un 60% (World Health Organization, 1997). Este virus causa infección crónica en la mayoría de los infectados, con frecuente progresión a cirrosis y cáncer de hígado, por lo cual es el principal motivo de trasplante hepático (Hoofnagle, 2002).

En los últimos años ha ocurrido un desarrollo vertiginoso de agentes antivirales específicos (Hezode y cols., 2009; Sarrazin y cols., 2007), que incluye la adición de compuestos ya licenciados, boceprevir y telaprevir, a la terapia combinada con interferón alfa pegilado (IFN-peg- α) y ribavirina, con una tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) de aproximadamente 70% en individuos vírgenes a tratamiento (Hezode y cols., 2009; Kwo y cols., 2010). Sin embargo, las terapias actuales, además de no ser efectivas en el 100% de los pacientes, conllevan numerosos efectos adversos que conducen a su contraindicación en muchos casos (Hezode y cols., 2009; Kwo y cols., 2010) y no proveen protección a largo plazo contra la reinfección. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos tratamientos e intervenciones profilácticas es una prioridad del presente.

Hasta el momento no existe vacuna preventiva o terapéutica alguna contra este virus. Diferentes candidatos vacunales terapéuticos se han evaluado en individuos crónicamente infectados. Estos han estado basados en proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, vectores virales, levaduras recombinantes y ADN desnudo con electroporación (Roohvand y Kossari,

2012). Han demostrado ser seguros e inmunogénicos, pero las modificaciones en la respuesta inmune pre-establecida contra el virus, aunque no han sido perjudiciales, tampoco han tenido un impacto significativo en el resultado del tratamiento desde el punto de vista virológico, ni histológico (Feinstone y cols., 2012). Esto probablemente se ha debido a que no han sido capaces de generar efectores humorales y celulares simultáneamente, en concordancia con sus respectivos conceptos de inmunización.

Además, es importante tener en cuenta que la inmunización terapéutica se enfrenta al reto de que el VHC es altamente variable, capaz de generar mutaciones que le permiten escapar tanto a la respuesta humoral como a la celular (Brown y cols., 2007; Seifert y cols., 2004). También, se han descrito una serie de alteraciones en la respuesta inmune específica que constituyen elementos distintivos de la infección crónica por el VHC. Estas incluyen el agotamiento de las células T CD8⁺ específicas, que resultan incapaces de ejercer sus mecanismos efectores (Spangenberg y cols., 2005), insuficiente colaboración por parte de las células T CD4⁺ (Urbani y cols., 2006) y la generación de células T reguladoras (Alatrakchi y Koziel, 2009; Smyk-Pearson y cols., 2008), entre otras. Con respecto a la respuesta de anticuerpos neutralizantes, se han podido identificar epitopos cuyos anticuerpos específicos tienen una potente capacidad neutralizante, pero son regiones pobremente inmunogénicas en la infección natural (Tarr y cols., 2007). Adicionalmente puede ocurrir el enmascaramiento de los epitopos neutralizantes por los glicanos presentes en la glicoproteínas de la envoltura (Helle y cols., 2010) o por asociación de los viriones con lípidos (Tao y cols., 2009), entre otros mecanismos de escape. También se ha comprobado que en los pacientes crónicos ocurre subversión de la respuesta antiviral innata (Foy y cols., 2003; Thimme y cols., 2006) y tienen lugar afectaciones a las células presentadoras de antígenos (Averill y cols., 2007). Todos estos daños se producen progresivamente en el curso típicamente inadvertido de la infección y son dirigidos por las

propias proteínas virales, que contribuyen al establecimiento de la cronicidad. El objetivo primordial de los candidatos vacunales terapéuticos es modificar la respuesta inmune pre-establecida contra el virus, mediante la generación de nuevas respuestas funcionales. No obstante, para alcanzar el control viral, no es descartable la utilidad del rescate de la funcionalidad celular o de la eliminación de respuestas cualitativamente inadecuadas, lo que está obstaculizado en presencia de los mecanismos de persistencia del virus.

A estos obstáculos se suma el hecho de que los correlatos de protección inmunológica y de clarificación viral no han podido ser completamente establecidos (Álvarez-Lajonchere y Dueñas-Carrera, 2012). No obstante, se considera que para lograr el control viral es importante la inducción temprana de respuestas de células T, CD4⁺ y CD8⁺, duraderas, multifuncionales y dirigidas contra numerosos epitopos (Cox y cols., 2005; Thimme y cols., 2002). Además, existen evidencias de la participación de los anticuerpos neutralizantes en la clarificación viral (Pestka y cols., 2007).

Una de las nuevas tecnologías que resultan prometedoras en la vacunación es la inmunización con ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta ha permitido la inducción de respuestas, tanto humorales como celulares, en diferentes modelos animales y en humanos (Lowrie, 2003) y ha sido evaluada en el campo de la vacunación contra el VHC (Sallberg y cols., 2009). Específicamente la preparación vacunal CIGB-230 está constituida por la mezcla de un plasmidio para la inmunización con ADN, que expresa las proteínas estructurales del VHC (Dueñas-Carrera y cols., 2002), con una variante recombinante de la proteína de la cápsida de este virus (Dueñas-Carrera y cols., 1999). Esta preparación vacunal apuesta por la inducción tanto de respuesta de anticuerpos neutralizantes, como de respuestas celulares. En dicha mezcla la proteína de la cápsida juega el doble papel de inmunógeno y sistema de protección del plasmidio. Su capacidad para la inducción de una respuesta inmune tanto humoral como

celular ha sido demostrada en modelos animales (Acosta-Rivero y cols., 2006; Álvarez-Lajonchere y cols., 2006). Particularmente la respuesta celular inducida ha sido capaz de proteger a ratones frente al reto con un virus vaccinia recombinante para la región estructural del VHC (Acosta-Rivero y cols., 2006; Álvarez-Lajonchere y cols., 2006). La funcionalidad de la respuesta inmune inducida por esta preparación parece estar relacionada con la reducida degradación del ADN por su interacción con la proteína de la cápsida y la mejor activación y presentación de antígenos por las células presentadoras, debido a la presencia de motivos CpG en el plasmidio y a la naturaleza particulada de la proteína.

Teniendo en cuenta estos resultados promisorios y los elementos antes expuestos, el presente trabajo se plantea la siguiente hipótesis: **Las intervenciones terapéuticas que incluyen la preparación vacunal CIGB-230, basada en la mezcla de un plasmidio que expresa las proteínas estructurales del VHC y una variante de la proteína de la cápsida del propio virus, modifican la respuesta inmune específica pre-establecida en individuos crónicamente infectados por el VHC, con inducción de respuestas celulares *de novo* y de anticuerpos neutralizantes, lo cual tiene impacto favorable en las respuestas virológica e histológica al tratamiento.**

Para validar o refutar la hipótesis planteada, se proponen los siguientes objetivos:

Objetivos:

1. Caracterizar la respuesta inmune humoral y celular, específicas contra antígenos del VHC, en pacientes no respondedores a la terapia combinada con IFN- α -2b y ribavirina, antes y 24 semanas después de iniciado el tratamiento con la preparación vacunal CIGB-230.

Tareas:

- a) Evaluación del perfil de clases de anticuerpos contra antígenos del VHC, así como de la capacidad neutralizante de los mismos.

- b) Evaluación de la respuesta de secreción de IFN- γ y proliferativa de células mononucleares de sangre periférica, contra antígenos del VHC.
2. Caracterizar la respuesta inmune humoral y celular, específicas contra antígenos del VHC, en pacientes bajo la terapia combinada con IFN- α -2b y ribavirina e inmunizados con la preparación vacunal CIGB-230, antes y después de 48 semanas de tratamiento.

Tareas:

- a) Evaluación del perfil de clases de anticuerpos contra antígenos del VHC, así como de la capacidad neutralizante de los mismos.
- b) Evaluación de los conteos de leucocitos y linfocitos, así como de la respuesta de secreción de IFN- γ y proliferativa de células mononucleares de sangre periférica, contra antígenos del VHC.
3. Realizar el análisis de las posibles asociaciones entre las diferentes variables de respuesta inmune evaluadas y las respuestas virológica e histológica en los diferentes grupos de pacientes crónicamente infectados por el VHC tratados con terapias que incluyan la preparación vacunal CIGB-230.

Este trabajo presenta resultados con **novedad científica**. En el mismo se demostró por primera vez la capacidad de una preparación vacunal contra el VHC (CIGB-230), basada en una mezcla de ADN y proteína, para modificar la respuesta inmune específica en pacientes crónicos. Se puso de manifiesto por primera vez la inducción de diversificación antigénica de la respuesta celular por la preparación vacunal CIGB-230 en el contexto de la monoterapia. Por primera vez se evidenció la generación de anticuerpos neutralizantes en pacientes crónicamente infectados por el VHC, tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia y en el contexto de la terapia antiviral. Además se demostró que la respuesta

inmune inducida por dicha preparación vacunal, en combinación con IFN- α -2b y ribavirina tiene impacto sobre el curso de la respuesta virológica.

En su conjunto, estos resultados tienen **importancia práctica**. La demostración de que las características de la respuesta inmune inducida por la preparación vacunal CIGB-230 dependen del número de dosis y del momento de su administración con respecto a la terapia con IFN- α -2b y ribavirina permitirá proyectar estrategias racionales de intervención activa en los pacientes crónicamente infectados por el VHC. El disponer de una vacuna terapéutica contra el VHC es sin duda una necesidad imperiosa tanto en el mundo como en nuestro país.

Los resultados que conforman este trabajo forman parte de dos artículos científicos publicados en revistas internacionales (Autobibliografía). Además han sido incluidos en dos premios de la Academia de Ciencias de Cuba y han sido objeto de nueve presentaciones en eventos internacionales. La investigación descrita en esta tesis se desarrolló en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba).

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Virología molecular

El VHC es un virus de ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena con polaridad positiva, perteneciente a la familia *Flaviviridae* y dentro de esta al género *Hepacivirus* (Simmonds y cols., 2005). Su genoma de 9,6 kb codifica para una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, la cual es procesada proteolíticamente en proteínas estructurales y no estructurales, por la acción combinada de proteasas celulares y virales (Bartenschlager y Lohmann, 2000). La secuencia traducible está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por regiones no traducibles (RNT) conservadas, que contienen elementos estructurales, que constituyen importantes señales que actúan en *cis*, en la iniciación de la replicación y la traducción del genoma viral (Friebe y cols., 2001) (Figura 1).

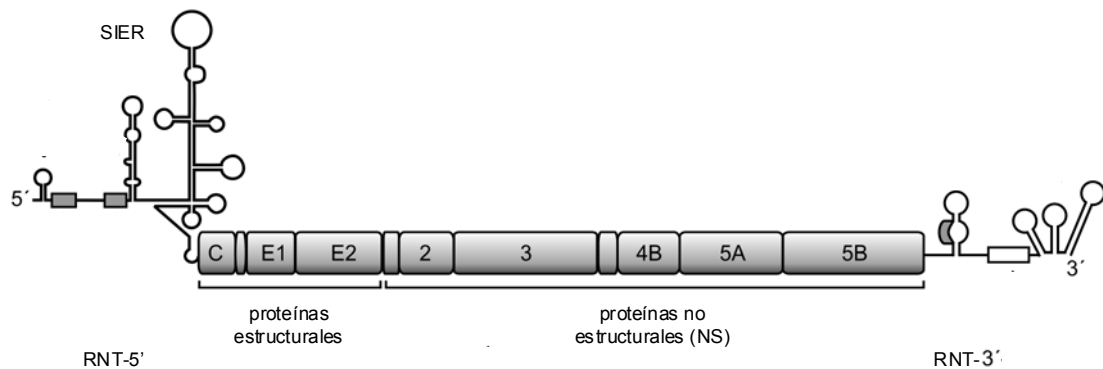


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VHC con el marco abierto de lectura que codifica para la poliproteína viral. Se representan las proteínas estructurales y las no estructurales en su posición relativa dentro de la poliproteína viral. RNT, región no traducible; SIER, sitio interno de entrada al ribosoma.

Tomado de Niepmann M. [Cell Cycle 8(10):1473-1477; 15 May 2009]; ©2009 Landes Bioscience.

El primer producto liberado a partir de la poliproteína viral es la proteína de la cápsida, que tiene un papel importante en el ensamblaje del virión (Ashfaq y cols., 2011). De hecho se ha

demostrado que variantes recombinantes de esta proteína tienen la capacidad de ensamblarse formando partículas (Acosta-Rivero y cols., 2004). También se ha evidenciado que la proteína de la cápsida es capaz de intervenir en numerosas vías de señalización intracelular (Hosui y cols., 2003; Ohkawa y cols., 2004), lo que incluye el bloqueo de la vía de señalización del IFN- α (Thimme y cols., 2006).

El corrimiento del marco de lectura en la región de la proteína de la cápsida da origen a una proteína llamada “proteína de marco de lectura alternativo” (Xu y cols., 2001), contra la cual se han detectado respuestas celulares (Bain y cols., 2004) y de anticuerpos (Morice y cols., 2009) en pacientes infectados. No obstante, se considera que su presencia es dispensable para la replicación viral (Brass y cols., 2006).

Las proteínas de la envoltura E1 y E2 son liberadas de la poliproteína viral por acción de peptidasas señal de la célula y contienen cinco y once sitios potenciales de glicosilación, respectivamente (Penin y cols., 2004). E1 y E2 son glicoproteínas transmembrana de tipo I (Penin y cols., 2004) y forman un heterodímero unido no covalentemente (Dubuisson y cols., 1994), el cual es considerado la unidad estructural de la envoltura viral (Brass y cols., 2006). Ambas glicoproteínas juegan numerosos papeles fundamentales en los diferentes pasos del ciclo replicativo viral, entre ellos la entrada a la célula blanco, la unión a receptores, la inducción de la fusión con la membrana celular y el ensamblaje de las partículas virales (Penin y cols., 2004). Los primeros 27 aminoácidos del ectodominio de E2 forman la región hipervariable 1 (RHV1), la cual difiere hasta en un 80% entre los diferentes genotipos del VHC y su variabilidad parece ser consecuencia de la selección de variantes de escape a la respuesta humoral (Penin y cols., 2004). A pesar de la variabilidad de su secuencia, las características físico-químicas de los residuos en cada posición y la conformación general de esta región están altamente conservadas entre los diferentes genotipos (Penin y cols., 2001).

También se ha descrito otra región hipervariable, la RHV2, dentro de la proteína E2 de las cepas del genotipo 1, constituida por siete aminoácidos (posiciones 91-97) que muestran un 100% de diversidad de secuencia (Kato, 2001). Ambas regiones hipervariables modulan la unión de E2 al receptor, posiblemente a través de interacciones intramoleculares (Roccasecca y cols., 2003).

La proteína p7 (63 aminoácidos) se encuentra ubicada entre las proteínas estructurales y las no estructurales en el precursor proteico. Parece funcionar como canal iónico y tiene una función esencial para la infección *in vivo*, según se ha observado en experimentos en chimpancés (Sakai y cols., 2003). Por su parte, la proteína NS2 no es esencial para la replicación, pero sí lo es para el ensamblaje (Coller y cols., 2012).

NS3 es una proteína de 630 aminoácidos, cuyo extremo amino tiene actividad serino proteasa, mientras que los otros dos tercios poseen actividad helicasa de ARN. La actividad proteasa es más eficiente en presencia de su cofactor no covalente NS4A. La actividad helicasa, la cual probablemente incluye separar el intermediario replicativo de doble cadena de ARN, eliminar estructuras secundarias en el ARN y separarlo de proteínas que se unen a ácidos nucleicos, es indispensable para la replicación viral (Brass y cols., 2006).

Además de funcionar como cofactor de NS3, NS4A interviene en la replicación del ARN viral (Lindenbach y cols., 2007). Algunos trabajos sugieren que puede modular la función de NS5B, reclutar otras proteínas no estructurales hacia compartimientos celulares de tipo balsas lipídicas, mediar la transformación celular e inducir la formación de estructuras membranosas intracelulares que han sido propuestas como sitios de ensamblaje del complejo de replicación (Saxena y cols., 2012). Se ha identificado a la proteasa NS3/4A como un factor importante para la interrupción de la activación del IRF-3 (del inglés IFN regulatory factor 3), ya que esta corta moléculas adaptadoras importantes para la inducción del IFN por la vía intracelular

clásica (IPS-1, del inglés interferon- β -promoter stimulator 1) y la vía endosomal desencadenada por el receptor de tipo Toll 3 (TLR3 del inglés Toll Like Receptor). NS3 además interactúa con TBK1 (del inglés TANK-binding kinase-1) e inhibe su asociación con el IRF-3 y su activación (Thimme y cols., 2006).

NS5A es una metaloproteína cuyo papel en el ciclo viral no ha sido totalmente esclarecido. No obstante, se ha observado que su fosforilación tiene impacto en la eficiencia de la replicación, por lo que puede jugar un papel regulador (Appel y cols., 2005). Se ha demostrado que NS5A se une directamente y reprime a la proteína quinasa R, a través de una interacción que involucra un fragmento de 40 aminoácidos, denominado región de sensibilidad al IFN (Thimme y cols., 2006).

NS5B tiene actividad polimerasa de ARN dependiente de ARN, su estructura cristalina reveló que el dominio polimerasa tiene una estructura clásica de “dedos, palma y pulgar” formada por el extremo amino. La región C-terminal forma un dominio transmembrana en hélice α que es responsable del direccionamiento post-traducciona l hacia el lado citosólico del retículo endoplasmático, donde se expone el dominio funcional (Schmidt-Mende y cols., 2001). Se han descrito interacciones de NS5B con componentes celulares que son importantes en la formación del complejo de replicación (Pawlotsky y cols., 2007).

1.2 Ciclo viral

Se sugiere que los glucosaminoglicanos de la superficie celular pueden servir como sitio de anclaje inicial para la unión del VHC (Koutsoudakis y cols., 2006). También se propone al receptor de lipoproteínas de baja densidad como factor potencial de unión del virus a las células, dada la asociación de lipoproteínas con las partículas virales (Dubuisson y cols., 2008). Dentro de los factores de entrada específicos, el primero en ser identificado y

caracterizado fue la tetraspanina CD81, demostrándose que interactúa con la glicoproteína viral E2 (Pileri y cols., 1998). Los modelos de replicación *in vitro* revelan que las interacciones del VHC con los glucosaminoglicanos ayudan en la infección eficiente de células Huh7 y que CD81 actúa en pasos posteriores (Koutsoudakis y cols., 2006).

Después de la identificación de CD81 como factor importante, se propuso al receptor SR-BI (del inglés Scavenger Receptor Class B Type I) como otro factor de entrada (Scarselli y cols., 2002). Es probable que el contacto con el SR-BI sea necesario antes de que la partícula pueda interactuar con CD81 (Dubuisson y cols., 2008). Se ha demostrado la interacción directa entre la proteína E2 y SR-BI, específicamente a través de la RHV1 (Scarselli y cols., 2002). No obstante, también se propone que las lipoproteínas asociadas pueden interactuar con este factor de entrada. Esta interacción no es bloqueada por anticuerpos anti-E2 o anti-RHV1, de manera tal que esta vía alternativa puede promover la adhesión del virus aún en presencia de anticuerpos neutralizantes (Maillard y cols., 2006). De hecho se ha demostrado que la proteína celular ApoE, asociada a la envoltura de las partículas virales, es capaz de mediar la adhesión del virus a las células por interacción con moléculas de heparán sulfato de la superficie celular, mientras que la proteína E2 actúa en pasos posteriores de adhesión y entrada (Jiang y cols., 2012).

Otro probable factor de entrada identificado es la proteína de uniones estrechas Claudina-1, así como algunos otros miembros de la familia de las claudinas. No se ha demostrado la existencia de interacciones directas entre las claudinas y las glicoproteínas de la envoltura del VHC, pero no se descartan interacciones que requieran cambios conformacionales desencadenados por una primera interacción con otro factor de entrada (Dubuisson y cols., 2008). Adicionalmente, se ha identificado que la proteína EWI-2wint, perteneciente a la

familia de proteínas semejantes a inmunoglobulinas, bloquea la interacción E2-CD81, lo cual pudiera ser determinante en el tropismo de este virus (Dubuisson y cols., 2008).

Se ha observado que la partícula del VHC entra a las células blanco por endocitosis y se propone que la fusión ocurre en endosomas tempranos, donde el pH ácido induce cambios conformacionales en las proteínas de la envoltura (Dubuisson y cols., 2008). Se ha propuesto que diferentes regiones, tanto de E1, como de E2, cooperan en el completamiento de este proceso (Lavillette y cols., 2007).

Como resultado de la fusión de las membranas viral y celular, la nucleocápsida sale al citoplasma y el ARN genómico de polaridad positiva es liberado y sirve, junto al ARN de nueva síntesis, como ARN mensajero (ARNm) para la síntesis de la poliproteína viral (Pawlotsky y cols., 2007). La traducción del genoma viral ocurre bajo el control del sitio interno de entrada al ribosoma (SIER) (Figura 1), el cual media la iniciación de la traducción de la poliproteína, reclutando proteínas celulares como los factores de iniciación eucarióticos eIF 2 y 3, así como a proteínas virales (Otto y Puglisi, 2004). Se sugiere que la región 3' no traducible también modula la traducción dependiente del SIER (Song y cols., 2006).

Al menos dos peptidasas celulares son necesarias para el procesamiento de las proteínas estructurales del VHC. En el retículo estas peptidasas actúan liberando una forma inmadura de la proteína de la cápsida, la cual participa en el ensamblaje del virus (Vauloup-Fellous y cols., 2006). El posterior procesamiento produce la forma madura de la proteína de la cápsida y libera a las proteínas E1, E2 y p7 (Pawlotsky y cols., 2007). Más adelante, las glicoproteínas de la envoltura transitan por subsiguientes pasos de maduración, los cuales incluyen N-glicosilación, adquisición de conformación y ensamblaje de los heterodímeros E1E2 (Penin y cols., 2004).

La autoproteasa dependiente de zinc, NS2-3, asegura el corte en *cis* entre NS3 y NS2. Una vez ensamblada con su cofactor NS4A, NS3 cataliza el corte en *cis* en la unión NS3-NS4A y los cortes en *trans* de las uniones NS4A-NS4B, NS4B-NS5A y NS5A-NS5B (Lindenbach y Rice, 2005).

Se considera que la replicación del VHC es semiconservativa y asimétrica, con dos pasos catalizados, ambos, por NS5B. La cadena de polaridad positiva sirve de molde para la síntesis del intermediario de cadena negativa en el primer paso; en el segundo, las cadenas negativas son el molde para la producción de numerosas copias de cadena positiva que se emplean en la traducción de la poliproteína, en la síntesis de nuevos intermediarios replicativos, o en el empaquetamiento de nuevos viriones (Pawlotsky y cols., 2007).

La infección por el VHC conduce a una reorganización del sistema de membranas intracelulares, un prerequisite para la formación del complejo de replicación, que asocia a las proteínas virales, los componentes celulares y las hebras de ARN nacientes. La proteína viral NS4B parece ser suficiente para inducir la formación de la “red membranosa”, la cual contiene a todas las proteínas no estructurales del VHC (Egger y cols., 2002). Específicamente, se ha descrito la capacidad del VHC para replicarse asociado a membranas autofagosomales, aunque todavía no está clara la relación entre las redes membranosas y los autofagosomas (Sir y cols., 2012). Además se conoce que la maduración, con el paso por el complejo de Golgi, y la secreción de las partículas virales tiene puntos en común con la secreción de las lipoproteínas de muy baja densidad (Coller y cols., 2012).

1.3 Historia natural

Se estima que aproximadamente el 10% de las personas infectadas por el VHC manifiestan hepatitis aguda sintomática y el 80% de los casos desarrolla infección crónica (Liang y cols.,

2000). Los resultados parecen apuntar hacia una mayor tasa de resolución espontánea de la infección en los casos de infecciones agudas sintomáticas, que en las asintomáticas (Gerlach y cols., 2003). Los síntomas de la infección crónica son poco específicos, siendo la fatiga probablemente el más común (Delahooke, 2004).

Una vez que la etiología de la enfermedad hepática se ha determinado, los datos histológicos, obtenidos por biopsia, proveen al especialista de información esencial para el manejo del paciente. El sistema de puntuación de Ishak (Ishak y cols., 1995) es ampliamente usado en Cuba para la clasificación de la hepatitis crónica. De acuerdo a este sistema, el término grado se usa para describir la intensidad de la actividad necroinflamatoria, mientras que el estadio es una medida de la fibrosis y de la alteración de la arquitectura histológica, por ejemplo la progresión estructural de la enfermedad (Ishak y cols., 1995). La exactitud con que el grado y el estadio pueden ser correctamente definidos en una biopsia está limitada por el error potencial de la toma de la muestra, por lo que deben ser tomados como aproximaciones que dependen del tamaño y la calidad de la muestra. No obstante, tienen valor pronóstico e influyen en el tratamiento que se le da al paciente (Ishak y cols., 1995). Específicamente este sistema propone una puntuación de 0-6 para la fibrosis (0= no fibrosis, 6= cirrosis) y de 0-18 para la necroinflamación, elemento al cual contribuyen cuatro aspectos: A) hepatitis periportal o periseptal, B) necrosis confluyente, C) necrosis focal lítica, apoptosis e inflamación focal y D) inflamación portal; cada uno con un máximo de 4 puntos, excepto la necrosis confluyente, que puede alcanzar un máximo de 6 (Ishak y cols., 1995).

La probabilidad de desarrollo de cirrosis, la cual se manifiesta generalmente en un período de veinte años después de la infección, depende de la edad en el momento de la infección, aumentando de 5% en menores de cuarenta años, hasta un 20% en aquellos que se infectan siendo mayores (World Health Organization, 2004). En una proporción significativa de los

pacientes cirróticos se manifiesta el carcinoma hepatocelular en el transcurso del tiempo, estimándose la tasa de progresión anual en 1,6% (World Health Organization, 2004). La esteato-hepatitis parece ser un cofactor importante que favorece el avance de la fibrosis y los pacientes con niveles normales de transaminasas muestran una progresión más lenta de la enfermedad (Lavanchy, 2009). No obstante, con respecto a las características de los pacientes con niveles normales de transaminasas existen contradicciones, muchas de las cuales surgen del hecho que los estudios no son homogéneos en cuanto a los valores de corte que utilizan para estos parámetros. Algunos autores consideran que los valores de transaminasas persistentemente normales no excluyen la presencia de una enfermedad hepática progresiva, ya que han demostrado que solo unos pocos pacientes mantienen realmente las transaminasas en niveles normales a lo largo de la enfermedad y describen las fluctuaciones en los niveles de las mismas como lo más común (Lawson, 2010). En correspondencia con esto han observado que la tasa de progresión de la fibrosis es similar entre pacientes con transaminasas persistentemente normales y aquellos con transaminasas elevadas (Lawson, 2010). Por otro lado, otros datos apoyan la noción de que existen pacientes en los que las transaminasas se mantienen normales por al menos 12 años y en ellos la progresión hacia la cirrosis es nula (Persico y cols., 2006).

Se considera que la influencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), en la coinfección, depende del conteo de células T CD4⁺ y el riesgo relativo de desarrollo de cirrosis entre los pacientes coinfectados con el VIH y el VHC se duplica. Por otro lado, en la coinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) y el VHC el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular es mayor que en los casos mono infectados; sin embargo, se desconoce si esto es el reflejo del efecto de ambos virus en ausencia de interacción o si se trata de un efecto sinérgico (World Health Organization, 2004).

El consumo de alcohol por encima de 50 g/día acelera la progresión de la cirrosis (Harris y cols., 2001) y también existen evidencias de que el cigarro influye en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Fujita y cols., 2006). También el sexo masculino se ha asociado a la progresión del daño en la infección crónica (Freeman y cols., 2001); de hecho, se ha observado un predominio del sexo femenino en los pacientes con niveles de transaminasas persistentemente normales (Lawson, 2010). Otro factor que se ha encontrado asociado a la alteración de las transaminasas en los pacientes infectados es un índice de masa corporal elevado (Lawson, 2010).

Los alelos del HLA de los individuos parecen influir en la probabilidad de clarificación viral (Barrett y cols., 1999). Sin embargo, los resultados obtenidos por Lauer y colaboradores (Lauer y cols., 2002) indican que el tipo de HLA no predice la existencia de respuestas inmunes dominantes en individuos seropositivos, que los epitopos reconocidos se distribuyen en todo el genoma y que no existen regiones preferentemente reconocidas por la mayoría de los pacientes.

1.4 Epidemiología

Los datos disponibles relacionados con los diferentes aspectos epidemiológicos del VHC se encuentran fuertemente influenciados por la metodología de estudio, las regiones geográficas y grupos poblacionales muestreados, entre otros factores. En general, se estima que la prevalencia de la infección por el VHC es de aproximadamente 2,2-3,0% de la población mundial (130-170 millones de personas); mientras que los estimados de países individuales indican que la mayor prevalencia se encuentra en África y la región del Mediterráneo Oriental (Shepard y cols., 2005).

Un estudio realizado aplicando modelos matemáticos estimó que las personas nacidas entre 1940 y 1965 tuvieron el mayor riesgo de infección por el VHC, con un pico de incidencia entre los 20 y 35 años (Armstrong y cols., 2000). Desde 1990 ha habido un decremento en la incidencia de la hepatitis aguda en los Estados Unidos y Europa. Esta disminución se atribuye a la mejoría en las técnicas de análisis de sangre, programas de recambio de jeringuillas y agujas, así como en la educación entre los individuos adictos a las drogas inyectables (Maheshwari y cols., 2008).

La vía fundamental de transmisión del VHC es la parenteral. La introducción de pruebas de rutina a la sangre de donantes ha eliminado virtualmente la transmisión por transfusiones en los países desarrollados. En estos el consumo de drogas inyectables ilícitas es la principal fuente de infección en la actualidad. En los países en vías de desarrollo la transmisión nosocomial es un problema fundamental debido a la reutilización de jeringuillas y agujas no adecuadamente esterilizadas (revisado por Lavanchy, 2009). Por otro lado, en grupos de riesgo como los hemodializados la infección crónica por el VHC es común, con prevalencias entre 10 y 33% (KDIGO, 2008).

Otros modos de transmisión tienen menor relevancia. La transmisión sexual ocurre poco frecuentemente y el riesgo de transmisión perinatal es muy bajo (revisado por Lavanchy, 2009). Sin embargo, una carga viral de más de 10^6 copias/ mL en la madre se asocia con un incremento en el riesgo de transmisión vertical y la coinfección con VIH incrementa el riesgo en 15-22% (revisado por Maheshwari y cols., 2008). También se ha estudiado el riesgo de transmisión por procedimientos cosméticos, tatuajes, acupuntura, entre otros, pero su contribución a la diseminación de la infección aún es incierta (revisado por Maheshwari y cols., 2008).

1.5 Respuesta inmune

1.5.1 Respuesta innata

Se conoce que los interferones de tipo I son efectivos contra los sistemas de replicones del VHC (Frese y cols., 2001) y se ha documentado la existencia de varias proteínas inducidas por IFN, con actividad anti-VHC, a saber, la proteína quinasa R y la adenosina desaminasa 1 específica de ARN, entre otras (revisado por Thimme y cols., 2006). La proteína quinasa R es una quinasa de tipo serina-treonina, que fosforila la subunidad alfa del factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF2. Consecuentemente, la traducción de los ARNm celulares y virales es bloqueada. La adenosina desaminasa 1 específica de ARN cataliza la desaminación de la adenosina en los ARN de doble cadena dando lugar a inopina, lo que trae como resultado que la estructura secundaria se desestabiliza por la formación de pares de bases inestables y se acumulan las mutaciones en el genoma viral (revisado por Thimme y cols., 2006).

Con relación a las células NK (del inglés Natural Killer), se ha observado que su función citolítica en pacientes crónicos, evaluada *ex vivo*, no parece estar atenuada en comparación con la de personas sanas, pero sí se detecta una disminución en el número de este tipo de células, con capacidad citolítica activada, circulantes en sangre periférica (Morishima y cols., 2006). En el trabajo de Morishima y cols. (Morishima y cols., 2006) no se evaluó la capacidad de las células NK circulantes para secretar IFN- γ , pero no se descarta la posibilidad de que la infección crónica por el VHC pudiera afectar dicha función, sin afectar la capacidad citolítica. De cualquier manera, aún no se ha podido definir cuál de las funciones de estas células, citolisis o secreción de citoquinas, es la más relevante para el control del VHC (revisado por Koziel, 2006).

También se ha documentado que las células NK de pacientes infectados por el VHC tienen afectada su capacidad para activar a las células dendríticas, debido a la expresión

incrementada del receptor CD94-NK2A y la producción de interleuquina 10 (IL-10) y TGF- β (del inglés Transforming Growth Factor beta) (Jinushi y cols., 2004). Adicionalmente, se ha detectado que la proteína E2 del VHC puede inhibir la capacidad citolítica y secretora de citoquinas de las células NK a través del entrecruzamiento de CD81 (revisado por Koziel, 2006). Sin embargo, Yoon y cols. (Yoon y cols., 2009) observaron que las proteínas de la envoltura de genotipo 1a y 2a, expresadas como parte de partículas infecciosas, no modulan la función de las células NK.

1.5.2 Respuesta de anticuerpos

La infección por el VHC trae como resultado la producción de anticuerpos contra virtualmente todas las proteínas virales en casi la totalidad de los individuos inmunocompetentes (Farci y cols., 1991). Estos anticuerpos son usualmente detectables entre siete y ocho semanas después de la infección, por lo que su aparición se considera de curso lento. Los primeros anticuerpos que aparecen son aquellos dirigidos contra la proteína de la cápsida (Chen y cols., 1999). Se ha encontrado que las inmunoglobulinas específicas contra las proteínas de la superficie del VHC (E1 y E2) se producen más frecuentemente en las infecciones persistentes que en las de duración limitada (Prince y cols., 1999). Los antígenos inmunodominantes con respecto a la respuesta humoral son las proteínas de la cápsida, NS3 y NS4 (Neville y cols., 1997) y se ha demostrado que la respuesta de IgG contra los diferentes antígenos virales se restringe fundamentalmente a la subclase IgG1, excepto contra la proteína de la cápsida (Chen y cols., 1999; Hirayama y cols., 2001).

Se ha observado que la infección crónica por el VHC se asocia a un patrón distintivo de inmunoglobulinas séricas, con niveles significativamente superiores de IgM, IgG y sus subclases en comparación con los individuos sanos. No obstante, estos incrementos parecen

ser independientes del daño hepático, ya que no han podido ser correlacionados con el estado patológico o bioquímico en estos pacientes (Lotfy y cols., 2006).

Hasta el momento no parece existir un consenso respecto a la relación entre el perfil de la respuesta humoral específica contra el VHC y la respuesta frente a la terapia antiviral. Algunos estudios asocian la ausencia de respuesta contra determinados antígenos con propensión a la resolución de la infección (Yuki y cols., 1995a), mientras que otros asocian la presencia de determinadas inmunoglobulinas con la RVS (Chu y cols., 2004; Sakugawa y cols., 1998). Los anticuerpos específicos contra la proteína de la cápsida han sido de los más estudiados, encontrándose una alta frecuencia de IgM e IgG en todos los pacientes crónicos, independientemente de la actividad histológica (Nagayama y cols., 1994; Quiroga y cols., 1995). No obstante, en general se observa que la eliminación del virus, en respuesta a la terapia antiviral, se asocia a la desaparición o disminución en los niveles de IgM anti-cápsida, mientras que sus niveles se incrementan en los pacientes no respondedores (Nagayama y cols., 1994; Quiroga y cols., 1995), igualmente se ha encontrado correlación entre niveles indetectables de IgM anti-cápsida antes del tratamiento y una respuesta favorable después de este (Negro y cols., 1995). Asimismo, se ha observado una correlación positiva entre la viremia y la presencia de anticuerpos IgM anti-cápsida (Yuki y cols., 1995b). Por lo tanto, las inmunoglobulinas de la clase IgM anti-cápsida se consideran un marcador serológico de relevancia para el desenlace de la infección en respuesta al tratamiento antiviral.

Sin embargo, el papel de la respuesta humoral en la protección es controvertido. Los resultados de algunos estudios muestran que no previenen una segunda infección en chimpancés o humanos (Farci y cols., 1992; Lai y cols., 1994). En otros, la presencia de anticuerpos anti-VHC, como marcadores de una infección previa, se asoció con la eliminación de la infección después de una re-exposición (Mehta y cols., 2002). Además, los anticuerpos

específicos contra el VHC no han podido ser correlacionados con un desarrollo favorable de la enfermedad (Chen y cols., 1999) y se conocen casos de clarificación espontánea de la viremia sin seroconversión (Post y cols., 2004).

Los anticuerpos contra las proteínas de la envoltura se consideran los candidatos fundamentales para la neutralización viral. En la proteína E2, dentro de la RHV1, adyacentes a esta y en la región de unión a CD81 se han identificado varios epitopos reconocidos por anticuerpos con actividad neutralizante. También se han reconocido epitopos de potencial importancia dentro de la proteína E1 (revisado por Zeisel y cols., 2007).

Se ha demostrado la capacidad de los anticuerpos neutralizantes para prevenir la replicación en sistemas de cultivo *in vitro* (Yi y cols., 2006) y para modular la infección por el VHC *in vivo* (Eren y cols., 2006). Asimismo, se demostró la protección pasiva en un grupo de pacientes a los que se les administró una preparación de inmunoglobulinas derivada de una muestra de plasma con ARN del VHC detectable, que contenía anticuerpos neutralizantes (Yu y cols., 2004). Sin embargo, en la mayoría de los pacientes la infección por el VHC se establece a pesar de la inducción de una respuesta humoral dirigida contra varios epitopos de las glicoproteínas de la envoltura (Logvinoff y cols., 2004; Steinmann y cols., 2004). Los estudios funcionales que analizan la respuesta de anticuerpos neutralizantes han demostrado la ausencia de estas inmunoglobulinas en la mayoría de los pacientes con infección aguda (Logvinoff y cols., 2004; Steinmann y cols., 2004). No obstante, estos estudios han estado sesgados por el hecho de que el ligando viral sustituto se deriva de un aislamiento diferente al del virus presente en el paciente, lo que limita la detección de anticuerpos específicos de ese aislamiento. En otros casos se ha podido demostrar que los anticuerpos neutralizantes son inducidos en la fase temprana de la infección en aquellos pacientes que eliminan el virus (Pestka y cols., 2007) o controlan la infección (Lavillette y cols., 2005). Por el contrario, los

individuos en los que se establece la infección crónica se caracterizan por la ausencia o bajos títulos de anticuerpos neutralizantes en la fase temprana de la infección (Pestka y cols., 2007). Todos estos elementos sugieren que una respuesta amplia y temprana de anticuerpos neutralizantes puede contribuir al control del VHC y apoyar la respuesta celular en la eliminación viral.

Los pacientes que no eliminan el virus desarrollan altos títulos de anticuerpos con actividad de neutralización cruzada durante la infección crónica (Logvinoff y cols., 2004; Steinmann y cols., 2004), pero estos no son capaces de controlar la infección por el VHC. A este respecto se propone que puede ocurrir escape viral a diferentes niveles, desde la propia existencia del VHC como cuasiespecie altamente variable, la interacción de las proteínas de la envoltura con lipoproteínas de alta densidad, hasta la combinación de diversos mecanismos como las mutaciones puntuales y cambios en el patrón de glicosilación de E1 y E2, entre otros (revisado por Zeisel y cols., 2007).

1.5.3 Respuesta celular

Desde los primeros estudios en pacientes con infección aguda por el VHC se conoce que las respuestas vigorosas, multiespecíficas y sostenidas de células T CD4⁺ se asocian a un curso limitado de la infección (Gerlach y cols., 1999). En las primeras fases de la infección el repertorio de células T CD4⁺ es amplio e incluye epitopos dominantes y altamente promiscuos (Schulze Zur y cols., 2005).

Igualmente, la respuesta de células T CD8⁺ en la infección aguda de duración limitada es vigorosa y multiespecífica, dirigida hacia aproximadamente una decena de epitopos (Gruner y cols., 2000). Se ha demostrado que estas células pueden ser sensibilizadas mediante presentación cruzada por las células dendríticas (Accapezzato y cols., 2005) y subsiguientemente llevar a cabo funciones efectoras, que no solo incluyen mecanismos

citotóxicos, sino además la secreción de citoquinas como el IFN- γ y el TNF- α (del inglés Tumor Necrosis Factor alpha), que pueden inhibir la replicación viral sin eliminar a la célula infectada (Guidotti y Chisari, 2001). Esto último refleja el potencial curativo de las células T CD8⁺, que en un principio fueron consideradas meramente citotóxicas.

Algunas investigaciones en pacientes bajo tratamiento antiviral sugieren que la estimulación de la actividad de las células T CD8⁺, de conjunto con un perfil de citoquinas de tipo Th1 (del inglés T helper 1), puede estar asociado con un pronóstico favorable (Kamal y cols., 2004). Otros indican que la magnitud y amplitud de las respuestas de células T anti-VHC previas a la terapia no permiten predecir el resultado del tratamiento y que la supresión viral exitosa se asocia a una disminución de estas respuestas, probablemente debido a que la estimulación antigénica es eliminada (Lauer y cols., 2005).

Los estudios realizados en chimpancés infectados experimentalmente muestran que las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas del VHC se acumulan en el hígado entre ocho y catorce semanas después de la infección y este hecho coincide con la eliminación viral y la inflamación hepática (Thimme y cols., 2002). Tanto las células T CD4⁺ como las CD8⁺ juegan un papel crucial en la inmunidad protectora (Grakoui y cols., 2003; Shoukry y cols., 2003). Después de la eliminación de la infección, ambos tipos celulares permanecen en niveles detectables durante décadas, mientras que los anticuerpos circulantes pueden hacerse indetectables (Takaki y cols., 2000).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el fallo en la respuesta de células T, que conduce a la persistencia de la infección. El fallo primario para inducir la respuesta de células T o el agotamiento de una respuesta inicialmente vigorosa son identificados como importantes factores predictores de la persistencia viral (Neumann-Haefelin y cols., 2005). De hecho, varios estudios muestran que los pacientes que desarrollan infección crónica típicamente

tienen respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ débiles y oligo/mono específicas en ambas fases, aguda y crónica, de la infección (Neumann-Haefelin y cols., 2005). Adicionalmente se ha documentado la pérdida directa, por agotamiento, de las respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ durante la hepatitis aguda en pacientes que controlaron temporalmente la infección, pero que subsiguientemente progresaron hacia la persistencia viral (Lechner y cols., 2000a). Los mecanismos responsables del fallo primario de las células T o de su agotamiento no están claros aún. Se sugiere, por ejemplo, que la presentación antigénica por la célula dendrítica y los macrófagos puede estar afectada en la infección por el VHC (Sarobe y cols., 2002), lo que trae como resultado una inefectiva sensibilización de las células T o el mantenimiento fallido de las células de memoria. Otra explicación para el agotamiento de las células T pudiera ser la eliminación de células específicas contra el virus, en presencia de alta carga viral persistente, según ha sido demostrado para la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica en ratones adultos (Moskophidis y cols., 1993) o la muerte rápida inducida por activación, por ejemplo, en el hígado (Nutti y cols., 1998).

También se describe con frecuencia la anergia funcional de las células T específicas contra antígenos virales en los pacientes infectados por el VHC. Varios estudios han demostrado que la disfunción de las células T CD8⁺ ocurre tanto en la fase aguda como en la crónica (Lechner y cols., 2000a; Thimme y cols., 2001). A este respecto se ha descrito un fenotipo de célula T CD8⁺ denominado “aturdido” que se caracteriza por deficiencias en la capacidad proliferativa, la citotoxicidad y la secreción de TNF- α e IFN- γ (Thimme y cols., 2006).

La disfunción de las células T se ha observado en el curso temprano de la infección en todos los pacientes, independientemente del posterior desenlace virológico (Lechner y cols., 2000a; Thimme y cols., 2001). Sin embargo, en los pacientes en los que la infección tiene un curso limitado, la recuperación de la funcionalidad de las células T CD8⁺ se asocia temporalmente

con la caída de la viremia y la resolución de la enfermedad (Lechner y cols., 2000a; Thimme y cols., 2001). Por el contrario, la funcionalidad de dichas células permanece suprimida en los pacientes que progresan hacia la infección crónica (Urbani y cols., 2002).

La disfunción de las células T CD8⁺ también está asociada con un fenotipo inmaduro; estas son mayormente CD28⁺ y/o CD27⁺, lo que indica que permanecen en un estado de diferenciación temprano (Appay y cols., 2002). En los pacientes crónicos también se ha detectado que las células T CD8⁺ específicas de citomegalovirus (CMV) expresan un fenotipo menos maduro, lo que sugiere que la influencia negativa del VHC se extiende a células con otras especificidades. (Lucas y cols., 2004). Sin embargo, dichas células específicas de CMV no muestran afectación funcional en los experimentos *in vitro* y nunca se ha observado una reactivación de la infección por CMV debido a inmunodeficiencia en los pacientes con hepatitis C crónica (Thimme y cols., 2006). En relación con esto, un estudio muestra que las células T CD8⁺ específicas del VHC, y no de influenza, tienen afectada su capacidad para secretar IFN- γ , a pesar de su acumulación en el hígado (Spangenberg y cols., 2005).

Se conjetura que los diferentes mecanismos de fallo de las células T CD8⁺ son el resultado directo de la disfunción de las células T CD4⁺, que es común en la infección persistente por el VHC (Day y cols., 2003; Semmo y cols., 2005). También se ha documentado el desarrollo de células CD8⁺ productoras de IL-10 y específicas de antígenos virales, conocidas como células T reguladoras tipo 1 (Tr1), las cuales se desarrollan entre uno y dos meses después de la presentación clínica aguda (Kaplan y cols., 2008). A pesar de ser específicas de antígeno en su fase de inducción, en la fase efectora ejercen la supresión de forma no específica de antígeno, mediante la producción de IL-10 (Accapezzato y cols., 2004). Esta respuesta se asocia inversamente con los niveles de alanina aminotransferasa (ALAT) y positivamente con la viremia, así como con la supresión de la proliferación de células CD4⁺ antivirales durante la

infección aguda (Kaplan y cols., 2008). Además, la frecuencia de las células T CD8⁺ secretoras del IL-10 correlaciona inversamente con el índice de actividad histológica total, mientras que la correlación con las productoras de IFN- γ es directa (Accapezzato y cols., 2004), con coincidencia en frecuencia, magnitud y amplitud de especificidad. Estos datos sugieren que la respuesta de este tipo de células se induce como un mecanismo compensatorio que limita la inflamación y la inmunopatología, conlleva la supresión de las células CD4⁺, el incremento de la viremia y la evolución hacia la cronicidad.

También se ha documentado que en los pacientes crónicos la mayoría de los linfocitos T citotóxicos intrahepáticos, específicos contra el VHC, no son capaces de comportarse como efectores completamente diferenciados, a pesar de la expresión de altos niveles de perforina (Accapezzato y cols., 2004). No obstante, están directamente relacionados con el índice de actividad histológica total, pero no con los niveles de ALAT, lo cual sugiere que están principalmente involucrados en el reclutamiento de células inflamatorias, más que en la lisis de hepatocitos (Accapezzato y cols., 2004).

Adicionalmente, se describe la existencia de subpoblaciones de células T CD4⁺CD25⁺, que se activan específicamente a través del receptor de célula T. Estas se encuentran en números elevados en la sangre periférica de los pacientes infectados que presentan niveles normales de ALAT y daño hepático mínimo, en comparación con los pacientes con niveles alterados de enzimas hepáticas y hepatitis avanzada (Bolacchi y cols., 2006). Esta población también se ha encontrado enriquecida en los pacientes crónicos en comparación con los individuos que se han recuperado de la infección o que no han sido infectados (Boettler y cols., 2005; Cabrera y cols., 2004).

Se ha observado una correlación inversa entre la reactividad de las células CD4⁺ y la frecuencia de este tipo de células supresoras y la producción de TGF- β por las mismas y el

grado de inflamación hepática (Bolacchi y cols., 2006). Además, se ha descrito que la producción de IFN- γ en respuesta a la estimulación con péptidos, así como la proliferación de las células T CD8⁺ se ven inhibidas por las células CD4⁺CD25⁺ y el efecto es dependiente del contacto célula-célula (Boettler y cols., 2005; Cabrera y cols., 2004). Se plantea que en los pacientes crónicos estas células reguladoras pueden estar preferentemente redistribuidas hacia el hígado, sitio principal de la presentación antigénica, donde establecen una inflamación de bajo nivel y larga duración, crítica para la supervivencia tanto del paciente como del patógeno (Bolacchi y cols., 2006).

1.6 Tratamientos antivirales

Actualmente, el tratamiento antiviral estándar contra la infección por el VHC se basa en la combinación del IFN-peg- α y ribavirina. Se han descrito una serie de mecanismos mediante los cuales el IFN- α puede ejercer su acción antiviral (Hoofnagle y Seeff, 2006). En particular, la proteína NS5A se considera un factor importante en la sensibilidad del VHC al IFN- α (Thimme y cols., 2006). La ribavirina es un análogo de nucleósido cuya incorporación al genoma viral produce mutaciones, además de que inhibe la actividad de la enzima celular inosina monofosfato deshidrogenasa, afectando la disponibilidad de GTP (del inglés guanosine triphosphate), con lo cual se inhibe la replicación *in vitro* de varios flavivirus y paramiovirus (Manns y cols., 2006). El IFN- α se considera principalmente un inmunorregulador, aunque también, al igual que la ribavirina, tiene actividad antiviral (De Clercq, 2007).

Dos tipos de IFN-peg- α se encuentran disponibles: IFN-peg- α -2b (PEG-Intron; Schering-Plough, Kenilworth, EE.UU.) e IFN-peg- α -2a (PEGASYS; Hoffmann-La Roche Inc, Basel, Suiza). La pegilación ha mejorado la farmacocinética del IFN- α , permitiendo reducir su

administración a una única vez semanal y, aunque ambos IFN-peg- α tienen diferente farmacocinética, no se encuentran diferencias entre ambos en cuanto a la tasa de RVS alcanzada por los individuos tratados (McHutchison y cols., 2009). El tratamiento con IFN- α y ribavirina tiene numerosos efectos adversos que obligan en muchos casos a ajustar las dosis, interrumpir el tratamiento o contraindicarlo totalmente en determinados pacientes (Manns y cols., 2006).

La carga viral inicial, así como la cinética temprana del ARN viral permiten predecir el éxito del tratamiento. Específicamente, se considera que los pacientes con una carga viral inicial $\leq 400\ 000$ UI/mL del genotipo 1 tienen mayores probabilidades de responder satisfactoriamente ante tratamientos abreviados (Zeuzem y cols., 2012). Asimismo, los individuos infectados por el genotipo 1, en los que no se alcance la respuesta virológica temprana (RVT), la cual se define como ARN viral indetectable (RVT completa) o con una reducción de al menos dos log₁₀ (RVT parcial) después de 12 semanas de terapia no tienen oportunidad de alcanzar la RVS y se recomienda la suspensión del tratamiento (Davis y cols., 2003). Para el caso de la terapia con IFN-peg- α y ribavirina la RVT es alcanzada en el 69-76% de los individuos tratados y la RVS es alcanzada en el 67-80% de los que alcanzan la RVT (Davis y cols., 2003). Esta disminución en el porcentaje de respuesta virológica se debe a que la viremia puede reaparecer en alrededor del 20% de los pacientes que la logran controlar en la semana 12. La reaparición puede ser durante el tratamiento o durante el período de las 24 semanas siguientes al final del mismo.

Específicamente para la terapia con IFN- α y ribavirina la tasa de RVS es de aproximadamente 40% para el caso de los individuos infectados por virus de genotipo 1 (Poynard y cols., 1998), mientras que los pacientes con genotipos 2 y 3 pueden ser curados en más del 75% de los casos (McHutchison y cols., 2009). También se han descrito factores del hospedero, tales

como la edad, la raza y el sexo, como factores asociados a la respuesta al tratamiento (Akram y cols., 2011). Además se ha comprobado que ciertos polimorfismos genéticos cerca del gen *IL28B*, que codifica para el IFN- λ -3 y en el gen *SLC29A1*, que codifica para la molécula transportadora de la ribavirina, influyen en la respuesta al tratamiento (Ge y cols., 2009; Tsubota y cols., 2012).

El conocimiento acerca del ciclo replicativo del VHC ofrece oportunidades para la intervención terapéutica y una serie de moléculas, dirigidas específicamente contra las diferentes enzimas virales, muestran resultados promisorios en escenarios pre-clínicos y clínicos en el presente. Estas moléculas reciben en colectivo el nombre de terapia antiviral específicamente dirigida contra el VHC (TAED-C). Dos inhibidores de la proteína NS3 se encuentran en la actualidad a la cabeza del desarrollo de la TAED-C: el boceprevir (Malcolm y cols., 2006; Sarrazin y cols., 2007) y el telaprevir (Hezode y cols., 2009; Lin y cols., 2006). Estos han sido aprobados para su uso clínico, aunque solo limitados al tratamiento del genotipo 1 y en combinación con IFN-peg- α y ribavirina, dada su baja barrera genética para la generación de mutantes de resistencia (Pawlotsky, 2012). En la clínica, la combinación de estos antivirales con la terapia estándar ha mostrado mayores tasas de RVS y menores tasas de rebote viral que la terapia estándar sola en pacientes infectados por el genotipo 1 (Hezode y cols., 2009; Kwo y cols., 2010) y se propone la triterapia como alternativa promisoriosa para pacientes no respondedores a la terapia convencional (Hayashi y cols., 2012). De hecho, la triterapia se ha convertido en el nuevo tratamiento estándar contra el genotipo 1 del VHC (Pawlotsky, 2012). No obstante, el genotipo 1 permanece persistente en alrededor del 30% de los individuos tratados y estas terapias también comprenden numerosos efectos adversos (Kwo y cols., 2010).

En el desarrollo de la TAED-C también se destacan los inhibidores de la polimerasa NS5B, los cuales pueden estar basados en análogos de nucleótidos/nucleósidos (interactúan con el sitio catalítico de NS5B) y no nucleósidos (interactúan con diferentes sitios alostéricos de NS5B). De estos algunos han llegado a la clínica, solos (Guedj y cols., 2012) o en combinación con IFN-peg- α y ribavirina (Nelson y cols., 2012; Pockros y cols., 2008). En general han mostrado un efecto antiviral significativo en comparación con la terapia estándar, pero en algunos casos no han manifestado un perfil de seguridad satisfactorio y su posterior evaluación ha sido suspendida (Nelson y cols., 2012). Específicamente, los inhibidores no nucleosídicos por el momento restringen su acción al genotipo 1 y se ha descrito que tienen elevada capacidad para la generación de resistencia cruzada entre compuestos diferentes. Por su parte, los análogos de nucleótidos/nucleósidos son efectivos contra todos los genotipos virales descritos y muestran una alta barrera frente a la generación de resistencia *in vivo* (Pawlotsky, 2012).

Adicionalmente, se proponen las ribozimas (Ryoo y cols., 2012) y los ARN de interferencia (Ansar y cols., 2011), entre otros, como mecanismos de silenciamiento génico específico y la proteína p7 se considera un blanco potencial de diversas moléculas inhibitoras (De Clercq, 2007).

También se trabaja en la obtención de inhibidores de ciclofilinas, proteínas del hospedero que juegan un papel importante en la replicación viral (Pawlotsky, 2012). Algunos de estos compuestos han logrado suprimir la replicación viral en el escenario clínico, así como inducir la expresión de IFNs de tipo I en pacientes infectados por el genotipo 1 (Hopkins y cols., 2012). Debido a que su blanco son proteínas del hospedero, estos compuestos tienen una amplia cobertura de genotipos virales y baja capacidad para la generación de mutantes de resistencia (Pawlotsky, 2012).

Como consecuencia del reciente desarrollo de la TAED-C, los factores asociados a la RVS frente a la misma no se conocen a profundidad, pero ya se cuenta con evidencias de que el polimorfismo genético cerca del gen *IL28B* juega también un papel determinante en la respuesta frente a la triterapia (Poordad y cols., 2012). A pesar de los resultados promisorios, estos inhibidores tienen entre sus desventajas fundamentales el efecto aditivo en cuanto a eventos adversos y el incremento del número de medicamentos a combinar, que potencialmente afectan la adherencia de los pacientes al tratamiento. Además ciertos genotipos suelen ser más resistentes a su acción. Efectivamente, ya se ha observado que muchas de las mutaciones descritas para la TAED-C están presentes en las cepas circulantes desde antes de la terapia y en ocasiones, la secuencia consenso para un genotipo o subtipo es la mutación de resistencia a la droga (Gaudieri y cols., 2009). Por lo tanto, muy probablemente se deberán desarrollar estrategias que conlleven la combinación simultánea de varios de estos enfoques, siempre que su toxicidad no implique una disminución severa de la calidad de vida de los pacientes. En este sentido se exploran con gran expectativa regímenes libres de IFN- α , con resultados alentadores hasta el momento (Poordad y Dieterich, 2012).

1.7 Desarrollo de vacunas terapéuticas contra el VHC

Hasta el presente, no existe ninguna vacuna profiláctica o terapéutica contra el VHC. Se ha descrito el desarrollo de sistemas de replicación *in vitro* donde se logra la producción de partículas virales con capacidad de infección (Lindenbach y cols., 2005; Wakita y cols., 2005); no obstante, no se cuenta aún con un modelo de cultivo celular asequible para la obtención de vacunas basadas en virus atenuados. Por lo tanto, los esfuerzos se centran en vacunas compuestas por uno o varios antígenos o epitopos representativos, ya sea en forma de proteínas recombinantes, péptidos sintéticos o vectores. Básicamente, los enfoques tienen

como objetivos la inducción de inmunidad mediada por células B específicas y/o la inducción de inmunidad celular, además de la modulación de la inmunidad existente en los individuos ya infectados.

Múltiples candidatos vacunales contra el VHC han sido o están siendo evaluados en diferentes fases, la mayoría en estado de estudio de inmunogenicidad en modelos animales. Los estudios en chimpancés marcan pautas particulares, por la capacidad de esta especie para soportar la replicación del VHC, aunque el curso posterior de la infección transcurre con diferencias importantes con relación a los humanos (Inchauspe y Michel, 2007).

El primer candidato vacunal en alcanzar la evaluación clínica fue el desarrollado por la compañía Chiron (Emeryville, EE.UU.). Este candidato basado en las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2, formuladas en MF59 demostró su capacidad para generar anticuerpos neutralizantes y respuestas proliferativas de células T, con un patrón de citoquinas predominantemente de tipo Th1 en voluntarios sanos (Resúmenes ISVHLD, 2006).

Otro candidato vacunal basado en proteínas de la envoltura del VHC fue desarrollado por la compañía Innogenetics (Ghent, Bélgica). Este candidato consistió en una variante truncada recombinante de la proteína E1 del VHC, formulada en hidróxido de aluminio (Nevens y cols., 2003) y demostró su capacidad para inducir respuestas humorales y de proliferación de células T, con secreción de IFN- γ , tanto en individuos sanos como en pacientes crónicos (Leroux-Roels y cols., 2004; Nevens y cols., 2003). En los pacientes vacunados se observó una disminución de los niveles de ALAT. Al final del estudio, el índice de Ishak total mejoró o se estabilizó en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, algunos resultados posteriores con este candidato vacunal evidenciaron su incapacidad para mejorar sostenidamente la histología hepática, y confirmaron su insuficiencia para reducir los niveles de ARN viral circulante (Nevens y cols., 2003).

El primer ensayo en probar la validez del concepto de inmunización con péptidos sintéticos del VHC en humanos fue llevado a cabo por la compañía Intercell (Viena, Austria). Esta diseñó y desarrolló el candidato vacunal IC41, constituido por péptidos de epitopos reconocidos por linfocitos T citotóxicos restringidos por el HLA-A2 y tres epitopos altamente promiscuos de células T CD4⁺ auxiliaadoras formulados con poli-L-arginina. Este candidato demostró su capacidad para inducir respuestas proliferativas de células T CD4⁺ y de secreción de IFN- γ , tanto en células CD4⁺ como CD8⁺ en voluntarios sanos (Firbas y cols., 2006) y en pacientes infectados crónicamente por el VHC y no respondedores a la terapia antiviral (Klade y cols., 2008). No obstante, solo se observaron tres individuos que redujeron temporalmente su carga viral en suero, en más de 1 log₁₀, encontrándose asociación positiva entre este resultado y las respuestas más vigorosas de secreción de IFN- γ (Klade y cols., 2008). Lamentablemente, en este estudio no se ofrecieron resultados de la evaluación del impacto de la inmunización sobre la histología hepática.

Otros candidatos basados en péptidos han sido probados en pacientes infectados crónicamente por el VHC de genotipo 1b, no respondedores a la terapia basada en IFN- α (Yutani y cols., 2007; Yutani y cols., 2009). Estos candidatos fueron capaces de inducir respuestas, tanto humorales como celulares, en un número significativo de los pacientes y se observó una tendencia hacia la correlación positiva entre la inducción de respuestas celulares y un curso clínico favorable, basado en los niveles de ALAT y el conteo de plaquetas (Yutani y cols., 2007). Estos estudios no ofrecieron resultados de evaluación histológica y ninguno de los pacientes logró erradicar el ARN viral (Yutani y cols., 2007; Yutani y cols., 2009).

También el concepto de inmunización con vectores virales recombinantes contra el VHC ha llegado al escenario clínico. Dos vectores adenovirales basados en serotipos raros (adenovirus 6 humano y adenovirus 3 de chimpancé) y que expresan las proteínas no estructurales del

VHC del genotipo 1b demostraron ser seguros en un estudio fase I en voluntarios sanos (Barnes y cols., 2012). Además, ambos vectores estimularon la respuesta de células T, CD4⁺ y CD8⁺, secretoras de citoquinas y capaces de reconocer múltiples proteínas del VHC, tanto del genotipo homólogo, como de genotipos heterólogos y de mantener la polifuncionalidad y la capacidad proliferativa, por al menos un año después de una dosis de refuerzo (Barnes y cols., 2012). Estos resultados resultan alentadores, pero el efecto de estos vectores en pacientes crónicamente infectados es aún desconocido. Por otra parte, también se ha estudiado la seguridad e inmunogenicidad de un vector poxviral basado en virus vaccinia Ankara modificado que expresa las proteínas NS3, NS4 y NS5B del genotipo 1b del VHC (Habersetzer y cols., 2011). Se realizó un estudio clínico fase I para escalado de dosis de este vector en pacientes crónicamente infectados por el VHC de genotipo 1b. Se demostró que las tres dosis evaluadas fueron bien toleradas y se indujo respuesta inmune celular específica, secretora de IFN- γ en el 33% de los inmunizados. No obstante, el efecto de reducción de la carga viral, además de modesto, fue solo temporal (Habersetzer y cols., 2011).

En general todos los candidatos vacunales evaluados en humanos hasta el momento (incluyendo otros de reciente evaluación clínica inicial basados en levaduras recombinantes o inmunización con ADN) han demostrado que es posible estimular la respuesta inmune específica en los pacientes crónicamente infectados por el VHC. Sin embargo, el objetivo principal de los mismos, que en última instancia es la erradicación del virus, no ha sido logrado. El efecto sobre la reducción de la carga viral ha sido generalmente nulo o solo se han logrado reducciones temporales de la misma. Por otro lado, lamentablemente, no todos los estudios han estado enfocados hacia la evaluación del efecto de estas intervenciones en la histología hepática, cuya mejoría se considera ventajosa, aún cuando no se logre la erradicación total de la infección, pues repercute directamente en la calidad de vida del

paciente. Un obstáculo importante en este sentido es el desconocimiento acerca de la calidad y la magnitud óptimas de la respuesta inmune para la resolución de esta infección. Parece evidente considerar que cualquier intervención terapéutica que se conciba deba comprender repetidas inoculaciones, incorporando novedosos adyuvantes y combinando varias estrategias, incluidos tratamientos antivirales, concomitante o secuencialmente.

1.8 Generalidades de la vacunación con ADN

Las vacunas de ADN son plasmidios bacterianos construidos para expresar proteínas de interés después de su administración *in vivo* y la subsiguiente transfección de las células, ya que cuentan con un promotor para la expresión de proteínas en células de mamíferos. Son consideradas herramientas confiables para simular la síntesis de proteínas que ocurre durante una infección. Permiten la exclusión de genes no necesarios o no convenientes, sin afectaciones por inmunidad previa contra el vector, ni riesgos de una infección secundaria o aquellos asociados a la reversión de los virus atenuados. Tienen como ventajas adicionales los costos relativamente bajos de producción, su estabilidad y la posibilidad de obtener preparaciones altamente puras.

Se ha demostrado que la tecnología del ADN recombinante permite la inducción de respuestas inmunes tanto humorales como celulares en modelos animales y en humanos (Hiszczyńska-Sawicka y cols., 2012; Kalams y cols., 2012; Kharfan-Dabaja y cols., 2012; Mohler y cols., 2012) y tres vacunas de ADN han sido licenciadas para uso veterinario hasta el momento, mientras que ninguna ha sido licenciada para uso en humanos (Liu, 2011). Específicamente la inmunización con ADN ha demostrado ser segura y bien tolerada en el escenario clínico contra diferentes enfermedades. Sin embargo, la robustez de la potencia alcanzada en modelos animales aún no ha podido ser igualada en humanos (Kalams y cols., 2012; Vasan y cols.,

2010), por lo que actualmente se investigan múltiples enfoques para incrementar la estabilidad del ADN en la sangre, la capacidad de transfección y la expresión de los genes, así como dirigir su distribución a los tejidos u órganos de interés (Liu, 2011).

En este sentido, la electroporación, que incrementa la magnitud, duración, multifuncionalidad y amplitud de la respuesta celular contra múltiples antígenos en comparación con la inoculación intramuscular estándar, ha demostrado ser un método bien tolerado y seguro para uso en humanos (Vasan y cols., 2011). Adicionalmente ofrece la ventaja de requerir una menor dosis de vector para alcanzar la respuesta (Vasan y cols., 2011). Así mismo se desarrollan nuevos dispositivos para administración sin agujas, tales como la pistola de genes, los sistemas de parches y la inyección a propulsión. En el último caso, la desventaja fundamental es el limitado volumen que se puede administrar, lo cual predetermina que las preparaciones deben tener una alta concentración del material (Hutnick y cols., 2011). Por su parte, la pistola de genes ha demostrado ser muy efectiva para la inducción de respuestas de anticuerpos, incluso con bajas cantidades de ADN, aunque también tiene como limitante el volumen que es posible administrar (Hutnick y cols., 2011).

Otro enfoque dirigido a incrementar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN es la coadministración de plasmidios que expresan citoquinas con efecto adyuvante, estrategia con éxito en modelos animales, pero cuyos resultados en humanos no siempre han sido los esperados (Kalams y cols., 2012). Sin embargo, se cuenta con evidencias alentadoras acerca de la importancia de una mayor profundización en el estudio de las dosis, momento para la administración, entre otros aspectos (Baden y cols., 2011). Además se ha documentado que la modificación de los plasmidios por adición de motivos CpG y secuencias de moléculas que participan en la señalización a través de los TLR mejora su inmunogenicidad (Coban y cols., 2011).

También se ha observado que las estrategias de sensibilización-refuerzo, que combinan la inmunización con ADN, con vectores virales y proteínas recombinantes pueden tener un efecto sinérgico de potenciación de la respuesta inmune. Particularmente, la estrategia de sensibilización con ADN y refuerzo con un vector viral ha demostrado ser potente en la inducción de respuestas de células T CD8⁺, altamente específicas, y permite reducir los efectos de la inmunidad contra el vector viral (Hutnick y cols., 2011).

1.9 Preparación vacunal CIGB-230

La preparación vacunal CIGB-230 está basada en la mezcla de ADN plasmídico para inmunización, que expresa los primeros 650 aminoácidos de la poliproteína del VHC de un aislamiento cubano de genotipo 1b (pIDKE2, (Dueñas-Carrera y cols., 2002)) y una variante recombinante de la proteína de la cápsida, truncada en el aminoácido 120 (Co.120, (Dueñas-Carrera y cols., 1999)). Esta preparación vacunal apuesta por la inducción tanto de respuesta de anticuerpos neutralizantes, como de respuestas celulares. En estudios *in vitro* se demostró que Co.120 interactúa con el plasmidio pIDKE2, originando partículas semejantes a virus, de morfología heterogénea (Acosta-Rivero y cols., 2005; Acosta-Rivero y cols., 2006). Por lo tanto, en dicha mezcla la proteína de la cápsida juega el doble papel de inmunógeno y sistema de liberación del plasmidio. La adición de Co.120 a la formulación de pIDKE2 estimuló la respuesta inmune inducida por la administración del plasmidio en ratones Balb/c, en los que se detectó una potente respuesta humoral y de proliferación de células de bazo (Álvarez-Lajonchere y cols., 2006). Además, la preparación vacunal CIGB-230 indujo una reducción significativa del título viral en el modelo de infección por virus vaccinia recombinante en ratones (Álvarez-Lajonchere y cols., 2006), el cual constituye un modelo sustituto que permite evaluar la respuesta celular *in vivo*. La funcionalidad de la respuesta inmune inducida por esta

preparación parece estar relacionada con la reducida degradación del ADN por su interacción con la proteína y la mejor activación y presentación de antígenos por las células presentadoras, debido a la presencia de motivos CpG en el plasmidio y a la naturaleza particulada de la proteína.

El perfil de seguridad de esta preparación vacunal fue evaluado en roedores. El estudio de biodistribución, realizado en ratones después de la administración repetida del mismo, mostró que el plasmidio se distribuyó ampliamente en diferentes órganos. Sin embargo, tres meses después de la administración no pudo ser detectado en ninguno de los órganos evaluados (Bacardi y cols., 2009). El análisis toxicológico se realizó en ratas que recibieron dosis hasta cincuenta veces superiores a la dosis terapéutica propuesta a ser empleada en humanos y no se detectaron efectos adversos en los parámetros toxicológicos, ni daños en los órganos evaluados (Bacardi y cols., 2009). Estos resultados mostraron que la preparación vacunal CIGB-230 no es tóxica a nivel local o sistémico y no se tienen evidencias de que pueda persistir indefinidamente en el organismo, lo cual valida su uso en humanos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 *Proteínas recombinantes*

Se utilizaron las proteínas recombinantes Co.120 (comprende los aminoácidos 1-120 de la poliproteína del VHC) (Dueñas-Carrera y cols., 1999), E1.340 (comprende los aminoácidos 192-340 de la poliproteína del VHC) (Lorenzo y cols., 2000) y NS3 (comprende los aminoácidos 1234-1432 de la poliproteína del VHC) (Palenzuela y cols., 2006). Todas se obtienen a partir de la cepa BL-21(DE3) de *Escherichia coli* transformada con los plasmidios correspondientes. Además se utilizó la proteína recombinante E2.680 (comprende los aminoácidos 384-680 de la poliproteína viral), que se obtiene de la levadura *Picchia pastoris* transformada con el plasmidio correspondiente (Martinez-Donato y cols., 2006). Todas se purifican a más de un 85% de pureza y su secuencia se deriva de un aislamiento cubano de genotipo 1b del VHC.

2.2 *Muestras de sangre*

En el presente trabajo se realizaron evaluaciones inmunológicas a partir de muestras de sangre de un total de 97 pacientes crónicamente infectados por el VHC de genotipo 1b, o sea con ARN viral detectable en sangre durante más de 6 meses, determinado por ensayo cualitativo basado en transcripción reversa y en la reacción en cadena de la polimerasa (UMELOSA, límite de detección 101,7 UI/mL, Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba).

Quince de los 97 pacientes, declarados no respondedores a la terapia antiviral combinada con IFN- α -2b y ribavirina, participaron voluntariamente en un ensayo clínico fase I, no aleatorizado y no controlado, sin cegamiento, de la preparación vacunal terapéutica CIGB-230 contra el VHC (Código del protocolo clínico: IG/VHI/HC/0503; Código del registro público:

RPCEC00000043). El tratamiento con CIGB-230 consistió en seis inoculaciones intramusculares de la preparación vacunal, una cada cuatro semanas. Las muestras utilizadas para las evaluaciones inmunológicas del presente estudio corresponden a estos pacientes antes de la primera inoculación de la preparación vacunal (T0) y 4 semanas después de finalizadas las inmunizaciones (T24).

Los restantes 82 pacientes participaron voluntariamente en un ensayo clínico fase II aleatorizado, controlado y a doble ciegas de la preparación vacunal terapéutica contra el VHC, CIGB-230 (Código del protocolo clínico: IG/VHI/HC/0701; Código del registro público: RPCEC00000074). En el momento de su inclusión en dicho ensayo todos los individuos eran vírgenes a tratamiento antiviral específico contra el VHC y todos recibieron el tratamiento convencional basado en IFN- α -2b (3×10^6 UI, por la vía subcutánea, tres veces por semana) y ribavirina (1000 o 1200 mg diarios, de acuerdo al peso corporal), durante 48 semanas. Adicionalmente los pacientes se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos que se diferenciaron en cuanto al tratamiento con la preparación vacunal (Figura 2). El grupo control, de 30 individuos, recibió 12 inoculaciones de placebo de la preparación vacunal, una cada 4 semanas, durante todo el período de tratamiento. Otros dos grupos recibieron seis inoculaciones de la preparación vacunal, una cada 4 semanas; uno de ellos, de 16 pacientes, comenzando simultáneamente con el tratamiento antiviral (administración simultánea) y el otro de 15 pacientes, en la semana 12 del mismo (administración tardía). Los dos grupos restantes recibieron nueve inoculaciones de la preparación vacunal, una cada 4 semanas, uno de ellos, de 16 pacientes, comenzando simultáneamente con el tratamiento antiviral y el otro de 15 pacientes, en la semana 12 del mismo. Las muestras utilizadas para las evaluaciones inmunológicas del presente estudio provienen de los pacientes que completaron el estudio y corresponden a antes del inicio (T0) y al final del mismo (T48).

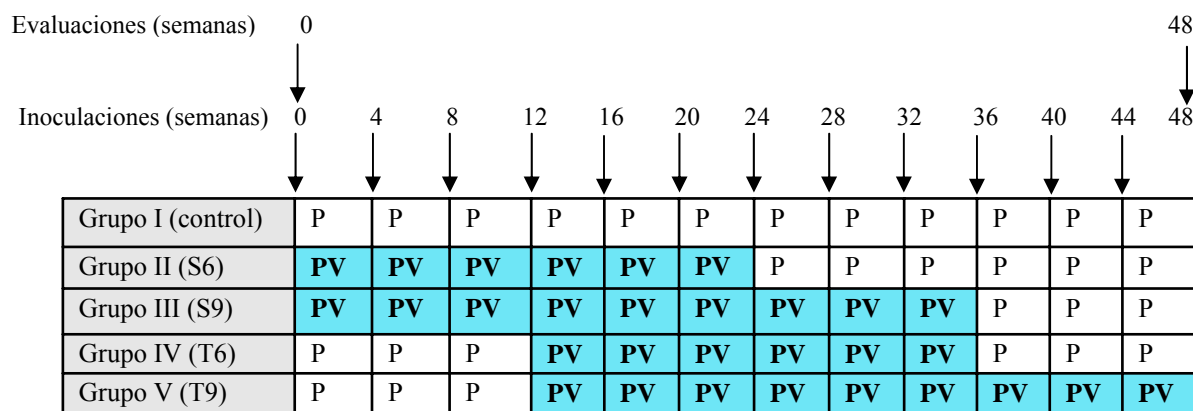


Figura 2. Representación del esquema de inmunización del estudio clínico fase II de la preparación vacunal CIGB-230 en pacientes crónicamente infectados.

Todos los grupos recibieron tratamiento con IFN- α -2b (3×10^6 UI, por la vía subcutánea, tres veces por semana) y ribavirina (1000 o 1200 mg diarios, de acuerdo al peso corporal). Para mantener el cegamiento, durante todo el estudio se administraron dosis de placebo de la preparación vacunal en todas las semanas en las que, por el diseño del mismo, no correspondiera inmunización con la misma. S= grupo de administración simultánea de la preparación vacunal CIGB-230, T= grupo de administración tardía de la preparación vacunal CIGB-230, P= Placebo de la preparación vacunal CIGB-230, PV= de la preparación vacunal CIGB-230. Los números que acompañan las letras S y T indican el número de inoculaciones de la preparación vacunal en cada caso.

En ambos ensayos clínicos el tratamiento con la preparación vacunal, CIGB-230, consistió en inoculaciones intramusculares de 0,5 mg del plásmido pIDKE2 y 0,05 mg de la proteína Co.120, en solución salina. La toma de todas las muestras de sangre se realizó bajo consentimiento informado firmado por los pacientes y se emplearon materiales estériles desechables, garantizando la protección de los individuos participantes. El presente estudio fue conducido de acuerdo a la Declaración de Helsinki y contó con la aprobación del Comité de Ética de los centros asistenciales de donde provenían los pacientes.

En todos los pacientes la presencia de infecciones concomitantes por VHB, virus de hepatitis A (VHA) y VIH fue descartada por ensayos diagnósticos del tipo ultramicroELISA fluorescente (UMELISA, Centro de Inmunoensayos, La Habana, Cuba).

En las tablas 1 y 2 se muestran las características demográficas, histológicas y virológicas de los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia y en

combinación con IFN- α -2b y ribavirina, respectivamente. Los datos de la histología hepática de cada paciente fueron obtenidos por biopsia, realizada dentro de un período de un año anterior al momento del inicio de los tratamientos y un mes después de finalizada la monoterapia con la preparación vacunal CIGB-230 o seis meses después de finalizada la triterapia con IFN- α -2b, ribavirina y CIGB-230. Todas las biopsias fueron analizadas de acuerdo al índice de Ishak (Ishak y cols., 1995). En ninguna de las biopsias iniciales de los pacientes se evidenciaba cirrosis o carcinoma hepatocelular.

Tabla 1. Características demográficas, histológicas y virológicas de los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

Parámetro	Valores	p*	
Edad (años)			
Media \pm DE	49,7 \pm 7,1	-	
Mediana (RQ)	52,0 (13,0)		
Color de la piel (N/%)			
Blanca	13 / 86,6	-	
Negra	0		
Otra	2 / 13,3		
Sexo (N/%)			
Femenino	7 / 46,6	-	
Masculino	8 / 53,3		
Histología hepática [§]			
Necroinflamación (Mediana / RQ)	T0	3,0 / 2	0,7
	T24	3,0 / 2,5	
Fibrosis (Mediana / RQ)	T0	1,0 / 2	0,3
	T24	0 / 1	
Respuesta virológica			
ARN viral (% indetectable)	T0	0	-
	T24	0	

[§] De acuerdo al índice de Ishak (Ishak y cols., 1995)

*Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.

Abreviaturas: DE, desviación estándar; N, número de pacientes o muestras evaluadas; RQ, rango intercuartílico.

Tabla 2. Características demográficas, histológicas y virológicas de los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina

N	Grupo control 30	Grupo S6 16	Grupo S9 16	Grupo T6 15	Grupo T9 15
Parámetro					
Edad (años)					
Media \pm DE	48,5 \pm 7,4	47,4 \pm 9,1	42,6 \pm 7,9	47,3 \pm 7,5	45,3 \pm 7,3
Mediana \pm RQ	48,5 \pm 11	50,5 \pm 10	43,0 \pm 7	49,0 \pm 13	46,0 \pm 10
Color de la piel (n/%)					
Blanca	16 (53,3%)	12 (75,0%)	11 (68,8%)	10 (66,7%)	8 (53,3%)
Negra	4 (13,3%)	3 (18,8%)	3 (18,8%)	4 (26,7%)	3 (20,0%)
Otra	10 (3,3%)	1 (6,3%)	2 (12,5%)	1 (6,7%)	4 (26,7%)
Sexo (n/%)					
Femenino	12 (40%)	11 (68,8%)	8 (50,0%)	11 (73,3%)	9 (60%)
Masculino	18 (60%)	5 (31,3%)	8 (50,0%)	4 (26,7%)	6 (40%)
Histología hepática [§]					
Necroinflamación T0 (Mediana \pm RQ)	6,0 \pm 6	7,0 \pm 4	5,5 \pm 5	4,0 \pm 5	6,0 \pm 8
Necroinflamación T72 (Mediana \pm RQ)	2,0 \pm 3	3,0 \pm 3	2,6 \pm 3	5,0 \pm 6	6,0 \pm 6
Valor de p*	0,006	0,007	0,026	0,201	0,078
Fibrosis T0 (Mediana \pm RQ)	1,0 \pm 1	2,0 \pm 2	1,0 \pm 1	1,0 \pm 2	1,0 \pm 2
Fibrosis T72 (Mediana \pm RQ)	1,0 \pm 2	2,0 \pm 2	1,0 \pm 1	2,0 \pm 3	2,5 \pm 3
Valor de p*	0,684	0,864	0,527	0,783	0,429
Respuesta virológica [†]					
RVTc	18 (60,0%)	10 (62,5%)	9 (56,3%)	7 (46,7%)	4 (26,7%)
RVS	14 (46,7%)	8 (50%)	8 (50%)	7 (46,7%)	2 (13,3%)

[§] De acuerdo al índice de Ishak (Ishak y cols., 1995). [†] Por intención de tratar

*Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.

Abreviaturas: DE, desviación estándar; N, número de pacientes o muestras evaluadas; RQ, rango intercuartílico; RVTc, respuesta virológica temprana completa (ARN viral indetectable en semana 12); RVS, respuesta virológica sostenida (ARN viral indetectable en semana 72); T0, evaluación realizada en semana 0; T72, evaluación realizada en semana 72.

2.3 Obtención de muestras de suero

La sangre extraída a los individuos, sin ser tratada con anticoagulante, se procesó en un período máximo de 2 horas después de la toma de la muestra. Una vez ocurrida la coagulación de la sangre, se sometió a centrifugación a 900 g durante 10 minutos. El suero se separó del coágulo y en el caso de las muestras a ser utilizadas en las evaluaciones de respuesta de

anticuerpos específicos, se sometió a inactivación por calor a 65°C en baño termostático (MGW Lauda, Dusseldorf, Alemania), durante 4 horas. Posteriormente las muestras de suero fueron centrifugadas en las condiciones ya descritas, se eliminó el precipitado y se conservó el suero a -20°C hasta su uso.

2.4 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida contra antígenos del VHC

La respuesta de anticuerpos contra los antígenos de la región estructural del VHC y la proteína NS3, se estudió mediante ELISAs (del inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Para ello se recubrieron micro placas de poliestireno de 96 pocillos, de fondo plano y alta capacidad de unión (Costar, Corning Incorporated, EE.UU.) con 100 µL de una solución de la proteína recombinante correspondiente en cada caso: Co.120 (10 µg/mL), E2.680 (10 µg/mL) y NS3 (5 µg/mL), diluidas en tampón para recubrimiento (tampón carbonato-bicarbonato 50 mmol/L, pH 9,6). Tras la incubación a 4°C durante 14-16 horas, los pocillos se lavaron cuatro veces con tampón fosfato salino (NaCl 0,27 mol/L, KCl 0,005 mol/L, Na₂HPO₄ 0,016 mol/L, KH₂PO₄ 0,003 mol/L) (PBS, del inglés Phosphate Buffered Saline) con Tween-20 al 0,1% (v/v) (PBS-T_{0,1}) y se bloquearon con 200 µL de una solución de leche descremada (Oxoid Ltd, England) al 2% y suero de carnero al 5% (Bioterio, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) en PBS-T_{0,1}. Después de una hora de incubación a 37°C los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-T_{0,1}. Las diluciones de las muestras de suero de los pacientes, a partir de 1:10, se prepararon en la solución de bloqueo, luego se adicionaron a la placa 100 µL de las mismas, y se incubaron a 37°C por una hora. Posteriormente, las placas fueron lavadas cuatro veces con PBS-T_{0,1}. Para la evaluación de la presencia de diferentes isotipos de anticuerpos, se adicionaron 100 µL de una solución de leche descremada al 2% en PBS-T_{0,1} que contenía los anticuerpos anti-IgG humano, anti-IgA humano o anti-IgM humano, todos conjugados a la

peroxidasa de rábano picante (Sigma, St Louis, EE.UU.) en dilución 1:30 000, 1:25 000 y 1:10 000, respectivamente y se incubó a 37°C por una hora.

Las reacciones positivas se visualizaron con una solución de orto-fenilendiamina al 0,05% (p/v) (Sigma, St Louis, EE.UU.) en tampón para revelado (ácido cítrico 0,1 mol/L, NaH₂PO₄ 0,2 mol/L, pH 5,0, H₂O₂ 0,1% (v/v) (Merck, Alemania)). La reacción se detuvo a los 10 minutos con 50 µL de una solución de H₂SO₄ 2,5 mol/L. La medición de la densidad óptica (DO) a 492 nm se realizó en un lector de placas (SensIdent Scan, Merck, Alemania).

El valor de corte se determinó en cada caso con el uso de un panel de 48 sueros anti-VHC negativos (UMELISA, Centro de Inmunoensayo, Cuba), provenientes de la seroteca del Departamento de Hepatitis C (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) y se estableció que una muestra, para ser considerada positiva, debía mostrar una DO que superara como mínimo 3 veces la DO promedio de los controles negativos. Adicionalmente, para comprobar la consistencia de los ensayos, en cada ocasión se emplearon al menos tres sueros humanos anti-VHC negativos (UMELISA, Centro de Inmunoensayo, Cuba), los cuales se diluyeron en las mismas condiciones que las muestras de los pacientes y como control positivo se usó un suero de probada reactividad positiva contra el antígeno específico, obtenido de la referida seroteca. La titulación de las muestras se llevó a cabo mediante interpolación en una curva control positivo, obtenida por diluciones seriadas de una muestra de suero cuyo título de anticuerpos específicos fue determinado mediante diluciones dobles. La estimación de los títulos se llevó a cabo a partir de diluciones de las muestras que mostraran una DO correspondiente al rango de linealidad de la curva.

2.5 Purificación de anticuerpos a partir de muestras de suero

Para la evaluación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos específicos contra el VHC se realizó la purificación de las inmunoglobulinas totales por cromatografía de afinidad por proteína A-Sepharosa 4 Fast flow, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, Reino Unido), a partir de muestras de suero de los pacientes incluidos en el estudio. Luego de la purificación, las inmunoglobulinas se renaturalizaron mediante diálisis contra PBS (Leong y Middelberg, 2006).

2.6 Evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes

2.6.1 Ensayo de inhibición del número de unidades formadoras de focos (UFF) de pseudopartículas del VHC (psVHC)

La producción de las psVHC y los ensayos de infección se realizaron según se ha descrito previamente (Bartosch y cols., 2003). Las células 293T (American Type Culture Collection: CRL-11268) fueron co-transfectadas con un plasmidio que codifica para las proteínas de empaquetamiento Gag-Pol del virus de la leucemia murina, un vector de transferencia que codifica para la luciferasa (Op De y cols., 2004) y un vector que codifica para las glicoproteínas de la envoltura del VHC, pHCMV-E1E2 (Bartosch y cols., 2003). La transfección se llevó a cabo siguiendo un protocolo basado en PEI Exgen 500 (Euromedex, Strasbourg, Francia). Las pseudopartículas contenidas en el sobrenadante de cultivo fueron colectadas a las 48 h después de la transfección, se filtraron por membranas de tamaño de poro de 0,45 μm y se usaron 50 μL para los ensayos de infección. Luego de incubar las psVHC con los anticuerpos durante 3 h, fueron puestas en contacto con las células Huh-7 e incubadas a 37°C durante 3 h. Posteriormente el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco y las células se mantuvieron en cultivo durante 48h. El ensayo de la luciferasa se realizó según las

indicaciones del fabricante (Promega, Madison, WI, EE.UU.), 48h después. La respuesta se considera negativa cuando la muestra, evaluada en el rango de concentración de anticuerpos 1–50 µg/mL, no es capaz de inhibir al menos el 50% del número de UFF de las psHCV. Las muestras pareadas y enmascaradas de cada paciente se evaluaron simultáneamente para evitar la variabilidad inter-experimento.

2.6.2 Ensayo de inhibición del número de UFF de partículas del VHC obtenidas de cultivo celular (VHCcc)

Los ensayos de neutralización de las VHCcc se realizaron esencialmente como se ha descrito en trabajos anteriores (Helle y cols., 2010). Las VHCcc (quimera formada por la región estructural del VHC de genotipo 1a y la región no estructural de genotipo 2a) y los anticuerpos purificados (50 µg/mL) se pre-incubaron durante 2 horas a 37°C en incubadora (Binder, Tuttlingen, Alemania), antes de ser puestos en contacto con las células blanco Huh-7 (línea celular de hematoma humano; (Nakabayashi y cols., 1982)). Después de 4 horas se reemplazó el medio de cultivo con medio fresco y las células se cultivaron por 48 horas más. Finalmente, se realizó la inmunoidentificación de la proteína E1 con un anticuerpo específico contra la misma y un anticuerpo secundario marcado con fluoróforo (anti-ratón Alexa 488, Life Technologies; CA, EE.UU.). Las UFF se contaron en un microscopio Axiophot 2 (Carl Zeiss; Alemania). Los resultados se ofrecen como porcentaje de UFF de las VHCcc= (UFF en presencia de anticuerpos/UFF en ausencia de anticuerpos) x 100. La respuesta se considera negativa cuando la muestra, evaluada en el rango de concentración de anticuerpos 1–50 µg/mL, no es capaz de inhibir al menos el 50% del número de UFF de las HCVcc. Las muestras pareadas y enmascaradas de cada paciente se evaluaron simultáneamente para evitar la variabilidad inter-experimento.

2.7 *Conteos de leucocitos y linfocitos*

Los conteos de leucocitos y linfocitos a partir de sangre total fueron realizados en un analizador hematológico ABX Micros 60 (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Estos análisis de llevaron a cabo en el laboratorio clínico del Instituto Nacional de Gastroenterología de La Habana mediante métodos validados en dicha institución.

2.8 *Aislamiento, conservación y preparación de células mononucleares de sangre periférica*

La sangre tratada con ácido citrato dextrosa (1:9) como anticoagulante, se procesó en un período máximo de 2 horas después de la toma de la muestra. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque PLUS (Amersham, Oslo, Noruega) (Islam y cols., 1995), y se conservaron en medio de congelación que contenía nueve partes de suero fetal bovino (SFB; Hyclone, EE.UU.) y una parte de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma, Deisenhofen, Alemania). Las células aisladas se mantuvieron durante 16 horas en contenedores de congelación (Nalgene Nunc International, Rochester, EE.UU.) a -80°C y luego se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido hasta su uso.

Previamente a la realización de los experimentos de evaluación de respuesta celular, las células mononucleares de sangre periférica criopreservadas se descongelaron rápidamente por inmersión en un baño termostataado (MGW Lauda, Dusseldorf, Alemania) a 37°C y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) con 10% de SFB. Posteriormente se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/mL y se sometieron a un período de reposo de 16 horas en RPMI 1640 con 10% de SFB, a 37°C y en atmósfera de 5% de CO_2 en incubadora (Binder, Tuttlingen, Alemania).

2.9 Evaluación de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica contra antígenos del VHC

Para analizar las respuestas específicas de las células mononucleares de sangre periférica contra antígenos del VHC se realizaron ensayos de proliferación contra las proteínas Co.120, E1.340, E2.680 y NS3. Posteriormente a su descongelación y período de reposo las células se lavaron dos veces con PBS y se ajustaron a 20×10^6 células/mL. Luego se realizó la tinción con 4 $\mu\text{mol/L}$ de CFSE (del inglés carboxyfluorescein succinimidyl ester) durante 8 minutos a 24-26°C, protegido de la luz. La reacción de tinción se detuvo por adición de 1 volumen de suero humano AB (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU). Subsiguientemente, las células se lavaron dos veces con PBS y una vez con medio RPMI 1640. Las células, a una concentración final de 1×10^6 células/mL en RPMI, se estimularon con las proteínas a 2 $\mu\text{g/mL}$, excepto en el caso de NS3, la cual se usó a 5 $\mu\text{g/mL}$. La estimulación se mantuvo durante seis días a 37°C y en atmósfera de 5% de CO_2 en incubadora (Binder, Tuttlingen, Alemania). Las células de cada paciente, incubadas con medio solamente, se consideraron como control negativo. Como control positivo se usaron las células de cada paciente estimuladas con Concanavalina A (ConA, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU, 5 $\mu\text{g/mL}$). Además se contó con muestras de células mononucleares de sangre periférica, provenientes de 17 pacientes crónicamente infectados por el VHC, no respondedores a la terapia con IFN- α -2b y ribavirina. Estas muestras provenían del banco de células del Departamento de Hepatitis C (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba) y se estudiaron contra los mismos antígenos, en las mismas condiciones, como referencia de la respuesta proliferativa contra estos antígenos en pacientes crónicamente infectados por el VHC, no respondedores a la terapia con IFN- α -2b y ribavirina. Después del período de estímulo, las células se colectaron y se marcaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD4-aloficocianina (clon # 11 830) y anti-

CD8-ficoeritrina (clon # 37 006) (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU) en concentraciones de 4 µg/mL y 2,5 µg/mL, respectivamente. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo (Partec Pass III, Alemania). El índice de estimulación (IE) se calculó de la siguiente forma: (% de células con baja intensidad de fluorescencia por CFSE en presencia del antígeno/% de células con baja intensidad de fluorescencia por CFSE en ausencia de antígeno)*100. Para la estimación del valor de corte para cada antígeno en el ensayo, se evaluaron las muestras de células mononucleares de sangre periférica de 10 donantes sanos (ARN del VHC indetectable según UMELOSA, Centro de Inmunoensayos, La Habana, Cuba), provenientes del banco de células del Departamento de Hepatitis C (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba) en las condiciones ya descritas. El índice de estimulación se consideró positivo cuando fue $\geq 2,5$.

2.10 Evaluación de la respuesta de secreción de IFN- γ de células mononucleares de sangre periférica contra antígenos del VHC

2.10.1 Evaluación de muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

La respuesta de secreción de IFN- γ frente a la estimulación con antígenos del VHC se evaluó mediante ELISPOT (del inglés Enzyme Linked Immunospot Assay). Se trabajó con microplacas de 96 pozos de difluoruro de polivinilideno (Millipore, MA, EE.UU.). Como anticuerpo de captura se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ (clon NIB42, BD Biosciences, ON, Canadá) a una concentración de 3 µg/mL diluido en PBS. Las placas se incubaron con la solución del anticuerpo de recubrimiento durante 14 a 16 horas, a 4°C y después se lavaron y bloquearon con medio RPMI-1640 con 10% de SFB, durante 2 horas a 37°C. Se estimularon un total de 2×10^5 células/pozo, por duplicados, con cinco mezclas de

péptidos solapados correspondientes a las proteínas virales de la cápsida, E1, E2 y NS3 (Sigma-Genosys, ON, Canadá). La secuencia de los péptidos corresponde al genotipo 1a (genoma de referencia H77, Número de acceso al Gene Bank: AF009606). Los péptidos se usaron a una concentración final de 3 µg/mL (cada péptido individual) diluido en medio AIM-V (Invitrogen, ON, Canadá), con 2% de suero humano AB (Wisent, QC, Canadá). La estimulación se mantuvo durante 40 horas a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂ en incubadora (Binder, Tuttlingen, Alemania). Al final de la incubación, las placas se trataron con una solución del anticuerpo de detección anti-IFN-γ biotinilado (clon 4S.B3; BD Biosciences, ON, Canadá) a una concentración de 0,5 µg/mL diluido en PBS con 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y se incubaron a 24-26°C durante 2 horas. Después se añadió el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (Laboratorios Bio-Rad, ON, Canadá) en dilución 1:1 000 en PBS con 0,5% de BSA y las placas se incubaron durante 1 hora a 24-26°C. Para el revelado de los puntos se añadieron 100 µL/pozo de la solución sustrato de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato/cloruro de tetrazolio nitro-azul (BCIP/NBT, Laboratorios Bio-Rad, ON, Canadá) y la reacción se detuvo después de cinco minutos, lavando con agua corriente. El conteo de los puntos se llevó a cabo usando un contador automático (Immunospot Analyzer, Cellular Technology Ltd., OH, EE.UU.). Las células incubadas con medio solo se tomaron como controles negativos. Como control positivo no específico se usó Forbol 12-mirístico 14-acetato (PMA, Sigma, St. Louis, EE.UU.) a 50 ng/mL e Ionomicina (Sigma, St. Louis, EE.UU.) a 1 µg/mL y como control positivo específico, la mezcla de péptidos CEF (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, MD, EE.UU.) que incluye péptidos de los virus de influenza, Epstein-Barr y CMV (Currier y cols., 2002). Para la estimación del valor de corte para cada antígeno en el ensayo, se evaluaron las muestras de células mononucleares de sangre periférica de 10 donantes sanos

(ARN del VHC indetectable según UMELOSA, Centro de Inmunoensayos, La Habana, Cuba), provenientes del banco de células del Departamento de Hepatitis C (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba) en las condiciones ya descritas. Los resultados se consideraron positivos cuando el promedio del número de puntos fuera al menos tres veces superior al promedio del número de puntos en los pozos de los controles negativos y hubiera al menos 50 puntos específicos (valor obtenido después de restar el número de puntos en los controles negativos) por cada 10^6 células.

2.10.2 Evaluación de muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación de IFN- α -2b y ribavirina

La respuesta de secreción de IFN- γ frente a la estimulación con antígenos del VHC se evaluó mediante ELISPOT en placas de 96 pozos con membrana de nitrocelulosa (Millipore, Molsheim, Francia). Las placas se recubrieron con 100 μ L/pozo de una solución del anticuerpo anti-IFN- γ humano (clon 1-D1K; Mabtech, Estocolmo, Suecia) diluido a 5 μ g/mL en PBS y se incubaron a 4°C, durante 14 a 16 horas. Luego se lavaron seis veces con PBS y se incubaron, para su bloqueo, con medio RPMI 1640 con SFB al 10% (v/v), a 37°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo se lavaron tres veces con medio RPMI 1640.

Posteriormente a su descongelación y período de reposo, las células se sometieron a un período de estimulación previa con los antígenos proteicos, a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂ en incubadora (Binder, Tuttlingen, Alemania), durante 72 horas. Para ello se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 y se adicionaron a razón de $0,3 \times 10^6$ células/pozo, en medio RPMI 1640 con suero humano AB (Sigma, St. Louis, EE.UU.) al 5% (v/v), en placas de 96 pozos con fondo en U. Los estímulos proteicos se usaron a una concentración final de 8 μ g/mL en igual medio de cultivo. Como control negativo de estimulación se utilizó RPMI con suero humano AB al 5%.

Después de la preincubación, se pasaron $0,2 \times 10^6$ células/pozo a la placa de ELISPOT previamente bloqueada. En este momento se añadió la ConA (Sigma, St. Louis, EE.UU.), a una concentración final de 5 $\mu\text{g/mL}$ en RPMI con 5% de suero humano AB, en los pozos correspondientes, de acuerdo al diseño del experimento. Las células se incubaron finalmente en la placa de ELISPOT, a 37°C y en atmósfera de 5% de CO_2 en incubadora (Binder, Tuttlingen, Alemania), durante 24 horas.

Después de eliminar las células y lavar las placas dos veces con agua destilada, tres veces con PBS y cinco veces con PBS con 0,05% de Tween-20 (v/v; PBS-T_{0,05}), se adicionaron 100 μL de una solución del anticuerpo anti-IFN- γ conjugado a biotina (clon 7-B6-1; Mabtech, Estocolmo, Suecia) a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ en PBS y se incubó a 4°C, durante 14 a 16 horas. Luego las placas se lavaron cinco veces con PBS-T_{0,05} y se añadieron 100 μL de una solución de extravidina conjugada a la peroxidasa de rábano picante (Sigma, St. Louis, EE.UU.), en dilución 1:800 (v/v) en PBS-T_{0,05}. Después de incubar a 24-26°C durante una hora, las placas se lavaron 3 veces con PBS-T_{0,05} y tres veces con PBS. El revelado de las placas se llevó a cabo con 100 μL de una solución de aminoetil carbazol (AEC; Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) a una concentración final de 0,5 mg/mL en solución tampón para AEC (CH_3COONa 0,021 mol/L; CH_3COOH 0,079 mol/L) con 0,05% (v/v) de H_2O_2 . La reacción se detuvo a los veinte minutos, lavando con agua corriente por ambas caras de las placas. Las placas se dejaron secar al aire, protegidas de la luz, antes de efectuar el conteo de los puntos en un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, Alemania).

Para la estimación del valor de corte para cada antígeno en el ensayo, se evaluaron las muestras de células mononucleares de sangre periférica de 10 donantes sanos (ARN del VHC indetectable según UMELOSA, Centro de Inmunoensayos, La Habana, Cuba), provenientes del banco de células del Departamento de Hepatitis C (Centro de Ingeniería Genética y

Biotecnología, La Habana, Cuba) en las condiciones ya descritas. Una respuesta se consideró positiva cuando el número de puntos en la condición de estímulo específico fuera superior al doble de los puntos en la condición sin estímulo y mayor que 50 puntos por 10^6 células para los casos de E2.680 y NS3; y mayor que 180 puntos por 10^6 células para Co.120.

2.11 Análisis estadístico

Los datos se procesaron con el programa estadístico SPSS 16.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). La normalidad de los datos se comprobó mediante la Prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas, mediante la Prueba de Bartlett. Las diferencias entre variables cuantitativas, entre grupos de pacientes se evaluaron mediante la Prueba t de Student no pareada o la Prueba U de Mann-Whitney, como prueba paramétrica y no paramétrica, respectivamente. Las diferencias en un mismo grupo, entre ambos momentos de evaluación, se analizaron mediante la Prueba t de Student o la Prueba de Wilcoxon, ambas para muestras pareadas, como prueba paramétrica y no paramétrica, respectivamente. Las comparaciones de la magnitud de la respuesta entre varios grupos se llevaron a cabo mediante ANOVA de clasificación simple (con la Prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls) o la Prueba de Kruskal-Wallis (con la Prueba de comparaciones múltiples de Dunn), como prueba paramétrica y no paramétrica, respectivamente. Los datos de frecuencias se analizaron mediante la Prueba Exacta de Fisher para las comparaciones entre diferentes grupos de individuos y mediante la Prueba Chi Cuadrado de Mc Nemar para las comparaciones de un mismo grupo de pacientes en diferentes momentos de evaluación. La posible relación entre las variables de respuesta inmune y las variables histológicas y la respuesta virológica se exploró mediante Análisis de correspondencias y la Prueba de Correlaciones por Rangos de Spearman. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Respuesta inmune detectada en muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia y su asociación con las respuestas virológica e histológica

3.1.1 Evaluación de la presencia de anticuerpos específicos contra el VHC

En el grupo de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia se evaluó la respuesta de los anticuerpos de los isotipos IgM, IgA e IgG específicos contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3. Las evaluaciones se realizaron con muestras de suero tomadas al inicio del estudio (T0) y un mes después de finalizado el mismo (T24). En general, la respuesta que se detectó con mayor frecuencia contra todos los antígenos fue la de IgG, seguida por el isotipo IgM, sin que se observaran cambios significativos en cuanto al número de pacientes con respuesta detectable entre ambas evaluaciones realizadas, para ninguno de los antígenos (Tabla 3). Tampoco se manifestaron cambios significativos en cuanto a la magnitud de estas respuestas en el tiempo del estudio (Figura 3).

Tabla 3. Porcentos de respuestas de anticuerpos detectables de las principales clases contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3 en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

Isotipo	Antígeno	T0	T24
IgM	Cápsida	100	93,3
	E2	35,7	40
	NS3	93,3	86,6
IgG	Cápsida	100	100
	E2	64,2	60
	NS3	100	100
IgA	Cápsida	73,3	66,6
	E2	0	0
	NS3	100	86,6

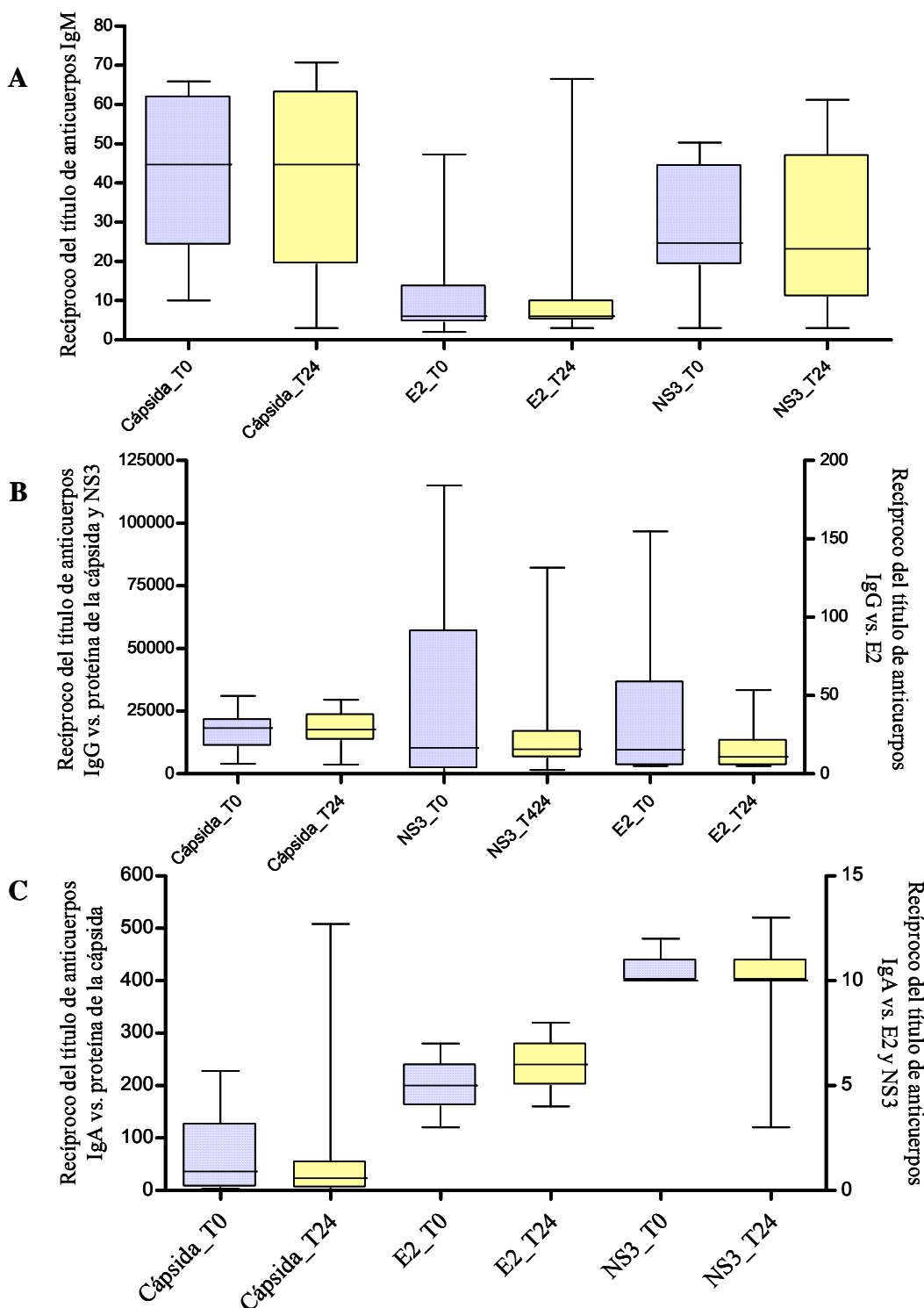


Figura 3. Respuesta humoral de las principales clases de anticuerpos contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3 en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia. Los resultados se muestran como el recíproco del título de anticuerpos. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente.

También se evaluó la capacidad neutralizante de los anticuerpos detectados mediante experimentos de inhibición del número de UFF de psVHC de genotipo 1b heterólogo en células Huh-7. Cuatro individuos (28,5%) mostraron respuesta de anticuerpos neutralizantes antes de iniciar el tratamiento con la preparación vacunal. Después del tratamiento se indujo respuesta de anticuerpos neutralizantes *de novo* en seis individuos (42,8%), aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al porcentaje de individuos con respuesta detectable entre ambos momentos de evaluación (30,7 % vs. 64,3 %). Sin embargo, sí se detectó un incremento significativo en la actividad neutralizante de los anticuerpos en T24, en comparación con T0 (Figura 4) ($p=0,04$, Prueba t de Student para muestras pareadas).

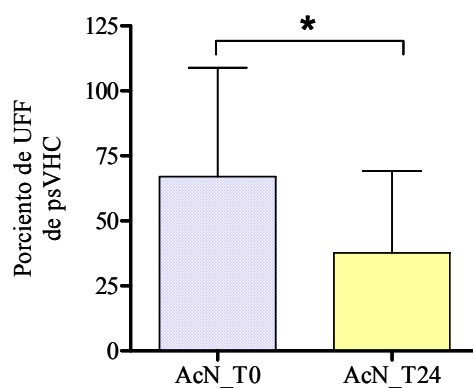


Figura 4. Actividad neutralizante de anticuerpos purificados de suero de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.

Los resultados se muestran como porcentaje de unidades formadoras de focos (UFF) de las psVHC = $(\text{UFF en presencia de anticuerpos} / \text{UFF en ausencia de anticuerpos}) \times 100$. La respuesta se considera negativa cuando la muestra, evaluada en el rango de 1–50 $\mu\text{g/mL}$, no es capaz de inhibir al menos el 50% del número de UFF de las psVHC. Las barras representan la media de los valores de cada grupo y las barras de error, la desviación estándar de la media. *Indica diferencias estadísticamente significativas entre ambos momentos de evaluación ($p=0,04$, Prueba t de Student para muestras pareadas). Abreviaturas: AcN, anticuerpos neutralizantes; T0, evaluación realizada en semana 0; T24, evaluación realizada en semana 24.

3.1.2 Evaluación de la respuesta de secreción IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica específicas contra el VHC

La presencia de células de sangre periférica secretoras de IFN- γ se evaluó antes de la primera dosis de la preparación vacunal y un mes después de la sexta dosis. Tanto antes del tratamiento, como al final de las inmunizaciones, el mayor porcentaje de respuestas se detectó contra el antígeno de la cápsida (33,3% en T0 y 60% en T24) (Tabla 4). Antes de iniciar el tratamiento, el 46,6% de los pacientes tenía una respuesta detectable de secreción de IFN- γ contra al menos un antígeno estructural (33,3% contra el antígeno de la cápsida, 20% contra E1 y 13,3% contra E2) (Anexo 1). Un mes después de la última inmunización, el 73,3% de los individuos mostraron respuesta positiva contra al menos un antígeno estructural (60% contra el antígeno de la cápsida, 26,6% contra E1 y 6,6% contra E2) (Anexo 1 y Tabla 4). Específicamente, cinco pacientes desarrollaron respuestas positivas *de novo* contra el antígeno de la cápsida después de la inmunización (33,3%) y en un individuo esta respuesta desapareció después del tratamiento (Anexo 1). En total, se observó que en seis de los pacientes (40%) se indujo respuesta *de novo* contra al menos uno de los antígenos presentes en la preparación vacunal (antígeno de la cápsida o E1) después de la inmunización. El análisis de la respuesta contra NS3 mostró que en T0, esta era detectable en un solo individuo y al final del tratamiento cuatro individuos tuvieron una respuesta detectable, siendo tres de ellos respondedores *de novo* (Anexo 1).

Tabla 4. Frecuencia de muestras con respuesta celular de secreción de IFN- γ detectable, en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

Respuesta evaluada	T0	T24
Cápsida	5/15 (33,3%)	9/15 (60%)
E1	3/15 (20%)	4/15 (26,6%)
E2	2/15 (13,3%)	1/15 (6,6%)
NS3	1/15 (6,6%)	5/15 (33,3%)
PMA	15/15 (100%)	15/15 (100%)
CEF	10/15 (66,6%)	11/15 (73,3%)

Los datos se exponen como número de muestras con respuesta detectable/ total de muestras evaluadas (% de muestras con respuesta detectable).

La evaluación se realizó mediante ensayos de secreción de IFN- γ mediante ELISPOT.

Abreviaturas: T0, evaluación correspondiente a la semana 0; T24, evaluación correspondiente a la semana 24 del tratamiento; CEF, mezcla de péptidos de los virus de influenza, Epstein-Barr y CMV (Currier y cols., 2002); PMA, Forbol 12-mirístico 14-acetato.

Específicamente, aunque no se observaron cambios significativos en la frecuencia de respuesta contra ninguno de los antígenos, sí se detectó un incremento significativo en la magnitud de la respuesta contra los antígenos E1 y NS3 después de la inmunización ($p=0,02$ y $p=0,04$, respectivamente; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas) (Figura 5).

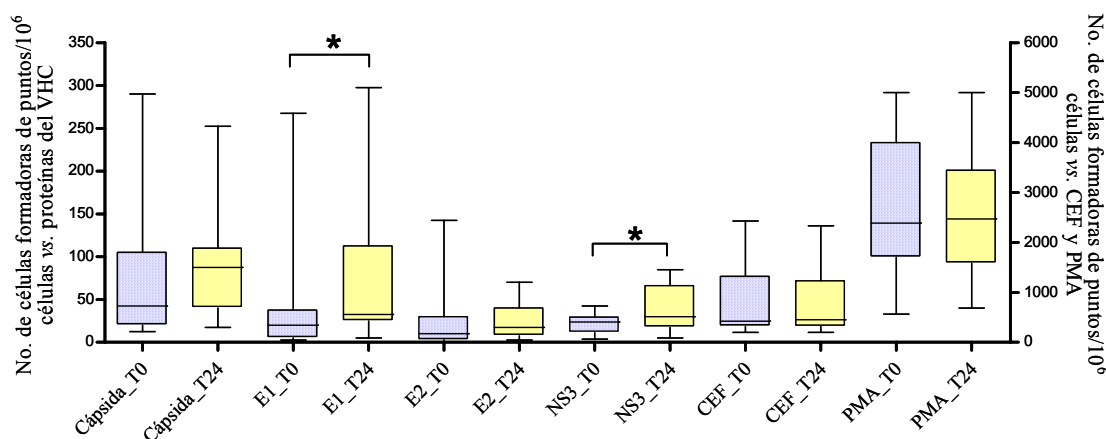


Figura 5. Respuesta de secreción de IFN- γ contra antígenos del VHC por parte de células mononucleares de sangre periférica de los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.

Los resultados se muestran como número de células formadoras de puntos/ 10^6 células. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente. *Indica diferencias estadísticamente significativas entre T0 y T24 ($p=0,02$ y $p=0,04$ vs. E1 y NS3, respectivamente, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

3.1.3 Evaluación de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica CD4⁺ y CD8⁺ específicas contra el VHC

El estudio de la respuesta proliferativa de células T CD4⁺ y CD8⁺ en los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia no mostró cambios significativos en cuanto a la frecuencia de respuestas detectables contra ninguno de los antígenos individuales, a nivel grupal durante el transcurso del estudio (Tabla 5).

Antes de la inmunización el 25% de los individuos mostró respuestas proliferativas de células CD4⁺ contra más de un antígeno estructural, mientras que ninguno de ellos mostró este tipo de respuesta para el caso de las células CD8⁺ (Figura 6). No obstante, después de finalizadas las inmunizaciones, se observó un 28,5% de respuestas proliferativas de células CD8⁺ contra más de un antígeno estructural. Esta diversificación antigénica de la respuesta celular constituyó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al inicio de la terapia (p=0,04; Prueba Exacta de Fisher) (Figura 6).

Tabla 5. Frecuencia de muestras con respuesta celular proliferativa detectable, en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

Respuesta evaluada		T0	T24
CD4 ⁺	cápsida	2/15 (13,3%)	6/15 (40%)
	E1	3/12 (25%)	6/14 (42,8%)
	E2	3/7 (42,8%)	5/12 (46,6%)
	NS3	3/15 (20%)	3/14 (21,4%)
	ConA	14/15 (93,3%)	14/15 (93,3%)
CD8 ⁺	cápsida	3/15 (20%)	5/15 (33,3%)
	E1	2/12 (16,6%)	5/14 (35,7%)
	E2	0/8 (0%)	1/12 (8,3%)
	NS3	4/15 (26,6%)	3/14 (21,4%)
	ConA	13/14 (92,8%)	13/14 (92,8%)

Los datos se exponen como número de muestras con respuesta detectable/ total de muestras evaluadas (% de muestras con respuesta detectable).

La evaluación se realizó mediante ensayos de proliferación por tinción con CFSE.

Abreviaturas: T0, evaluación correspondiente a la semana 0; T24, evaluación correspondiente a la semana 24 del tratamiento.

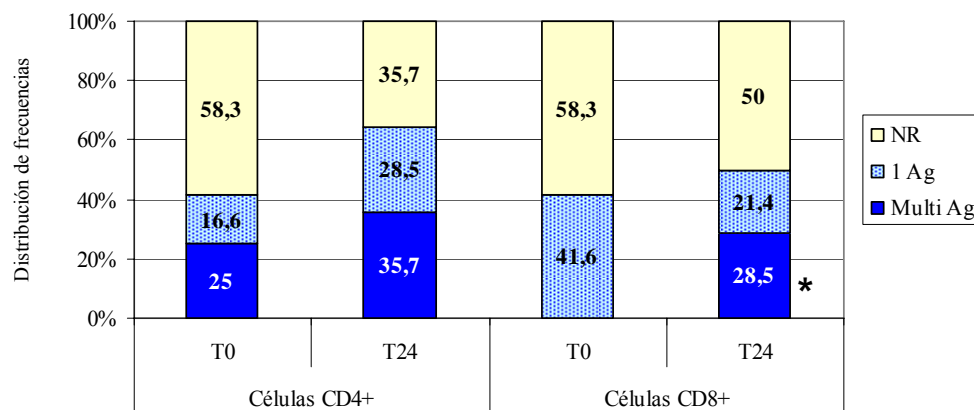


Figura 6. Frecuencia de muestras con respuestas proliferativas detectables de células CD4⁺ y CD8⁺ contra antígenos estructurales del VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.

*Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la respuesta de células CD8⁺ específicas contra más de un antígeno estructural en T0 ($p=0,04$; Prueba Exacta de Fisher).

Abreviaturas: NR, no respuesta contra antígenos estructurales; 1 Ag, respuesta detectable contra al menos un antígeno estructural; Multi Ag, respuesta detectable contra más de un antígeno estructural; T0, evaluación correspondiente a la semana 0; T24, evaluación correspondiente a la semana 24 del tratamiento.

Con respecto a la magnitud de la respuesta proliferativa, en concordancia con lo observado para la frecuencia de respuesta se detectó un incremento significativo en la proliferación de células CD8⁺ contra el antígeno de la cápsida, en la evaluación realizada en T24, en comparación con su tiempo inicial ($p=0,02$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas) (Figura 7 B).

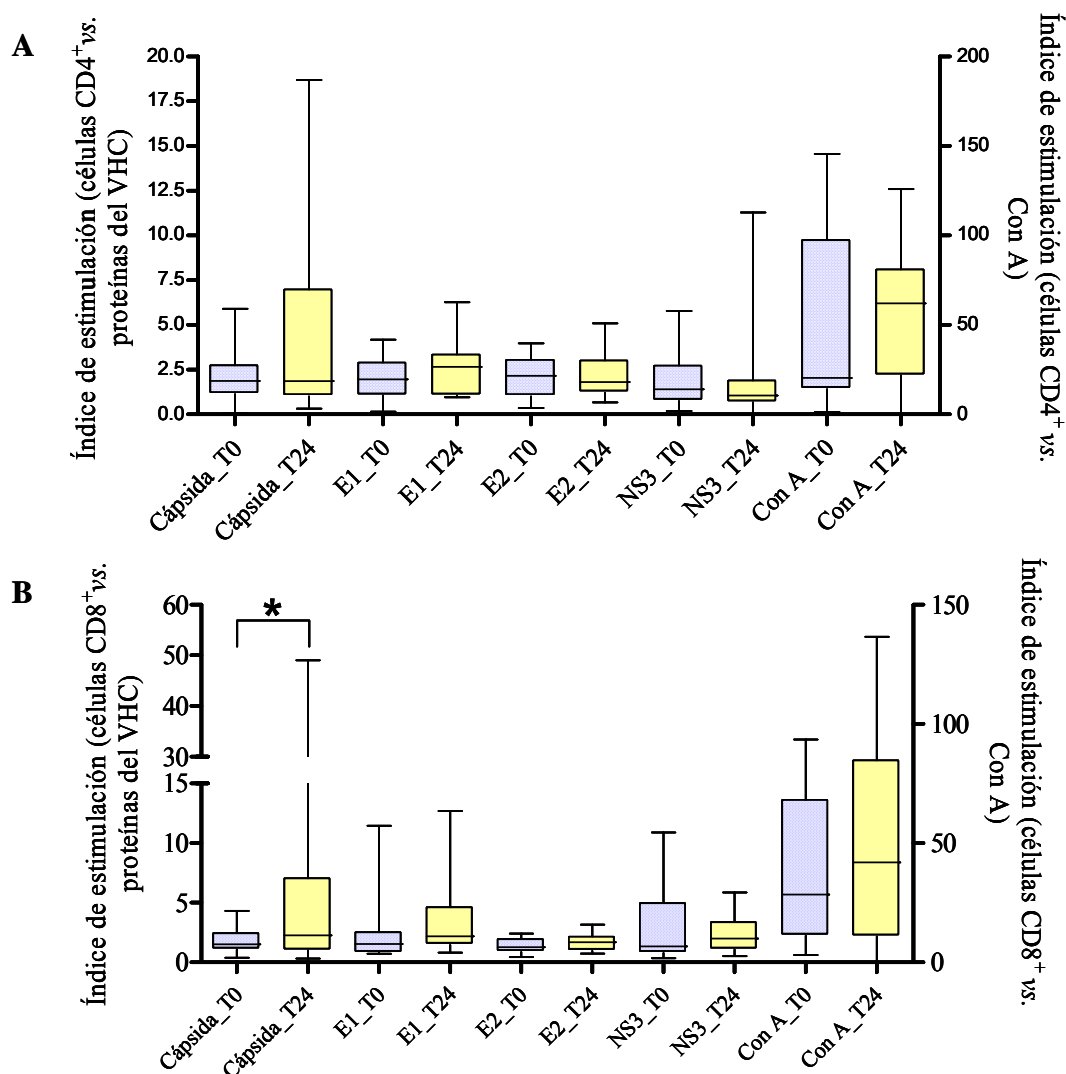


Figura 7. Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica CD4⁺ y CD8⁺ contra antígenos del VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.

Los resultados se muestran como índice de estimulación. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente. *Indica diferencias estadísticamente significativas entre T0 y T24 (p=0,02, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

En aras de profundizar en el análisis de estos cambios significativos detectados a nivel de la respuesta celular proliferativa en los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230, se estudió el comportamiento de este tipo de respuesta en 17 pacientes no respondedores a la terapia antiviral, cuyas muestras de similar período de tiempo sin intervención activa estaban

disponibles como referencia. No se detectaron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de muestras con respuesta de células $CD4^+$ ni $CD8^+$ detectable frente a cada antígeno individual entre ambos momentos evaluados. En general se detectaron respuestas positivas en muy baja frecuencia, tanto para células $CD4^+$ como $CD8^+$, para cada antígeno. En la Figura 8 se observa que ningún paciente mostró respuestas positivas de células $CD4^+$ contra más de un antígeno estructural. Solo dos pacientes (11,8%) mostraron una respuesta positiva de células $CD8^+$ contra los antígenos de la cápsida y E1, simultáneamente en la evaluación de tiempo 0, pero esto no se mantuvo en T24. La Figura 9 muestra que no se detectaron diferencias en cuanto a la magnitud de la respuesta, tanto para las células $CD4^+$ como para las $CD8^+$, para ninguno de los antígenos entre los momentos evaluados.

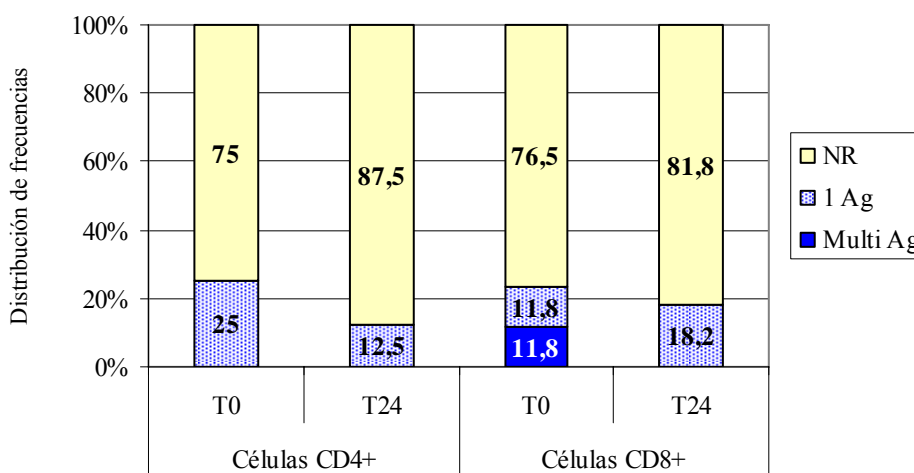


Figura 8. Frecuencia de muestras con respuestas proliferativas detectables de células $CD4^+$ y $CD8^+$ contra antígenos estructurales del VHC en pacientes crónicamente infectados, no respondedores a la terapia con IFN- α -2b y ribavirina, que no se encuentran bajo intervención terapéutica.

Abreviaturas: NR, no respuesta contra antígenos estructurales; 1 Ag, respuesta detectable contra al menos un antígeno estructural; Multi Ag, respuesta detectable contra más de un antígeno estructural; T0, evaluación correspondiente a la semana 0; T24, evaluación realizada 24 semanas después de iniciado el tratamiento.

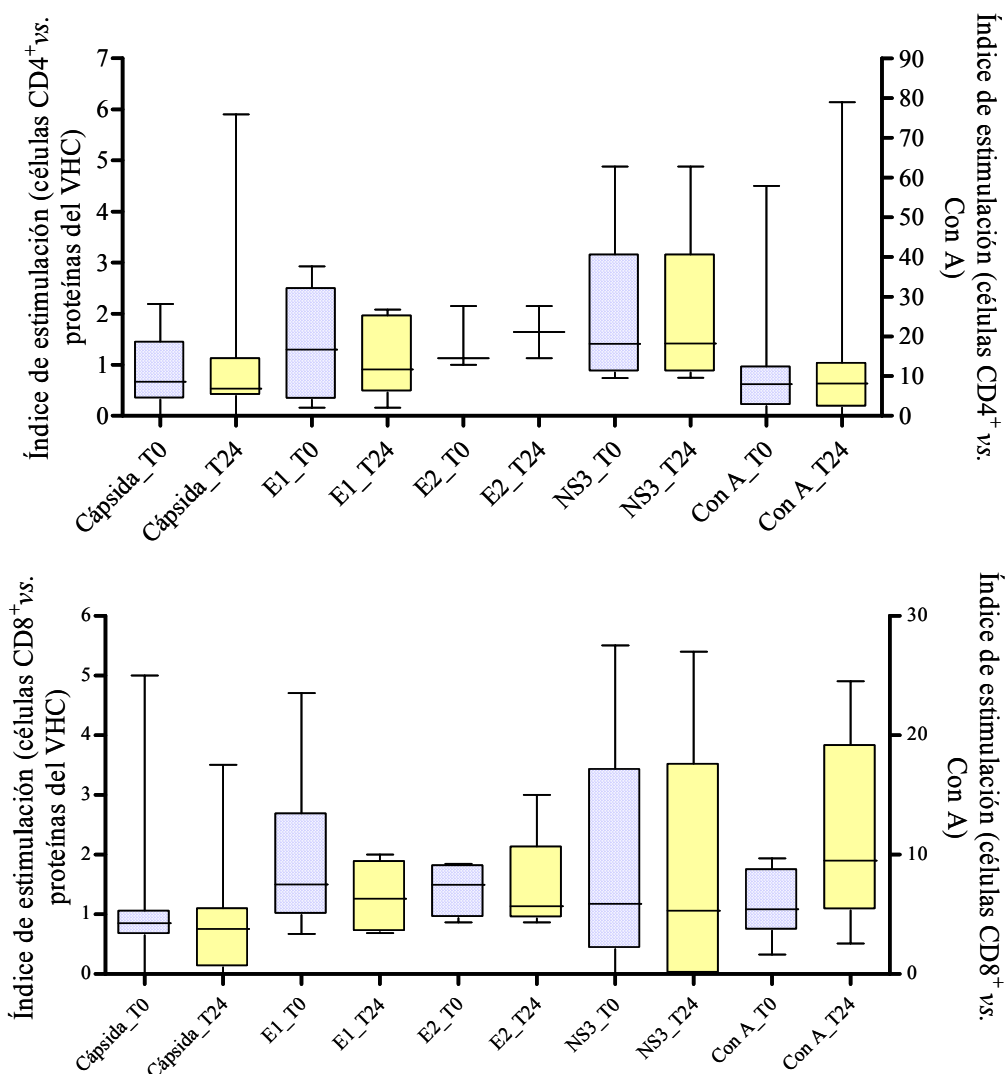


Figura 9. Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica CD4⁺ y CD8⁺ contra antígenos del VHC en pacientes crónicamente infectados, no respondedores a la terapia antiviral, que no se encuentran bajo intervención terapéutica.

Los resultados se muestran como índice de estimulación. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente.

3.1.4 Asociaciones entre la respuesta inmune y las respuestas virológica e histológica en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.

En la Tabla 1 se muestra que en los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia, no se observó reducción significativa de ninguno de los parámetros

histológicos a nivel grupal. No obstante, en el 46,6% de los pacientes de este estudio se observó mejoría o estabilización de la actividad histológica total (necroinflamación más fibrosis) (Anexo 2), a pesar de que todos los pacientes permanecieron con ARN viral detectable al final de la terapia (Tabla 1).

No se evidenciaron asociaciones significativas entre la respuesta inmune humoral ni de secreción de IFN- γ contra antígenos individuales y las variables de histología hepática. Sin embargo, la Figura 10A muestra que en estos pacientes la necroinflamación observada al inicio del estudio correlacionó positivamente con la proliferación de las células CD8⁺ frente a la estimulación con el antígeno NS3 ($\rho=0,55$, $p=0,04$, Prueba de Correlaciones por Rangos de Spearman). Esta asociación no se mantuvo al final del tratamiento. Específicamente se observó que la respuesta proliferativa contra el antígeno NS3 se modificó cualitativamente en siete de los pacientes, haciéndose indetectable en cuatro de ellos, mientras que se indujo *de novo* en tres (Anexo 3). Además, cuantitativamente esta respuesta se modificó en al menos un factor igual a 2 en sentido inverso al comportamiento histológico en dos de los pacientes (Anexo 3). Al final del estudio la necroinflamación correlacionó positivamente con la proliferación de las células CD4⁺ frente a la proteína E1 ($\rho=0,7$, $p=0,01$, Prueba de Correlaciones por Rangos de Spearman; Figura 10B). Esta asociación no se observaba al inicio del estudio. En este caso la respuesta inmune se modificó cualitativamente en nueve de los pacientes, con inducción *de novo* en seis y disminución por debajo del valor de corte en tres (Anexo 3). Además, cuantitativamente esta respuesta se modificó en al menos un factor igual a 2 en el mismo sentido del comportamiento histológico en seis de los pacientes (Anexo 3).

A pesar de estas asociaciones positivas entre la respuesta celular contra antígenos individuales y la necroinflamación, se constató que la estabilización o mejoría (reducción) de la fibrosis se

asoció a la presencia de respuestas celulares (secreción de IFN- γ + linfoproliferación) contra más de un antígeno al final del tratamiento ($p= 0,009$; Análisis de Correspondencias, Anexo 4).

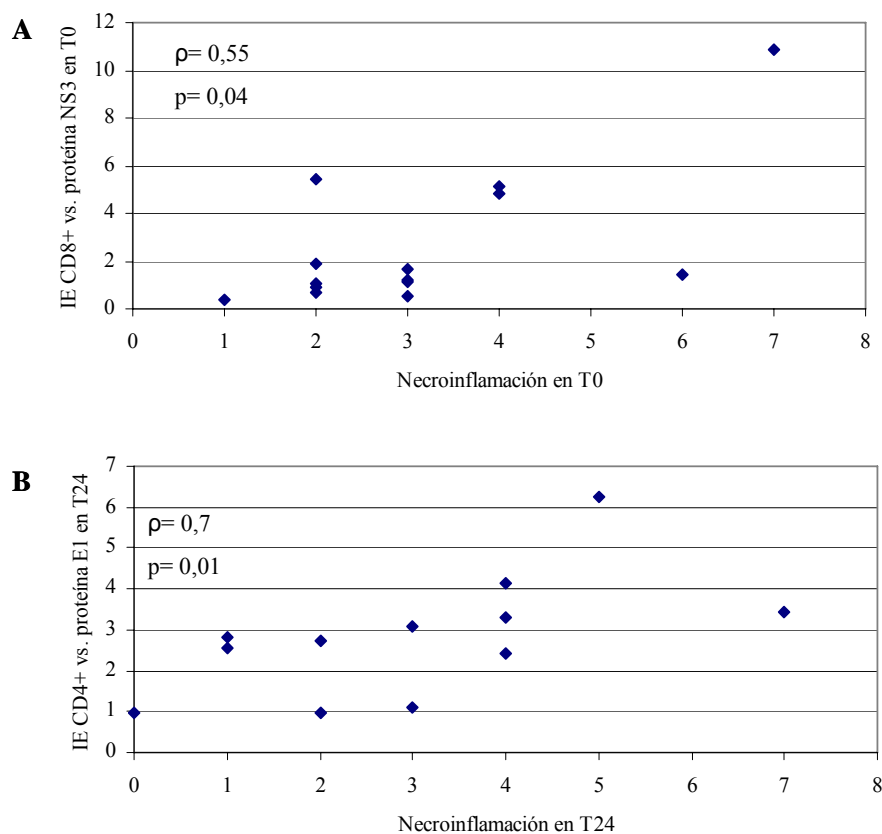


Figura 10. Relación entre la respuesta proliferativa contra antígenos del VHC y la necroinflamación en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.

Se consideran asociaciones estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$, Prueba de Correlaciones por rangos de Spearman. Abreviaturas: IE, índice de estimulación, T0, evaluación realizada en semana 0; T24, evaluación realizada en semana 24.

Estos resultados indican que la preparación vacunal CIGB-230 resulta promisorio como estrategia terapéutica contra la infección crónica por el VHC, en pacientes no respondedores a la terapia con IFN- α -2b y ribavirina, ya que es capaz de contribuir a la diversificación antigénica de la respuesta inmune mediada por células, lo cual estuvo relacionado con la mejoría en la histología hepática.

3.2 Respuesta inmune detectada en muestras de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina y su asociación con las respuestas virológica e histológica

3.2.1 Evaluación de la presencia de anticuerpos específicos contra el VHC

En los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina se evaluó la respuesta de los anticuerpos de los isotipos IgM, IgA e IgG específicos contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3. Las evaluaciones se realizaron con muestras de suero tomadas al inicio del estudio (T0) y un mes después de finalizado el mismo (T48). Los porcentajes de seroconversión contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3 en los diferentes grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 6. A lo largo del estudio, las respuestas de IgG e IgM fueron las más frecuentemente detectadas, con más del 80% de los pacientes de todos los grupos con respuesta detectable contra los antígenos de la cápsida y NS3. En el caso de la proteína E2, también fue mayormente reconocida por anticuerpos IgG. Además, frecuentemente se detectaron respuestas de IgA contra el antígeno de la cápsida (Tabla 6). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de respuestas detectables contra ninguno de los antígenos evaluados, entre los diferentes grupos de pacientes, en ninguno de los momentos de evaluación.

Tabla 6. Porcientos de respuestas de anticuerpos detectables contra antígenos del VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina

		Grupo control		Grupo S6		Grupo S9		Grupo T6		Grupo T9	
		T0	T48	T0	T48	T0	T48	T0	T48	T0	T48
Cápsida	IgM	96,1	96,1	100	100	100	100	100	100	100	100
	IgA	84,6	73,1	86,6	66,6	86,6	86,6	92,8	85,7	100	91,6
	IgG	96,1	96,1	100	100	100	100	100	100	91,6	91,6
E2	IgM	34,6	19,2	33,3	26,6	13,3	13,3	57,1	35,7	25	33,3
	IgA	15,3	11,5	6,6	6,6	6,6	0	14,2	0	0	0
	IgG	61,5	80,7	46,4	66,6	86,6	86,6	71,4	71,4	66,6	83,3
NS3	IgM	92,3	84,6	100	100	93,3	86,6	100	92,8	100	91,6
	IgA	76,9	50*	66,6	60	66,6	26,6*	57,1	42,8	83,3	75
	IgG	96,1	96,1	100	100	100	100	100	100	100	100

Los resultados se muestran como porcentaje de respuestas detectables contra cada antígeno individual.

* Indica diferencias estadísticamente significativas con la respuesta detectada en el mismo grupo en T0 ($p < 0,05$, Prueba Chi cuadrado de McNemar)

Con respecto a los títulos de anticuerpos, se observaron reducciones estadísticamente significativas en varios de los grupos, para las tres clases, contra el antígeno de la cápsida y NS3 (Figura 11-13). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los títulos de anticuerpos entre los diferentes grupos, en ninguno de los dos momentos evaluados. Sin embargo, la administración tardía de la preparación vacunal CIGB-230 (grupos T6 y T9) fue capaz de prevenir la caída de la respuesta de IgM contra los antígenos de la cápsida y NS3, observada en el grupo control (Figura 11) y de forma similar, el grupo S9 no mostró reducción en la respuesta de IgG específica contra el antígeno de la cápsida, a diferencia del grupo control (Figura 12).

En aras de evaluar la funcionalidad de los anticuerpos detectados, se realizó el análisis de la respuesta de anticuerpos neutralizantes, mediante experimentos de inhibición del número de UFF de partículas de VHCcc. No se detectaron diferencias con respecto al porcentaje de individuos con respuesta positiva, entre los grupos, o en cada grupo entre ambos momentos de evaluación (Tabla 7). En cuanto a la magnitud, en el grupo T6 se observó un incremento en la respuesta de anticuerpos neutralizantes ($p = 0,04$; Prueba t de Student para muestras pareadas), que no fue observado en el grupo control (Figura 14).

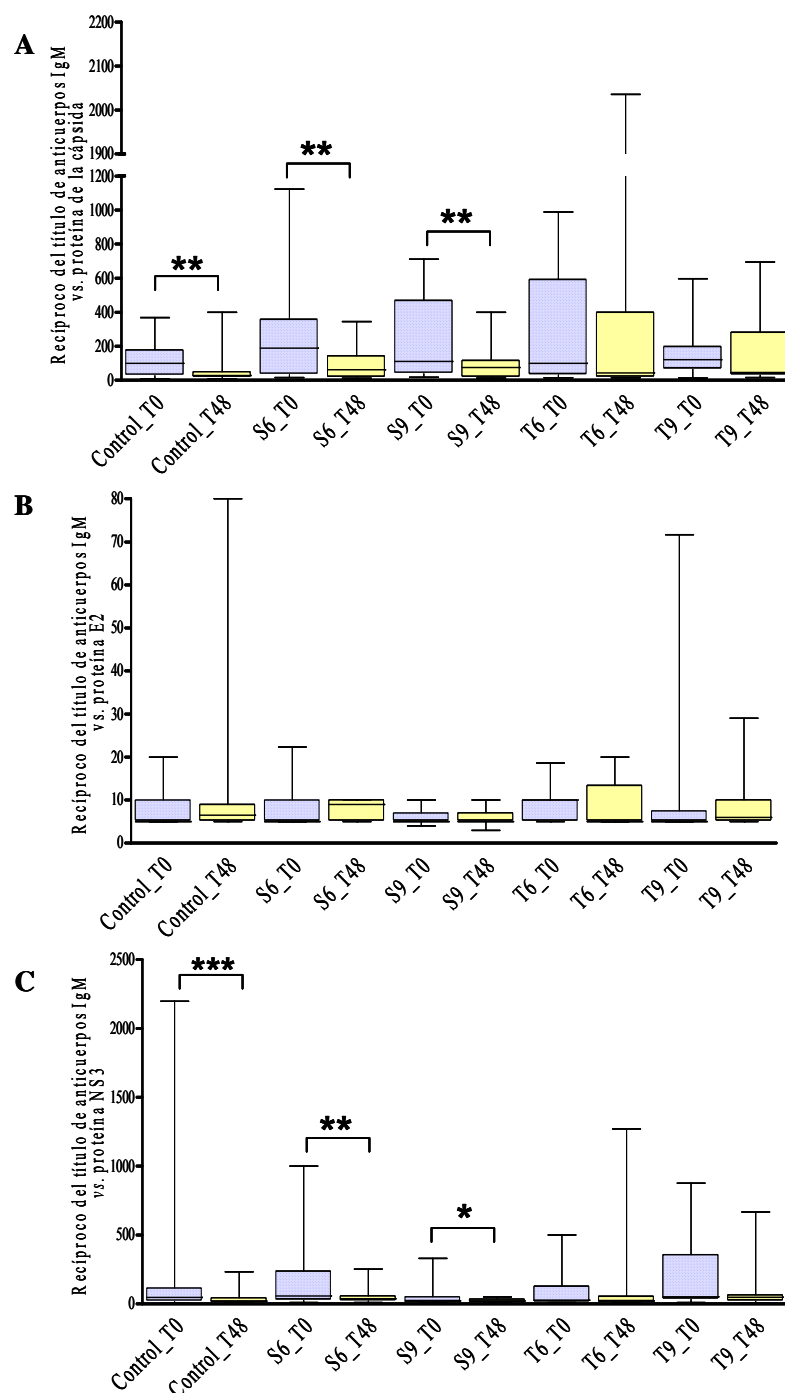


Figura 11. Respuesta humoral de la clase IgM contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3 en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina. Los resultados se muestran como el recíproco del título de anticuerpos. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en un mismo subgrupo, entre ambos tiempos de evaluación (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

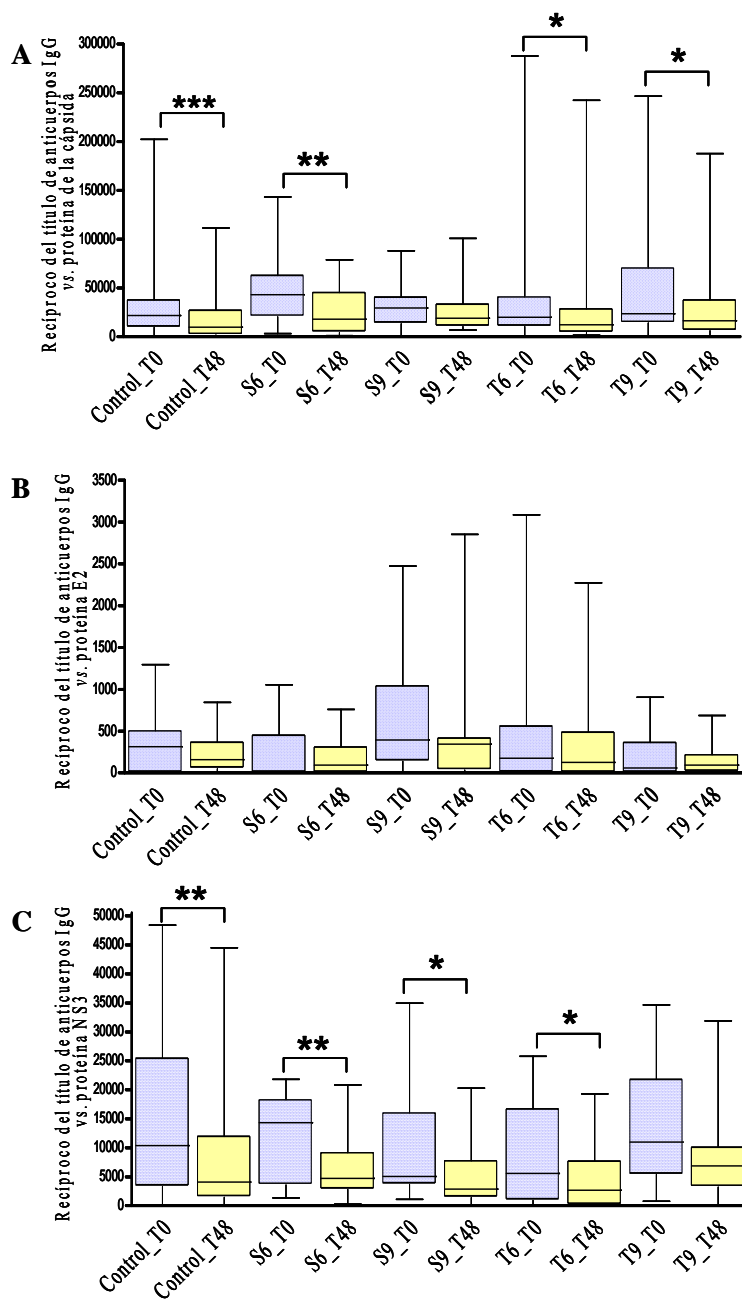


Figura 12. Respuesta humoral de la clase IgG contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3 en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina.

Los resultados se muestran como el recíproco del título de anticuerpos. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en un mismo subgrupo, entre ambos tiempos de evaluación (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Prueba de los rangos de Wilcoxon).

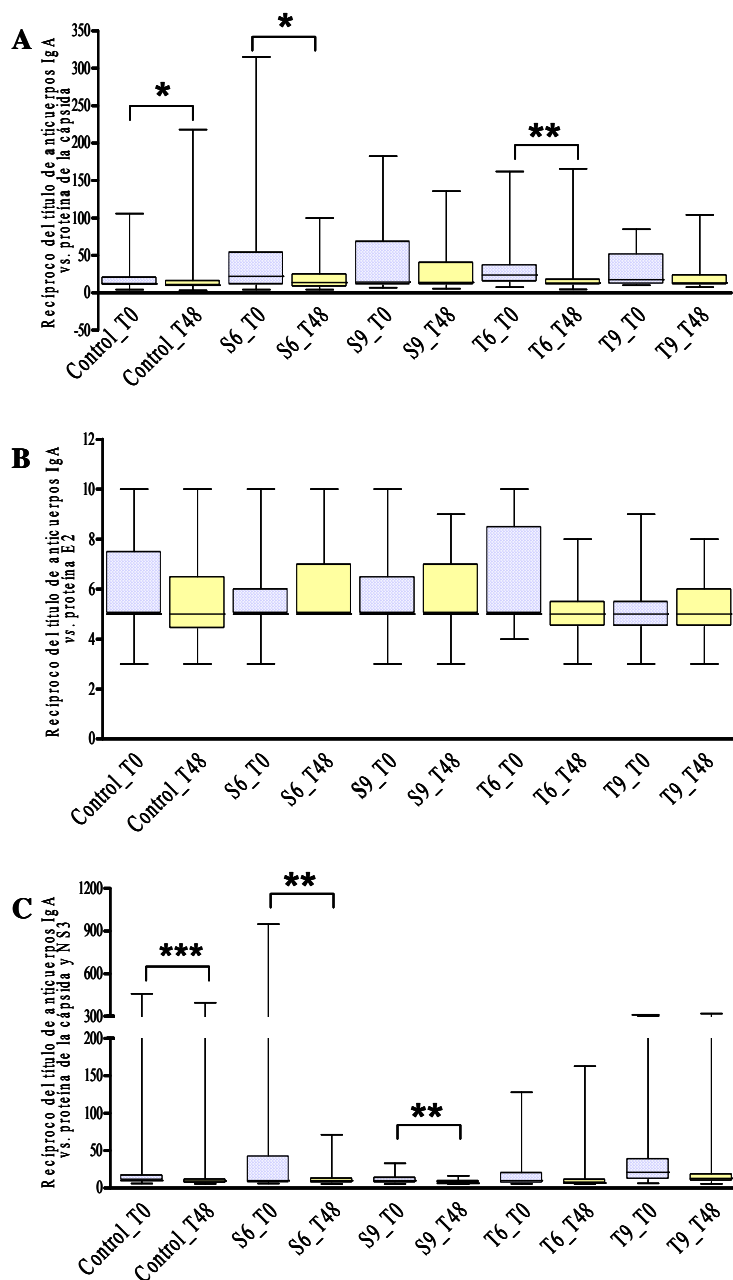


Figura 13. Respuesta humoral de la clase IgA contra los antígenos de la cápsida, E2 y NS3 en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina.

Los resultados se muestran como el recíproco del título de anticuerpos. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en un mismo subgrupo, entre ambos tiempos de evaluación (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

Tabla 7. Porcientos de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina con respuestas de anticuerpos neutralizantes detectables

Respuesta detectable (%)	Grupo				
	control	Grupo S6	Grupo S9	Grupo T6	Grupo T9
T0	46,2	66,7	35,7	23,1	41,7
T48	46,7	58,3	14,3	30,8	41,7

Abreviaturas: T0, evaluación realizada antes de iniciar el tratamiento; T48, evaluación realizada al final del tratamiento

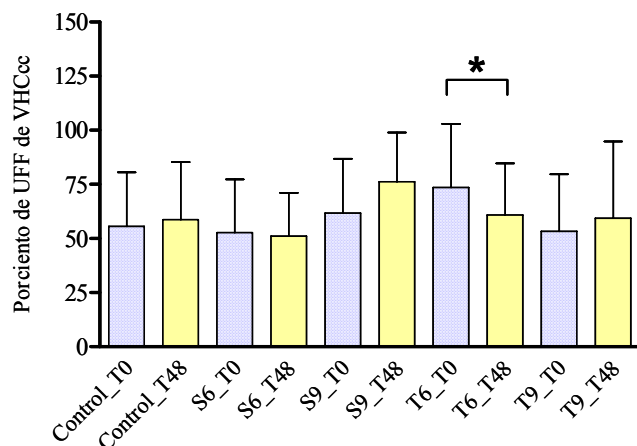


Figura 14. Actividad neutralizante de anticuerpos purificados de suero de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina.

Los resultados se muestran como porcentaje de unidades formadoras de focos (UFF) de las VHCcc= (UFF en presencia de anticuerpos/UFF en ausencia de anticuerpos) x 100. La respuesta se considera negativa cuando la muestra, evaluada en el rango de 1–50 μ g/mL, no es capaz de inhibir al menos el 50% del número de UFF de las VHCcc. Las barras representan la media de los valores de cada grupo y las barras de error, la desviación estándar de la media. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas en un mismo subgrupo, entre ambos tiempos de evaluación (*p=0,04; Prueba t de Student para muestras pareadas).

3.2.2 Evaluación de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica específicas contra el VHC

Según se esperaba, la respuesta linfoproliferativa fue escasamente detectada en los pacientes crónicos antes de iniciar el tratamiento (Tabla 8). Se observó que después de finalizado el mismo en el grupo control no se detectaron respuestas positivas contra el antígeno de la cápsida, ni NS3 y en los grupos S9, T6 y T9 no se detectaron respuestas contra las proteínas E2 ni NS3. La comparación entre los grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de respuestas detectables contra antígenos individuales en ninguno de los momentos de evaluación. No obstante, solo en los grupos inmunizados con la preparación vacunal todas las respuestas detectadas contra los antígenos estructurales del VHC fueron generadas *de novo* después del tratamiento, mientras que en el grupo control se

evidenció una ausencia completa de respuestas contra el antígeno de la cápsida (Figura 15). De hecho, se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos inmunizados desde el inicio de la terapia (S6 + S9) y el control, con relación a la frecuencia de respuestas positivas contra este antígeno en T48 ($p=0,04$, Prueba Exacta de Fisher) (Figura 15). Adicionalmente se observó que en el grupo S6, uno de los individuos respondedores *de novo* contra el antígeno de la cápsida, fue también respondedor *de novo* contra E2 y este paciente, aunque respondió virológicamente de forma tardía, alcanzó la RVS.

Tabla 8: Frecuencia de respuesta proliferativa específica contra el VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina

Antígeno		Grupo control		Grupo S6		Grupo S9		Grupo T6		Grupo T9	
		T0	T48	T0	T48	T0	T48	T0	T48	T0	T48
Cápsida	Muestras evaluadas	25	25	14	13	14	14	13	14	12	11
	Positivas (%)	4	0	7,1	15,4	21,4	14,3	38,5	7,1	8,3	18,2
E2	Muestras evaluadas	25	23	13	9	13	10	13	10	12	9
	Positivas (%)	16	8,7	7,7	11,1	23,1	0	23,1	0	16,6	0
NS3	Muestras evaluadas	24	21	13	9	13	10	13	10	12	8
	Positivas (%)	8,3	0	7,7	11,1	7,7	0	30,8	0	8,3	0

Los datos de porcentaje de muestras positivas se presentan como porcentaje del total de muestras evaluadas.

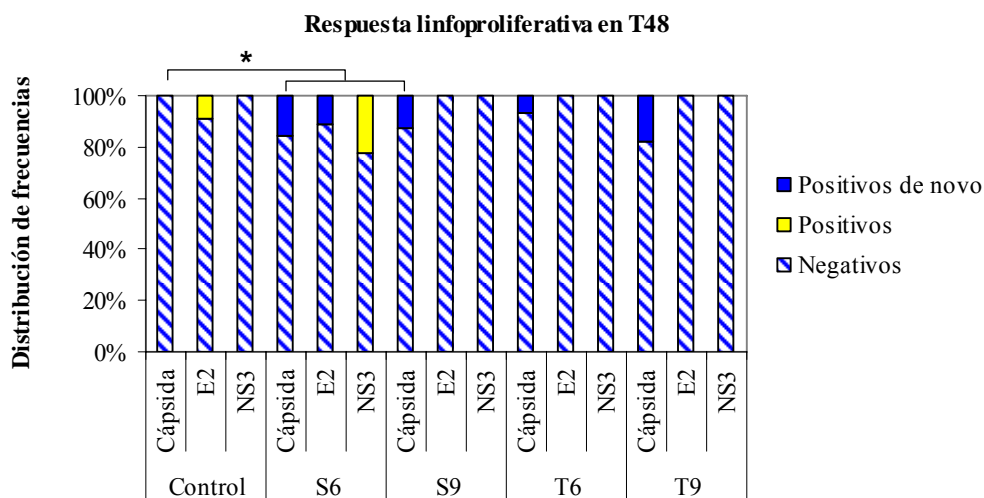


Figura 15. Frecuencia de respuestas proliferativas en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina en T48.

* Indica diferencias estadísticamente significativas (grupos S6 + S9) con respecto al grupo control ($p=0,04$; Prueba Exacta de Fisher).

En la Figura 16 se observa que en varios de los grupos la respuesta proliferativa se redujo, pero esto solo ocurrió de forma significativa en los grupos S9 contra la proteína E2 y T6 contra la proteína NS3 ($p= 0,04$ y $p= 0,03$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas). Además, en concordancia con lo observado para el caso de la frecuencia de respuesta contra el antígeno de la cápsida, en los grupos inmunizados desde el inicio de la terapia (S6 + S9) la magnitud de esta respuesta en T48 fue significativamente superior a la del grupo control (1,04 vs. 0,79; $p=0,018$; Prueba U de Mann-Whitney).

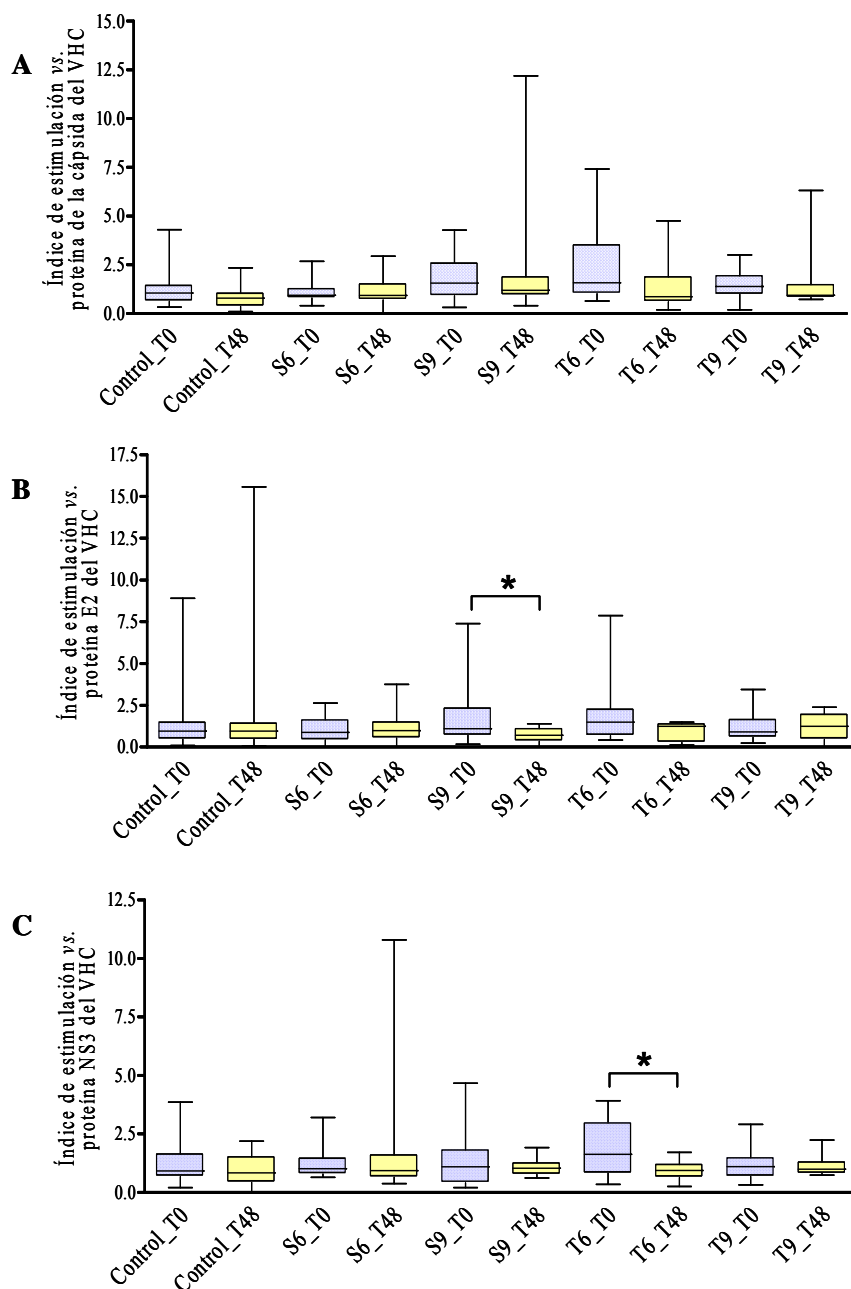


Figura 16. Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica contra antígenos del VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina. Los resultados se muestran como índice de estimulación. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en un mismo subgrupo, entre ambos tiempos de evaluación (* $p < 0,05$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

3.2.3 Evaluación de la respuesta de secreción IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica específicas contra el VHC

De acuerdo con la disponibilidad de células, se evaluó también la secreción de IFN- γ contra los antígenos del VHC. Según lo esperado en los pacientes crónicamente infectados, desde T0

la respuesta se detectó en baja frecuencia (Tabla 9). En la mayoría de los grupos se observó reducción de la respuesta en T48 desde el punto de vista del número de respuestas detectables (Tabla 9). Sin embargo, en ningún grupo los cambios en la frecuencia de respuestas detectables alcanzaron la significación estadística, tampoco se encontraron diferencias entre los grupos, en cuanto a la frecuencia de respuestas. Entre los diferentes grupos no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la magnitud de la respuesta en ninguno de los dos momentos evaluados. Solo se observaron disminuciones estadísticamente significativas en el número de células formadoras de puntos contra los antígenos evaluados entre T0 y T48 en el grupo control ($p < 0,05$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas) (Figura 17). Al unificar todos los individuos que recibieron la triterapia que incluyó la preparación vacunal CIGB-230, tampoco se detectó una disminución estadísticamente significativa en la secreción de IFN- γ contra los antígenos de la cápsida y NS3 en estos pacientes (Anexo 5).

Tabla 9. Frecuencia de respuesta de secreción de IFN- γ específica contra el VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina

Antígeno		Grupo control		Grupo S6		Grupo S9		Grupo T6		Grupo T9	
		T0	T48	T0	T48	T0	T48	T0	T48	T0	T48
Cápsida	Muestras evaluadas	24	22	13	9	11	8	12	11	9	7
	Positivas (%)	16,7	9,1	23,1	0	27,3	12,5	8,3	27,3	33,3	0
E2	Muestras evaluadas	15	16	10	7	5	4	6	5	2	4
	Positivas (%)	20	12,5	10	0	0	0	0	20	50	0
NS3	Muestras evaluadas	13	12	9	4	1	4	7	3	4	3
	Positivas (%)	15,4	8,3	11,1	0	100	0	0	0	25	0

Los datos de número de muestras positivas se presentan como porcentaje del total de muestras evaluadas.

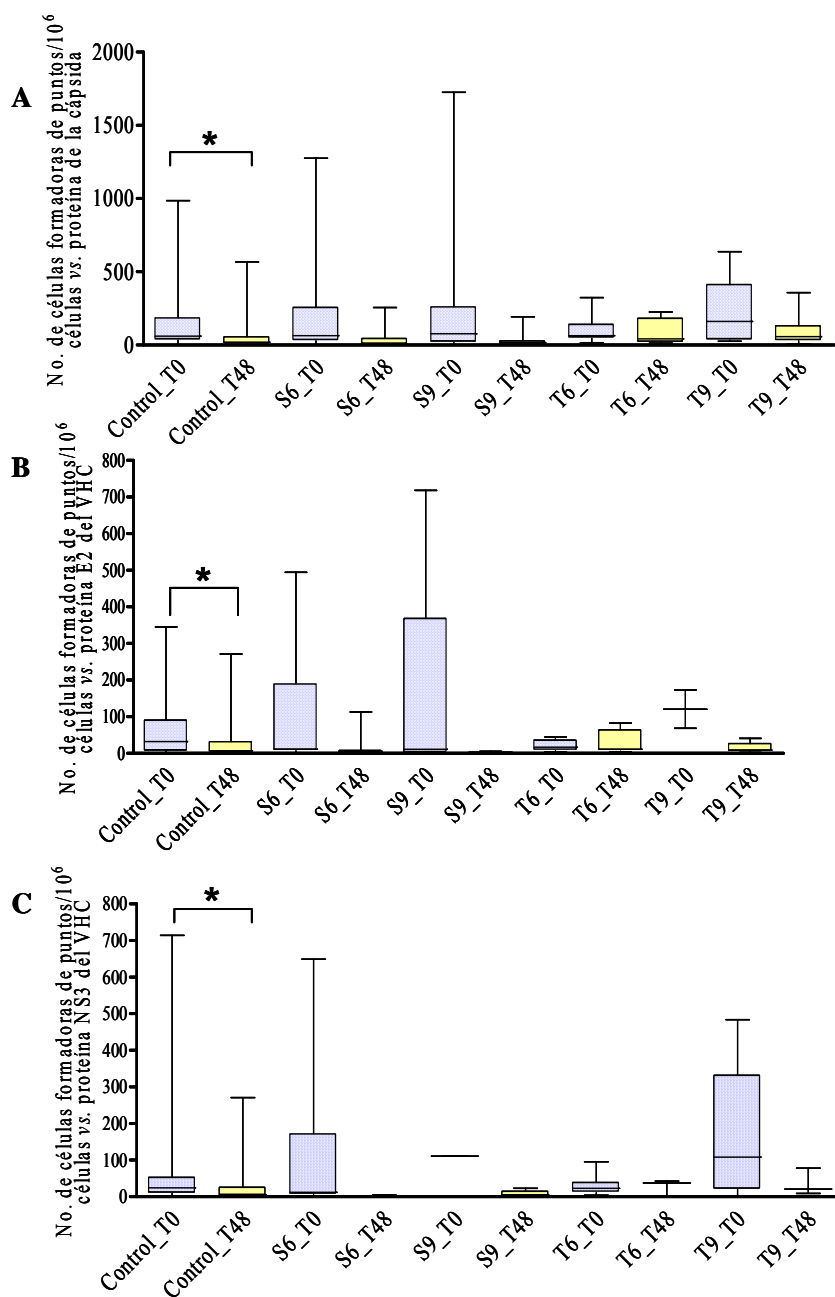


Figura 17. Respuesta de secreción de IFN- γ contra antígenos del VHC por parte de células mononucleares de sangre periférica de los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina.

Los resultados se muestran como número de células formadoras de puntos/10⁶ células. En el gráfico las cajas se extienden desde el percentil 25 al 75 y la línea interior representa la mediana. Los brazos se extienden hasta los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en un mismo subgrupo, entre ambos tiempos de evaluación (* $p < 0,05$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

Se destaca el hecho que en T48, el grupo T6 mostró una mayor frecuencia de respuestas de secreción IFN- γ *de novo* contra el antígeno de la cápsida, que el grupo control ($p= 0,03$; Prueba Exacta de Fisher) (Figura 18).

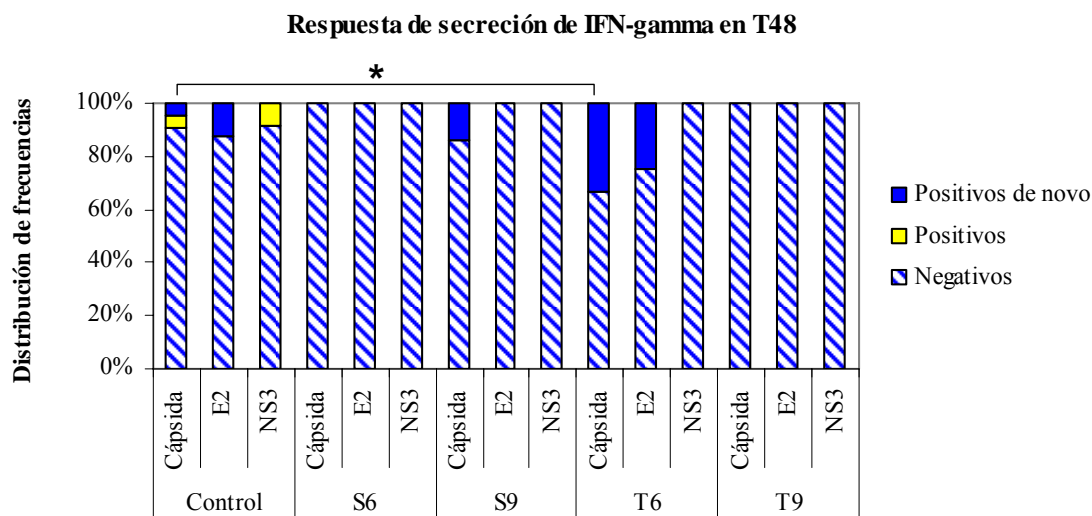


Figura 18. Frecuencia de respuestas de secreción de IFN- γ en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina en T48.

* Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la respuesta inducida *de novo* ($p= 0,03$, Prueba Exacta de Fisher).

Estos cambios en la respuesta mediada por células, tanto la linfoproliferación como la secreción de IFN- γ contra antígenos virales, ocurrieron en el contexto de una significativa leucopenia inducida por el tratamiento con IFN- α -2b y ribavirina, la cual fue detectable desde la semana 12 de la terapia en todos los grupos del estudio ($p<0,05$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas; Tabla 10). Con respecto a los conteos de linfocitos, solo el grupo control mostró una disminución significativa en T48 ($p=0,004$; Prueba t de Student para muestras pareadas; Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de los conteos de leucocitos y linfocitos en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina

		Grupo control	Grupo S6	Grupo S9	Grupo T6	Grupo T9
Número total de pacientes		30	16	16	15	15
Conteos de leucocitos en semana 0	Mediana \pm RQ (Mín; Máx)	6,4 \pm 3,0 (3,5; 12,1)	7,3 \pm 2,8 (4,2; 9,0)	7,5 \pm 3,0 (3,8; 12,2)	6,1 \pm 2,5 (4,0; 11,1)	6,8 \pm 2,0 (2,0; 10,5)
Conteos de leucocitos en semana 12	Mediana \pm RQ (Mín; Máx)	4,3 \pm 1,9 (2,3; 9,0)	4,1 \pm 2,4 (2,3; 8,4)	5,1 \pm 3,2 (3,1; 7,3)	3,5 \pm 1,8 (2,7; 5,1)	4,4 \pm 1,3 (3,4; 6,8)
Conteos de leucocitos en semana 48	Mediana \pm RQ (Mín; Máx)	3,9 \pm 1,8 (2,5; 7,6)	3,3 \pm 0,9 (1,6; 6,7)	4,2 \pm 2,4 (2,3; 7,6)	3,2 \pm 1,4 (2,5; 6,6)	5,2 \pm 1,3 (2,9; 5,8)
Valor de p [†]		<0,001	0,001	<0,001	0,001	0,013
Valor de p [§]		<0,01	0,001	0,001	0,001	0,023
Conteos de linfocitos en semana 0	Media \pm DE (Mín; Máx)	37,8 \pm 8,6 (22,8; 8,8)	35,7 \pm 7,6 (21,8; 2,5)	33,7 \pm 7,5 (19,8; 53,8)	36,7 \pm 10,7 (18,3; 51,4)	37,6 \pm 8,7 (25,4; 50,7)
Conteos de linfocitos en semana 12	Media \pm DE (Mín; Máx)	38,2 \pm 9,7 (20,3; 52,9)	34,6 \pm 6,9 (22,0; 4,1)	30,5 \pm 8,0 (15,8; 47,4)	36,1 \pm 9,5 (22,5; 55,2)	36,5 \pm 7,5 (25,3; 52,0)
Conteos de linfocitos en semana 48	Media \pm DE (Mín; Máx)	32,0 \pm 8,9 (13,3; 57,8)	37,1 \pm 8,3 (19,5; 0,9)	31,2 \pm 6,9 (21,3; 45,0)	34,9 \pm 11,3 (19,8; 54,0)	33,1 \pm 6,2 (23,5; 42,3)
Valor de p [†]		0,676	0,574	0,183	0,351	0,614
Valor de p [§]		0,004	0,581	0,784	0,400	0,248

[†] Semana 12 vs. semana 0 en un mismo grupo

[§] Semana 48 vs. semana 0 en un mismo grupo

Las comparaciones se realizaron con la Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas en el caso de los conteos de leucocitos y la Prueba t de Student para muestras pareadas en el caso de los conteos de linfocitos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Abreviaturas: RQ, rango intercuartílico; DE, desviación estándar, Mín, mínimo; Máx, máximo

3.2.4 Respuesta inmune específica contra el VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina, en dependencia de la respuesta virológica al tratamiento

En la Tabla 2 se muestran los datos de la respuesta virológica de los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina. Se observa que en todos los grupos de tratamiento, excepto en el grupo T9, más del 46% de los pacientes

alcanzaron la RVTc y solo en el grupo T6 no se detectó disminución del porcentaje de pacientes con ARN viral indetectable al final del seguimiento después del tratamiento (semana 72), con respecto a la semana 12.

Específicamente en el grupo T6 se encontró una asociación positiva cercana a la significación estadística ($p=0,067$, Análisis de correspondencias) (Anexo 6) entre el incremento en un factor de al menos 1,5 en la capacidad neutralizante de las inmunoglobulinas y la RVS. Además, se pudo comprobar que en este grupo de individuos, el incremento en la actividad de los anticuerpos neutralizantes fue exclusiva de los pacientes que lograron alcanzar la RVS (% de infección de VHCcc en T0: 79,2 vs. T48: 55,5; $p=0,02$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas), a diferencia de los que no lograron eliminar el virus (% de infección de VHCcc en T0: 69,9 vs. T48: 69,9; $p=0,99$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas). Además, en este mismo grupo se detectó una asociación positiva, cercana a la significación estadística ($p=0,06$; Análisis de Correspondencias; Anexo 7) entre el incremento en la secreción de IFN- γ contra el antígeno de la cápsida en un factor de al menos 1,5 y la capacidad para alcanzar la RVS. Adicionalmente, al tener en cuenta de conjunto los pacientes que en el grupo T6 mostraron incremento en la respuesta de anticuerpos neutralizantes y/o de secreción de IFN- γ , se detectó una asociación estadísticamente significativa entre la estimulación de dichos mecanismos efectoros y la RVS ($p=0,026$; Análisis de correspondencias; Anexo 8), dado que ninguno de los pacientes con ARN viral detectable en la semana 72 mostró incrementos en estas respuestas.

Con respecto a la respuesta proliferativa contra el antígeno de la cápsida, en los pacientes con RVS de los grupos inmunizados desde el inicio de la terapia (S6 + S9) la magnitud de esta respuesta fue significativamente superior a la inducida en los pacientes con RVS del grupo control (1,13 vs. 0,65; $p=0,008$; Prueba U de Mann-Whitney). Por otra parte, el análisis de

correspondencias indicó que en el grupo control, la respuesta proliferativa contra la proteína E2, en ambos momentos de evaluación estuvo asociada a la presencia de ARN viral en sangre en T48 ($p < 0,05$, Análisis de correspondencias) (Anexos 9 y 10).

También se investigó acerca de las posibles diferencias en la respuesta inmune específica contra el VHC, de acuerdo a la respuesta virológica al tratamiento (respondedor virológico: con ARN indetectable; no respondedor virológico: con ARN detectable) en pacientes inmunizados y no inmunizados con la preparación vacunal CIGB-230 (grupo control). Solo los pacientes inmunizados que mostraron reaparición de la viremia después de haber alcanzado niveles indetectables en T48 mostraron una disminución significativa de la respuesta de IgG contra la proteína E2 (Tabla 11; $p = 0,04$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

En cuanto a la respuesta de secreción de IFN- γ , se detectó una reducción estadísticamente significativa en los individuos no respondedores virológicos en la semana 72, tanto inmunizados, como del grupo control (Tabla 11; $p < 0,05$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas). En el caso de la respuesta proliferativa, específicamente contra el antígeno E2, en el grupo control se observó que los no respondedores virológicos mostraron antes de iniciar el estudio una respuesta significativamente mayor que los respondedores (1,4 vs. 0,8; $p = 0,05$, Prueba U de Mann-Whitney). Por su parte, en los individuos inmunizados con la preparación vacunal, que alcanzaron la RVS, se observó una tendencia hacia la disminución de esta respuesta (Tabla 11; $p = 0,05$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas). Esta tendencia no se detectó en los pacientes no respondedores.

Tabla 11. Respuesta inmune en pacientes crónicamente infectados, bajo la terapia combinada con IFN- α -2b y ribavirina e inmunizados con la preparación vacunal, de acuerdo a la respuesta virológica al tratamiento

Inmunizados		Con reaparición de viremia			Con ARN (-) en T72			Con ARN (+) en T72		
		T0	T48	Valor de p	T0	T48	Valor de p	T0	T48	Valor de p
IgG	Cápsida	44396,0	22209,0	0,002	32193,3	15486,7	0,003	22920,0	15131,0	0,004
	E2	791,6	401,7	0,04	138,8	103,1	0,10	254,3	138,7	0,47
	NS3	18022,0	6659,0	0,002	8013,1	2900,1	0,002	7264,0	5555,0	0,0002
IFN- γ	Cápsida	217,8	39,0	0,11	68,8	18,3	0,20	76,3	43,6	0,04
	E2	66,8	30,7	0,09	22,5	5,2	0,75	10,8	5,8	0,38
	NS3	31,0	13,9	0,06	15,0	0	-	26,3	15,2	0,13
IE	Cápsida	1,5	1,7	0,85	1,3	1,0	0,04	1,4	1,0	0,74
	E2	2,3	1,1	0,16	1,0	0,8	0,05	0,9	1,2	0,22
	NS3	1,8	1,2	0,46	1,2	1,1	0,76	1,1	0,9	0,09
Grupo control		Con reaparición de viremia			Con ARN (-) en T72			Con ARN (+) en T72		
		T0	T48	Valor de p	T0	T48	Valor de p	T0	T48	Valor de p
IgG	Cápsida	17404,2	7565,5	-	28066,9	12800,0	0,002	14779,0	8873,0	0,0005
	E2	401,3	292,6	-	85,7	185,0	0,97	339,4	155,0	0,10
	NS3	24272,3	4448,0	-	5150,3	2856,7	0,003	15004,0	8578,0	0,11
IFN- γ	Cápsida	60,8	11,7	-	80,4	35,0	0,11	60,4	14,0	0,02
	E2	61,3	2,6	-	36,2	7,5	0,30	32,5	2,5	0,13
	NS3	14,2	4,2	-	47,7	13,0	0,25	13,0	4,2	0,25
IE	Cápsida	0,8	1,3	-	1,0	0,7	0,11	1,1	1,0	0,30
	E2	0,9	1,4	-	0,8*	0,7	0,85	1,4*	1,4	0,76
	NS3	0,8	1,1	-	0,8	0,7	0,73	1,2	1,1	0,70

Abreviaturas: IE, índice de estimulación; T, tiempo de evaluación en semanas; ARN (-), ARN indetectable; ARN (+), ARN detectable

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. No se realizaron las comparaciones pareadas T0 vs. T48 en los individuos con reaparición de viremia del grupo control, debido a que eran solo 4 casos.

* Muestran diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,02$, Prueba U de Mann-Whitney)

3.2.5 Asociaciones entre la respuesta inmune y la histología hepática en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina

En la Tabla 2 se muestran los datos de las evaluaciones histológicas realizadas a los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina. No se detectaron cambios estadísticamente significativos en cuanto a la fibrosis en ninguno de los grupos. Sin embargo, tanto en el grupo control, como en los grupos en que la administración de la preparación vacunal se inició simultáneamente con la terapia (S6 y S9) se apreció una

disminución significativa de la necroinflamación ($p < 0,05$, Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

No se encontraron asociaciones significativas entre la repuesta humoral, de anticuerpos neutralizantes o de secreción de IFN- γ y las variables de la histología hepática en estos pacientes. Tampoco se encontraron correlaciones significativas entre la respuesta inmune detectable después de la terapia y la histología hepática en el grupo control ni en los individuos inmunizados con la preparación vacunal, atendiendo a la respuesta virológica.

El análisis de las asociaciones entre la respuesta proliferativa y las variables histológicas mostró que en T0 la proliferación contra la proteína E2 correlacionó positivamente con la fibrosis ($\rho = 0,24$, $p = 0,03$; Prueba de Correlaciones por Rangos de Spearman; Figura 19). Esta asociación no se observó al final del tratamiento. En este caso la respuesta inmune se modificó cualitativamente en once de los pacientes, con inducción *de novo* en uno y disminución por debajo del valor de corte en diez (Anexo 11). Además, cuantitativamente esta respuesta se modificó en al menos un factor igual a 2 en sentido inverso del comportamiento histológico en 16 de los pacientes (Anexo 11).

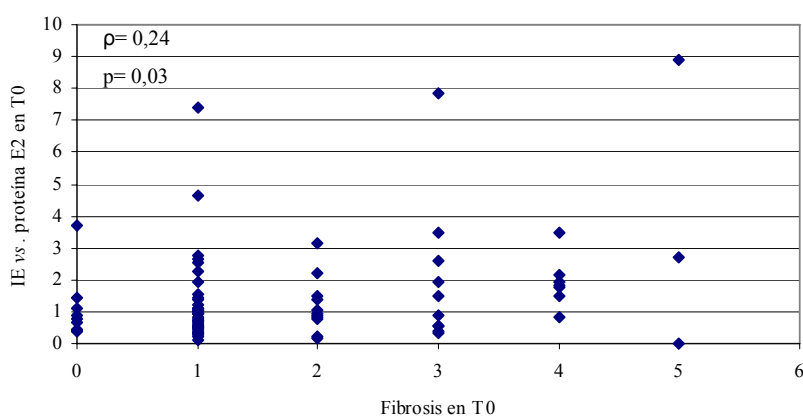


Figura 19. Correlación entre la respuesta proliferativa contra la proteína E2 del VHC y la fibrosis en T0 en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina (todos los pacientes del estudio). Se consideran asociaciones estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ (Prueba de Correlaciones por rangos de Spearman). Abreviaturas: IE, índice de estimulación, T0, evaluación realizada en semana 0.

Estos resultados muestran que en los pacientes crónicamente infectados por el VHC, la terapia con IFN- α -2b y ribavirina induce una reducción significativa en los niveles de anticuerpos específicos, así como en la secreción de IFN- γ contra antígenos virales. Por su parte, la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con la misma, es capaz de inducir la aparición *de novo* de respuesta de secreción de IFN- γ y linfoproliferativa. Además se pudo observar que las características de la respuesta inmune inducida por la preparación vacunal CIGB-230 en su combinación con la terapia con IFN- α -2b y ribavirina dependen del número de dosis, así como del momento de su administración con relación a la terapia antiviral. Específicamente el incremento en la respuesta de anticuerpos neutralizantes y de secreción de IFN- γ inducido por esta preparación vacunal en esquema de 6 dosis a partir de la semana 12 de la terapia antiviral se asoció a la RVS.

4 DISCUSIÓN

El conocimiento sobre la respuesta inmune en los individuos crónicamente infectados por el VHC es todavía insuficiente y los parámetros inmunológicos que pudieran estar asociados con el curso de la infección crónica y el tratamiento no se han definido. Adicionalmente, no está claro cómo se comporta la respuesta inmune en el tiempo, una vez que se ha establecido el estado crónico y durante el tratamiento antiviral. Sí queda claro que la infección por el VHC, una vez que se ha hecho crónica, no es eliminable sin intervención terapéutica. Las estrategias vacunales de este tipo, sobre la base de las evidencias aportadas por los estudios en individuos que resuelven espontáneamente la infección por el VHC (Cox y cols., 2005; Thimme y cols., 2002), apuestan generalmente por la potenciación de la respuesta celular (Klade y cols., 2008; Wedemeyer y cols., 2009; Yutani y cols., 2009). No obstante, también resulta racional tener en cuenta la respuesta de anticuerpos neutralizantes, dada su potencialidad para reducir la probabilidad de infección de nuevas células.

En este trabajo se evaluó la respuesta inmune específica contra el VHC a partir de muestras de suero y células mononucleares de sangre periférica de un grupo de 97 pacientes crónicamente infectados por este patógeno. Quince de estos pacientes, tratados fallidamente con la terapia combinada con IFN- α -2b y ribavirina, posteriormente fueron inmunizados con la preparación vacunal CIGB-230. Los otros 82 pacientes, inicialmente vírgenes a tratamiento, fueron tratados con la terapia combinada con IFN- α -2b y ribavirina, de conjunto con la preparación vacunal CIGB-230.

La evaluación de la respuesta de anticuerpos contra antígenos virales recombinantes reveló que todos los pacientes mostraron una respuesta positiva contra varios de los antígenos evaluados. En la mayoría de los casos, la reactividad estuvo dominada por los isotipos IgG e IgM, tanto con respecto al número de pacientes con reactividad positiva, como a la magnitud

de la respuesta detectada. Estos resultados están en concordancia con trabajos previos que reflejan una elevada prevalencia de ambas clases de inmunoglobulinas, IgG e IgM, específicas contra el VHC, en pacientes infectados crónicamente (Hirayama y cols., 2001; Quiroga y cols., 1995). Dichos estudios solo se refieren a la respuesta específica contra el antígeno de la cápsida y los resultados obtenidos en este trabajo extienden este hecho además a la proteína NS3.

En el presente estudio no se detectaron cambios significativos en la frecuencia de detección y la magnitud de la respuesta humoral de las clases de anticuerpos estudiadas, inducidos por la preparación vacunal terapéutica CIGB-230 administrada como única terapia. Esto se pudiera deber a las características propias de este inmunógeno: mezcla de una proteína recombinante sin adyuvante y un plasmidio para inmunización con ADN. En estas condiciones pudiera estar favorecida la inducción de respuesta celular, más que la humoral, a diferencia con estudios previos en los que se inocularon variantes proteicas y peptídicas formuladas con adyuvantes, lo cual sí logró incrementar la respuesta humoral específica en pacientes crónicos (Neuens y cols., 2003; Yutani y cols., 2007; Yutani y cols., 2009), aunque sin impacto en la RVS.

Debe destacarse que en los pacientes tratados con IFN- α -2b y ribavirina la disminución de la respuesta humoral específica contra el VHC fue usual, a pesar de que esta respuesta era diversa y frecuente antes de iniciar el tratamiento. Otros trabajos documentan disminuciones significativas en la respuesta humoral específica contra antígenos virales, en pacientes respondedores al tratamiento con IFN- α , o IFN- α y ribavirina (Zhang y cols., 1997). En el presente estudio se observó que solo en los individuos que recibieron nueve dosis de la preparación vacunal CIGB-230, administradas desde el inicio de la terapia antiviral (grupo S9), no disminuyó la respuesta de IgG contra el antígeno de la cápsida. Otros análisis revelaron una disminución significativa de la IgG contra E2 solo en los individuos

inmunizados con reaparición de la viremia, lo cual pudiera indicar que dichos anticuerpos son importantes para el control viral. De hecho, se ha descrito que varios epitopos de la proteína E2 son blancos de anticuerpos neutralizantes (Zeisel y cols., 2007).

Resulta interesante que en el presente estudio la respuesta de anticuerpos neutralizantes solo se modificó en pacientes inmunizados con la preparación vacunal CIGB-230. Específicamente, la monoterapia con la preparación vacunal CIGB-230 indujo un incremento significativo en la respuesta de anticuerpos neutralizantes a nivel grupal y esta se generó *de novo* en el 42,8% de los pacientes. Se ha demostrado que la respuesta de anticuerpos neutralizantes evaluada por el sistema de inhibición de la infección de psVHC tiene una relación funcional con la protección frente al virus en individuos que lo eliminan espontáneamente (Pestka y cols., 2007). Por lo tanto, la inducción *de novo* de una respuesta inmune similar durante el tratamiento con CIGB-230 indica que esta preparación vacunal puede tener un papel activo en la modificación de la respuesta inmune establecida en los individuos crónicos.

Por otra parte, el grupo que recibió seis dosis de la preparación vacunal CIGB-230 desfasadas con respecto al inicio de la terapia (grupo T6) mostró un incremento significativo de la actividad neutralizante de los anticuerpos, no detectado en el grupo control. En el grupo T6 no se detectó la típica reducción en el porcentaje de respuesta virológica que se ha descrito para la terapia con IFN-peg- α y ribavirina, entre la semana 12 y la 72 (Davis y cols., 2003), lo cual evidencia el impacto favorable de la administración de la preparación vacunal CIGB-230 en la modificación del patrón de respuesta virológica. Esto pudiera estar relacionado, en parte, con el incremento en la actividad neutralizante de los anticuerpos, ya que se evidenció una tendencia hacia la asociación positiva entre el incremento de este mecanismo efector y la capacidad para alcanzar la RVS. Además, el incremento en la respuesta de anticuerpos neutralizantes se constató solo en los pacientes que alcanzaron la RVS, a diferencia de los

individuos no respondedores. Se podría considerar que los niveles incrementados de anticuerpos neutralizantes circulantes contribuyen a evitar la reaparición de la viremia durante el tratamiento y en los seis meses posteriores al final del mismo.

En este trabajo también se estudió la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica específicas contra antígenos del VHC en los pacientes crónicamente infectados. La frecuencia de detección de la misma fue baja. En la literatura se refieren frecuencias de detección bajas, tanto para células T CD4⁺ como CD8⁺ específicas del VHC (Schlaphoff y cols., 2007; Spangenberg y cols., 2005; Urbani y cols., 2006). Varios estudios muestran que en los pacientes crónicos muchas de las células T específicas contra antígenos virales tienen afectada su capacidad para proliferar y secretar IFN- γ (Ishii y Koziel, 2008; Schlaphoff y cols., 2007). En contraste, en los pacientes con infección aguda, sintomática y de duración limitada, las respuestas celulares son detectables hasta en el 100% de los casos (Schirren y cols., 2000) y se caracterizan por una amplia especificidad de epitopos, tanto de las proteínas estructurales como de las no estructurales (Urbani y cols., 2006). También se plantea que el vigor de la respuesta celular se incrementa y su especificidad epitópica se amplía en los pacientes que clarifican el virus espontáneamente, mientras que la respuesta permanece afectada e incluso puede desaparecer en los pacientes que cursan hacia la cronicidad (Urbani y cols., 2006).

En la generalidad de los pacientes descritos en este trabajo, desde antes de iniciar las terapias, la respuesta celular estuvo frecuentemente limitada a un único antígeno, lo cual concuerda con lo observado por otros investigadores (Guglietta y cols., 2009; Urbani y cols., 2006). Al parecer, en la infección crónica por el VHC, la restricción de especificidad no es única de las células periféricas, ya que estudios previos refieren haber encontrado el mismo fenómeno usualmente en el hígado (Penna y cols., 2002). El antígeno de la cápsida es considerado el más

inmunogénico para las células T específicas del VHC, tanto intrahepáticas como periféricas (Penna y cols., 2002) independientemente de la respuesta del paciente frente a la terapia antiviral (Alvarado y cols., 2002). No obstante, algunos autores refieren encontrar la respuesta fundamentalmente enfocada hacia la región no estructural (Urbani y cols., 2006).

Se debe destacar que la inmunización con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia fue capaz de incrementar significativamente el número de pacientes con respuesta proliferativa de células CD8⁺ contra más de un antígeno y producir un aumento significativo en la magnitud de esta respuesta contra el antígeno de la cápsida, un mes después de finalizado el tratamiento en comparación con T0. Un fenómeno similar en cuanto al aumento de la frecuencia de células específicas se observó en un estudio realizado en pacientes crónicos, inmunizados con el candidato vacunal peptídico IC41. Este candidato, dirigido por su diseño a la generación de respuesta celular, solo fue capaz de inducir una débil funcionalidad celular en el caso de los linfocitos CD4⁺ y ninguna en los CD8⁺, en cuanto a la secreción de IFN- γ (Schlaphoff y cols., 2007). La falta de efecto antiviral de dicho candidato vacunal se atribuyó a este fallo de funcionalidad (Schlaphoff y cols., 2007).

Por otra parte, en el presente trabajo en el contexto de la terapia con IFN- α -2b y ribavirina la respuesta celular se redujo hasta niveles indetectables en algunos casos. Varios estudios describen el mismo fenómeno (Barnes y cols., 2009; Hammond y cols., 2011), mientras que otros han observado incrementos en la respuesta celular durante el tratamiento basado en IFN- α (Abdel-Hakeem y cols., 2010; Badr y cols., 2008). Estas diferencias probablemente se deben a la duración que ha tenido la infección hasta el momento en que se aplica la terapia, ya que el rescate de la respuesta inmune específica se ha observado con mayor frecuencia en el tratamiento de infecciones agudas o crónicas tempranas (Abdel-Hakeem y cols., 2010; Badr y cols., 2008). No obstante, las propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativas del IFN- α y

de la ribavirina han sido claramente descritas (Bergamini y cols., 2001; Rigopoulou y cols., 2007) y la toxicidad hematológica es un evento adverso común del tratamiento con IFN- α y ribavirina (Dormann y cols., 2000; Pawlowska y cols., 2011). En correspondencia con esto, en los pacientes tratados con la terapia combinada con IFN- α -2b y ribavirina, sola o de conjunto con la preparación vacunal CIGB-230, desde la semana 12 y hasta la 48, todos los grupos de individuos mostraron una reducción significativa en los conteos de leucocitos. Sin embargo, los conteos de linfocitos no se redujeron significativamente en ninguno de los grupos inmunizados con la preparación vacunal, a diferencia del control. Esta diferencia pudiera indicar un posible efecto inmunoestimulador de la preparación vacunal CIGB-230.

Además, a pesar de la leucopenia inducida por el IFN- α , la administración de la preparación vacunal CIGB-230 fue capaz de inducir un mayor número de respuestas proliferativas y de secreción de IFN- γ *de novo* contra el antígeno de la cápsida, que la terapia antiviral sola. Debe destacarse que el tratamiento que incluyó la administración de seis dosis de la preparación vacunal, desfasadas con respecto al inicio de la terapia, indujo respuestas de secreción de IFN- γ *de novo* contra el antígeno de la cápsida en una frecuencia significativamente superior en comparación con el grupo control. Coincide que en este grupo inmunizado no se observó la disminución en el porcentaje de pacientes con respuesta virológica que ha sido descrito para el período entre semana 12 y 72 del tratamiento antiviral (Davis y cols., 2003). Se puede considerar que este mecanismo efector, inducido por la administración de la preparación vacunal, incidió de forma directa en el comportamiento de la respuesta virológica, ya que en dicho grupo de inmunización se detectó una asociación estadísticamente significativa entre la estimulación de la secreción de IFN- γ y/o de los anticuerpos neutralizantes y la RVS. De hecho, la secreción de IFN- γ es una función efectora que se ha encontrado positivamente asociada a la eliminación de la infección (Smyk-Pearson y cols., 2006). Los resultados del

presente trabajo apoyan estas evidencias, ya que los pacientes que mostraban ARN viral detectable en la semana 72, ya fueran del grupo control o inmunizados con la preparación vacunal, manifestaron una disminución significativa de la secreción de IFN- γ contra el antígeno de la cápsida.

Dados los resultados de inducción de respuesta celular *de novo* en los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia, era de esperar una mayor frecuencia de inducción de este tipo de respuestas en los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina, ya que estos eran vírgenes a tratamiento. Sin embargo, no ocurrió así, probablemente debido a los efectos inmunomoduladores de la terapia antiviral combinada. Contrariamente, Wedemeyer y colaboradores mostraron que la inmunogenicidad de la preparación vacunal peptídica IC41 no se afectó cuando esta fue administrada tardíamente durante la terapia antiviral (Wedemeyer y cols., 2009). La discrepancia puede ser atribuible a las diferencias en los mecanismos de acción de ambas preparaciones vacunales: péptidos, que no requieren procesamiento para la presentación *vs.* ADN, que requiere atravesar el proceso de expresión y procesamiento antes de que los antígenos sean presentados. También los grupos de pacientes analizados difieren: respondedores virológicos tempranos en el trabajo de Wedemeyer y cols. (Wedemeyer y cols., 2009) *vs.* pacientes vírgenes a tratamiento en el presente trabajo.

Las características de la población de individuos estudiada en cada caso pueden ser determinantes críticos del resultado del tratamiento, ya que numerosos factores del hospedero se han encontrado asociados con la respuesta a la terapia (Poordad y cols., 2012; Tsubota y cols., 2012). En el presente trabajo, en el caso del estudio exploratorio en que la preparación vacunal CIGB-230 fue administrada de conjunto con la terapia antiviral no se realizó aleatorización de los individuos atendiendo a los polimorfismos de simple nucleótido, el HLA,

la carga viral o el daño hepático. Resulta interesante la predisposición diferencial que mostraron los grupos de pacientes de este estudio con respecto a la RVTc. Nótese que hasta la semana 12 del tratamiento el grupo control y los grupos T6 y T9 habían recibido exactamente el mismo tratamiento (IFN- α -2b y ribarivina); y sin embargo el grupo control mostró en ese momento una diferencia de más de un 20% en la RVTc con respecto a la observada en los grupos T6+T9. Por este motivo, la comparación entre diferentes grupos de pacientes puede ser engañosa y el efecto de las intervenciones terapéuticas debe ser analizado dentro de cada grupo, teniendo en cuenta cada variable antes y después del tratamiento.

El estudio de la respuesta específica mediada por células contra el VHC ha mostrado frecuentemente que la proliferación y la secreción de citoquinas no están comúnmente asociadas (Barnes y cols., 2009; Wedemeyer y cols., 2009) y que pueden ser afectadas diferencialmente por la terapia basada en IFN- α (Alvarado y cols., 2002). Los resultados de este trabajo sugieren que los diferentes esquemas de inmunización con la preparación vacunal CIGB-230 difieren en su capacidad para inducir respuestas linfoproliferativas y de secreción de IFN- γ *de novo*. Este fenómeno pudiera estar directamente relacionado con el momento en que se administra la preparación vacunal, con respecto a la terapia antiviral. En este sentido se ha documentado que el ambiente leucopénico promueve cambios en la fisiología linfocitaria e induce la proliferación de las células T, a través del mecanismo de expansión homeostática periférica (Tchao y Turka, 2012). Se ha sugerido que la etapa de linfopenia inmediata a la citorreducción propicia un período de ventana terapéutica único para la inmunoterapia (Gattinoni y cols., 2005), pero la intensidad de la proliferación y las características de las células resultantes, en términos de capacidad para secretar citoquinas, dependen del grado y la duración de la linfopenia (Min y cols., 2005; Onoe y cols., 2010). En el presente trabajo, en el esquema de administración temprana de la preparación vacunal, el antígeno comienza a ser

administrado antes de la estabilización de la linfopenia en su nadir. Estas condiciones pueden ser favorables para estimular el desarrollo de células que proliferan sin capacidad para ejercer ningún mecanismo efector, mientras que en el contexto de la administración tardía, el ambiente linfopénico más estable puede ser más adecuado para la generación de células proinflamatorias secretoras de IFN- γ .

Además, no se puede descartar que la naturaleza de las variables inmunológicas evaluadas en el estudio de la combinación de la preparación vacunal CIGB-230 con la terapia antiviral dependa también de las características de cada esquema de inmunización, en cuanto al período en que se inyecta la preparación vacunal y el momento en que se realiza la evaluación, con relación al final del tratamiento. De hecho, cada esquema de inmunización evaluado se sustenta en una racionalidad diferente. En los esquemas de administración temprana, la preparación vacunal se comienza a administrar en un momento en que no se ha instaurado la supresión inmunológica provocada por la terapia antiviral. Sin embargo en ese momento las cargas viral y antigénica son elevadas, lo que puede ser desfavorable para el rescate o inducción de la funcionalidad de la respuesta inmune, dados los efectos perjudiciales que pueden tener las proteínas virales sobre la respuesta inmune específica (Hosui y cols., 2003; Macdonald y Harris, 2004). Luego el momento de evaluación en la semana 48 del tratamiento implica que se están evaluando respuestas de memoria, ya que han transcurrido 24 y 12 semanas desde la última inoculación en los grupos S6 y S9, respectivamente. En el caso de los esquemas de administración tardía de la preparación vacunal, esta se comienza a inocular en un momento en que la carga viral y, por lo tanto, la antigénica se han reducido producto de la terapia antiviral, pero también es un momento en que es evidente la supresión inmunológica. En este caso podemos considerar que la evaluación de la respuesta inmune en semana 48 mide fundamentalmente respuesta de tipo efectora, por la proximidad del final de la inmunización al

momento de evaluación. Evidentemente es importante ganar más en la comprensión de los diferentes mecanismos que gobiernan la inducción diferencial de la proliferación y la secreción de citoquinas específicas contra el VHC, en el contexto de la triple terapia con la preparación vacunal CIGB-230 e IFN- α -2b y ribavirina. El objetivo fundamental es la generación de células multifuncionales, como las que han sido encontradas positivamente asociadas a la resolución de la infección, a diferencia de las monofuncionales (Kaplan y cols., 2007).

En el presente trabajo, la evaluación de la relación entre las variables histológicas y las de respuesta inmune evidenció una correlación positiva entre el daño hepático y las respuestas proliferativas específicas contra proteínas virales individuales. Las intervenciones terapéuticas evaluadas cambiaron la relación entre estas variables, probablemente mediante la modificación de la respuesta celular proliferativa específica observada en una parte de los pacientes tratados.

Los datos acumulados en la literatura hasta el momento acerca de la influencia que tiene la respuesta inmune en la histología hepática durante la infección crónica por el VHC parecen contradictorios. Por un lado, se han obtenido evidencias de que la secreción de IFN- γ por parte de las células T CD4⁺ de tipo Th1 y CD8⁺ periféricas se asocia negativamente con el desarrollo de fibrosis/cirrosis durante la infección por el VHC (Sreenarasimhaiah y cols., 2003). Sin embargo, este tipo de respuesta predomina en los pacientes en cuya histología hepática prevalece la inflamación (Sreenarasimhaiah y cols., 2003). También se ha observado que en los pacientes con respuestas específicas de secreción de IFN- γ por las células CD8⁺ intrahepáticas, el grado de fibrosis y su tasa de progresión son significativamente menores que en los individuos en que estas respuestas no se detectan (Bonilla y cols., 2006). Sin embargo, otros autores han encontrado que en la fase crónica los niveles de expresión intrahepática del

ARNm de IFN- γ e IL-2 están incrementados y correlacionan positivamente con la fibrosis y la inflamación del tracto portal en los pacientes, en comparación con los controles (Napoli y cols., 1996).

Además de la influencia que pueden tener las células efectoras específicas del VHC en el daño hepático, se conoce que las células no específicas también son determinantes para el destino final de la infección. Por ejemplo, se ha detectado una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de la proteína 10 inducida por IFN (IP-10) y la actividad necroinflamatoria, con inflamación focal y portal (Romero y cols., 2006), así como con el índice de necroinflamación lobular (Harvey y cols., 2003). Se ha confirmado que los linfocitos atraídos por esta vía son casi exclusivamente CD8⁺ (Harvey y cols., 2003) y su especificidad está aún por definir (Abel y cols., 2006). Adicionalmente, se ha encontrado correlación entre la inflamación hepática, portal y lobular, y el infiltrado de células T que expresan CXCR3/CCR5 (Larrubia y cols., 2008).

Aparentemente, una vez que la respuesta específica falla en eliminar la infección, por ser cualitativa y cuantitativamente subóptima, las quimioquinas y los mediadores inflamatorios también atraen células T no específicas. Estas son incapaces de eliminar el virus, pero pueden desencadenar la muerte de células espectadoras a través de diferentes vías apoptóticas, con lo que contribuyen a la inflamación hepática y a la iniciación y perpetuación de la fibrogenesis. Por el contrario, una respuesta celular más balanceada y de más amplio espectro antigénico, que incluya mecanismos efectores antivirales, puede ser más eficiente para lograr la clarificación o al menos el control viral, con mínimo daño histológico. En este sentido uno de los mecanismos efectores antivirales al cual se le han demostrado estas propiedades es la secreción de IFN- γ . En individuos con infección aguda de duración limitada, la secreción de esta citoquina se ha visto asociada a la eliminación viral, sin daño histológico significativo

(Lechner y cols., 2000b). En estudios en chimpancés se ha observado que la infección experimental por el VHB puede ser eliminada con la contribución del IFN- γ , sin que haya destrucción masiva de las células infectadas y, por consiguiente, sin exacerbación de la enfermedad hepática (Guidotti y cols., 1999). Este fenómeno de eliminación viral no citolítico puede ser explicado por la activación de la vía Jak/Stat que culmina en la expresión de genes que controlan la replicación viral (Burdeinick-Kerr y cols., 2009). Además se conoce que el IFN- γ es antifibrogénico e inhibe la activación de las células estrelladas hepáticas (revisado por Maher, 2001).

En correspondencia con estos elementos, más que simplemente potenciar la respuesta celular que ya existe, el objetivo de las intervenciones vacunales terapéuticas debe ser la diversificación antigénica de la misma, con la inducción de su funcionalidad antiviral. Además, no se debe descartar la potencial utilidad de la eliminación de respuestas pre-existentes que sean cualitativamente inefectivas. Es importante señalar que en la evaluación final, en el grupo tratado con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia, la inducción de respuestas celulares, incluyendo respuestas proliferativas y de secreción de IFN- γ contra más de un antígeno se asoció a la estabilización o la reducción de la fibrosis, aun cuando no se detectó clarificación viral. En total, en el 46,6% de los pacientes de este estudio se observó mejoría o estabilización de la actividad histológica total (necroinflamación más fibrosis). Este valor resulta más alto que el observado en el estudio conducido por Nevens y colaboradores con la preparación vacunal contra el VHC basada en la proteína E1, en el cual el índice de Ishak total mejoró o se estabilizó en el 28% de los pacientes no respondedores a la terapia antiviral, mientras que en los vírgenes a tratamiento la mejoría llegó a un 67% (Nevens y cols., 2003). Dichos datos reflejan una vez más que existen diferencias entre los grupos de pacientes infectados crónicamente por el VHC, las cuales pueden incidir directamente en el

resultado final de las intervenciones terapéuticas implementadas. En específico, los pacientes crónicos, una vez que no responden a la terapia basada en IFN- α , resultan un grupo difícil de tratar y existen controversias al respecto de la factibilidad de llevar a cabo intervenciones vacunales verdaderamente terapéuticas en ellos y, en general, en pacientes crónicos en los que el sistema inmune ha estado sometido a estimulación antigénica específica por décadas (Ferrari, 2008).

Adicionalmente se debe señalar que en el caso de los pacientes tratados con IFN- α -2b y ribavirina junto a la asociación positiva observada entre la fibrosis y la linfoproliferación específica contra la proteína E2 en T0, esta última también se asoció a la presencia de ARN viral en sangre. Estos resultados sugieren que la respuesta inmune proliferativa específica contra esta proteína además de estar posiblemente implicada en la generación y/o el mantenimiento del daño histológico pudiera constituir un elemento de pronóstico desfavorable para la resolución de la infección. La confirmación de la causalidad de esta relación demanda una caracterización profunda de su especificidad epitópica, para identificar los determinantes involucrados en la clarificación viral y en su persistencia.

En general estos resultados muestran que en los pacientes crónicamente infectados por el VHC, ya sean vírgenes a tratamiento o no respondedores a la terapia combinada con IFN- α -2b y ribavirina, las respuestas celulares proliferativas y de secreción de IFN- γ son raramente detectadas, débiles y dirigidas generalmente contra un único antígeno. Mientras, la respuesta humoral se detecta en elevada frecuencia y se caracteriza por el reconocimiento de varios antígenos. En particular, la preparación vacunal CIGB-230 resulta una estrategia terapéutica promisoriosa, ya que su administración a individuos crónicamente infectados es capaz de inducir respuestas proliferativas y de secreción de IFN- γ *de novo*, así como incrementar la respuesta de anticuerpos neutralizantes, con evidencias de impacto positivo en el curso de la respuesta

virológica al tratamiento. Específicamente el incremento en la respuesta de anticuerpos neutralizantes y de secreción de IFN- γ inducido por esta preparación vacunal en esquema de 6 dosis a partir de la semana 12 de la terapia antiviral se asoció a la RVS. Estos resultados hacen aportes al conocimiento de la capacidad de la preparación vacunal CIGB-230 para modificar la respuesta inmune pre-establecida contra el VHC en individuos crónicamente infectados y contribuyen a la proyección de estrategias racionales de intervención activa en este tipo de pacientes. La potencialidad de esta novedosa preparación vacunal para el tratamiento de la hepatitis C crónica deberá ser confirmada en un mayor número de pacientes y su efecto deberá evaluarse a más largo plazo.

CONCLUSIONES

1. En los pacientes no respondedores a la terapia con IFN- α -2b y ribavirina, la monoterapia con la preparación vacunal CIGB-230 estimuló la respuesta de anticuerpos neutralizantes y contribuyó a la diversificación antigénica de la respuesta proliferativa de células CD8⁺, elemento integrante de la respuesta celular multiespecífica que estuvo asociada a la mejoría de la fibrosis, aunque fue insuficiente para alcanzar la clarificación viral.
2. Las características de la respuesta inmune generada por la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina dependieron del número de dosis, así como del momento de su administración con relación a la terapia antiviral, lo cual pudiera ser el resultado de la influencia de la leucopenia y la reducción de la carga viral inducidas por la terapia.
3. Solo el esquema de 6 administraciones de la preparación vacunal CIGB-230 a partir de la semana 12 de la terapia con IFN- α -2b y ribavirina propició la inducción de secreción de IFN- γ *de novo* contra el antígeno de la cápsida y el incremento de la actividad de anticuerpos neutralizantes, elementos efectoros que estuvieron asociados a la respuesta virológica sostenida.
4. En los pacientes crónicamente infectados por el VHC la respuesta inmune celular proliferativa contra antígenos virales individuales se asoció positivamente al daño hepático, lo que sugiere que este tipo de respuesta inmune, cuando no logra la eliminación viral, contribuye al daño histológico, pero las intervenciones terapéuticas evaluadas cambiaron la relación entre estas variables, probablemente mediante la modificación de la respuesta celular proliferativa específica observada en una parte de los pacientes tratados.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar en la caracterización del curso temporal y de la reactividad cruzada de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en pacientes crónicamente infectados por el VHC, incluyendo pacientes que no estén bajo terapia antiviral, así como pacientes que se encuentren recibiendo intervenciones terapéuticas que incluyan la preparación vacunal CIGB-230, para ganar en el conocimiento de la contribución de los mismos en la respuesta al tratamiento.
2. Realizar una caracterización fenotípica, epitópica y funcional de las poblaciones de células efectoras específicas del VHC en muestras tomadas a los pacientes incluidos en el estudio clínico fase II de la preparación vacunal CIGB-230, antes del inicio del tratamiento y en los diferentes momentos de evaluación, incluyendo el final del seguimiento, para conocer el posible impacto de la terapia en las características de la respuesta inmune detectada en este estudio y su relación con la histología hepática y la clarificación viral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Hakeem MS, Bedard N, Badr G, Ostrowski M, Sekaly RP, Bruneau J y cols. 2010. Comparison of immune restoration in early versus late alpha interferon therapy against hepatitis C virus. *J Virol.* 84 (19): 10429-35.
2. Abel M, Sene D, Pol S, Bourliere M, Poynard T, Charlotte F y cols. 2006. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 44 (6): 1607-16.
3. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A y cols. 2004. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.* 113 (7): 963-72.
4. Accapezzato D, Visco V, Francavilla V, Molette C, Donato T, Paroli M y cols. 2005. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J Exp Med.* 202 (6): 817-28.
5. Acosta-Rivero N, Aguilera Y, Falcon V, Poutou J, Musacchio A, Alvarez-Lajonchere L y cols. 2006. Ultrastructural and Immunological Characterization of Hepatitis C Core Protein-DNA Plasmid Complexes. *Am J Immunol.* 2 (3): 67-72.
6. Acosta-Rivero N, Poutou J, Mussachio A, Falcon V, Aguilera Y, Rodriguez A y cols. 2005. Interaction of a C-terminal Truncated Hepatitis C Virus Core Protein with Plasmid DNA Vaccine leads to in vitro Assembly of Heterogeneous Virus-like Particles. *American Journal of Infectious Diseases.* 1 (1): 66-72.
7. Acosta-Rivero N, Rodriguez A, Musacchio A, Falcon V, Suarez VM, Martinez G y cols. 2004. In vitro assembly into virus-like particles is an intrinsic quality of *Pichia pastoris* derived HCV core protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 325 (1): 68-74.
8. Akram M, Idrees M, Zafar S, Hussain A, Butt S, Afzal S y cols. 2011. Effects of host and virus related factors on interferon-alpha+ribavirin and pegylated-interferon+ribavirin treatment outcomes in chronic Hepatitis C patients. *Virol J.* 8: 234-40.
9. Alatrakchi N and Koziel M. 2009. Regulatory T cells and viral liver disease. *J Viral Hepat.* 16 (4): 223-9.
10. Alvarado EC, Elewaut A, Philippe J, Elewaut AE, Desombere I, Maertens G y cols. 2002. Evolution of hepatitis C virus-specific T cell responses and cytokine production in chronic hepatitis C patients treated with high doses of interferon-alpha. *Rev Invest Clin.* 54 (1): 41-50.
11. Álvarez-Lajonchere L and Dueñas-Carrera S. 2012. Complete definition of immunological correlates of protection and clearance of hepatitis C virus infection: a relevant pending task for vaccine development. *Int Rev Immunol.* 31 (3): 223-42.
12. Álvarez-Lajonchere L, Gonzalez M, Alvarez-Obregon JC, Guerra I, Vina A, Acosta-Rivero N y cols. 2006. Hepatitis C virus (HCV) core protein enhances the immunogenicity of a co-delivered DNA vaccine encoding HCV structural antigens in mice. *Biotechnol Appl Biochem.* 44 (Pt 1): 9-17.
13. Ansar M, Ashfaq UA, Shahid I, Sarwar MT, Javed T, Rehman S y cols. 2011. Inhibition of full length hepatitis C virus particles of 1a genotype through small interference RNA. *Virol J.* 8: 203-9.
14. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L y cols. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 8 (4): 379-85.

-
15. Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol.* 79 (5): 3187-94.
 16. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. 2000. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology.* 31 (3): 777-82.
 17. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. 2011. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology.* 418 (1): 161-70.
 18. Averill L, Lee WM, Karandikar NJ. 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clin Immunol.* 123 (1): 40-9.
 19. Bacardi D, Amador-Cañizares Y, Cosme K, Urquiza D, Suarez J, Marante J y cols. 2009. Toxicology and biodistribution study of CIGB-230, a DNA vaccine against hepatitis C virus. *Hum Exp Toxicol.* 28 (8): 479-91.
 20. Baden LR, Blattner WA, Morgan C, Huang Y, Defawe OD, Sobieszczyk ME y cols. 2011. Timing of plasmid cytokine (IL-2/Ig) administration affects HIV-1 vaccine immunogenicity in HIV-seronegative subjects. *J Infect Dis.* 204 (10): 1541-9.
 21. Badr G, Bedard N, Abdel-Hakeem MS, Trautmann L, Willems B, Villeneuve JP y cols. 2008. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J Virol.* 82 (20): 10017-31.
 22. Bain C, Parroche P, Lavergne JP, Duverger B, Vieux C, Dubois V y cols. 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 78 (19): 10460-9.
 23. Barnes E, Folgari A, Capone S, Swadling L, Aston S, Kurioka A y cols. 2012. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med.* 4 (115): 115-25.
 24. Barnes E, Gelderblom HC, Humphreys I, Semmo N, Reesink HW, Beld MG y cols. 2009. Cellular immune responses during high-dose interferon-alpha induction therapy for hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 199 (6): 819-28.
 25. Barrett S, Ryan E, Crowe J. 1999. Association of the HLA-DRB1*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. *J Hepatol.* 30 (6): 979-83.
 26. Bartenschlager R and Lohmann V. 2000. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 81 (Pt 7): 1631-48.
 27. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* 197 (5): 633-42.
 28. Bergamini A, Bolacchi F, Cepparulo M, Demin F, Uccella I, Bongiovanni B y cols. 2001. Treatment with ribavirin and interferon-alpha reduces interferon-gamma expression in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol.* 123 (3): 459-64.
 29. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C y cols. 2005. 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.* 79 (12): 7860-7.

-
30. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC y cols. 2006. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol.* 144 (2): 188-96.
 31. Bonilla N, Barget N, Andrieu M, Roulot D, Letoumelin P, Grando V y cols. 2006. Interferon gamma-secreting HCV-specific CD8+ T cells in the liver of patients with chronic C hepatitis: relation to liver fibrosis--ANRS HC EP07 study. *J Viral Hepat.* 13 (7): 474-81.
 32. Brass V, Moradpour D, Blum HE. 2006. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int J Med Sci.* 3 (2): 29-34.
 33. Brown RJ, Tarr AW, McClure CP, Juttla VS, Tagiuri N, Irving WL y cols. 2007. Cross-genotype characterization of genetic diversity and molecular adaptation in hepatitis C virus envelope glycoprotein genes. *J Gen Virol.* 88 (Pt 2): 458-69.
 34. Burdeinick-Kerr R, Govindarajan D, Griffin DE. 2009. Noncytolytic clearance of sindbis virus infection from neurons by gamma interferon is dependent on Jak/STAT signaling. *J Virol.* 83 (8): 3429-35.
 35. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C y cols. 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)/CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 40 (5): 1062-71.
 36. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L y cols. 1999. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 116 (1): 135-43.
 37. Chu CM, Sheen IS, Liaw YF. 2004. Sequential changes of hepatitis C virus antibody profiles during treatment of chronic hepatitis C of genotype 1b: pretreatment antibody response to E2/NS1 correlated sustained response. *Infection.* 32 (3): 153-6.
 38. Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, Takeshita F, Horii T, Akira S y cols. 2011. Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. *Curr Gene Ther.* 11 (6): 479-84.
 39. Collier KE, Heaton NS, Berger KL, Cooper JD, Saunders JL, Randall G. 2012. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* 8 (1): e1002466.
 40. Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM, Pardoll D, Thomas DL, Ray SC. 2005. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology.* 42 (1): 104-12.
 41. Currier JR, Kuta EG, Turk E, Earhart LB, Loomis-Price L, Janetzki S y cols. 2002. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 260 (1-2): 157-72.
 42. Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. 2003. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 38 (3): 645-52.
 43. Day CL, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM y cols. 2003. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest.* 112 (6): 831-42.
 44. De Clercq E. 2007. The design of drugs for HIV and HCV. *Nat Rev Drug Discov.* 6 (12): 1001-18.
 45. Delahooke TE. 2004. Hepatitis C: What is the nature of the problem? *J Viral Hepat.* 11 Suppl 1:5-11.
 46. Dormann H, Krebs S, Muth-Selbach U, Brune K, Schuppan D, Hahn EG y cols. 2000. Rapid onset of hematotoxic effects after interferon alpha in hepatitis C. *J Hepatol.* 32 (6): 1041-2.
-

-
47. Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol.* 10(4): 821-7.
 48. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol.* 68 (10): 6147-60.
 49. Dueñas-Carrera S, Álvarez-Lajonchere L, Cesar Álvarez-Obregon J, Perez A, Acosta-Rivero N, Vazquez DM y cols. 2002. Enhancement of the immune response generated against hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids. *Biotechnol Appl Biochem.* 35 (Pt 3): 205-12.
 50. Dueñas-Carrera S, Morales J, Acosta-Rivero N, Lorenzo LJ, García C, Ramos T y cols. 1999. Variable level expression of hepatitis C virus core protein in a prokaryotic system. Analysis of the humoral response in rabbit. *Biotecnología Aplicada.* 16 (4): 226-31.
 51. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D y cols. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* 76 (12): 5974-84.
 52. Eren R, Landstein D, Terkieltaub D, Nussbaum O, Zauberman A, Ben Porath J y cols. 2006. Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J Virol.* 80 (6): 2654-64.
 53. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR y cols. 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science.* 258 (5079): 135-40.
 54. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B y cols. 1991. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med.* 325 (2): 98-104.
 55. Feinstone SM, Hu DJ, Major ME. 2012. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis.* 55 (Suppl 1): S25-S32.
 56. Ferrari C. 2008. Therapeutic vaccination for hepatitis C: can protective T-cell responses be restored after prolonged antigen exposure? *Gastroenterology.* 134 (5): 1601-4.
 57. Firbas C, Jilma B, Tauber E, Buerger V, Jelovcan S, Lingnau K y cols. 2006. Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine.* 24 (20): 4343-53.
 58. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM y cols. 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* 300 (5622): 1145-8.
 59. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, von Overbeck J, Lloyd AR y cols. 2001. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 34 (4 Pt 1): 809-16.
 60. Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, Haller O, Bartenschlager R. 2001. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol.* 82 (Pt 4): 723-33.
 61. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol.* 75 (24): 12047-57.
 62. Fujita Y, Shibata A, Ogimoto I, Kurozawa Y, Nose T, Yoshimura T y cols. 2006. The effect of interaction between hepatitis C virus and cigarette smoking on the risk of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 94 (5): 737-9.

-
63. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ y cols. 2005. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med.* 202 (7): 907-12.
 64. Gaudieri S, Rauch A, Pfafferoth K, Barnes E, Cheng W, McCaughan G y cols. 2009. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology.* 49 (4): 1069-82.
 65. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ y cols. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 461 (7262): 399-401.
 66. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R y cols. 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 117 (4): 933-41.
 67. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A y cols. 2003. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology.* 125 (1): 80-8.
 68. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J y cols. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* 302 (5645): 659-62.
 69. Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW y cols. 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis.* 181 (5): 1528-36.
 70. Guedj J, Dahari H, Shudo E, Smith P, Perelson AS. 2012. Hepatitis C viral kinetics with the nucleoside polymerase inhibitor mericitabine (RG7128). *Hepatology.* 55 (4): 1030-7.
 71. Guglietta S, Garbuglia AR, Salichos L, Ruggeri L, Folgori A, Perrone MP y cols. 2009. Impact of viral selected mutations on T cell mediated immunity in chronically evolving and self limiting acute HCV infection. *Virology.* 386 (2): 398-406.
 72. Guidotti LG and Chisari FV. 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol.* 19: 65-91.
 73. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. 1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science.* 284 (5415): 825-9.
 74. Habersetzer F, Honnet G, Bain C, Maynard-Muet M, Leroy V, Zarski JP y cols. 2011. A poxvirus vaccine is safe, induces T-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 141 (3): 890-9.
 75. Hammond T, Lee S, Watson MW, Flexman JP, Cheng W, Price P. 2011. Decreased IFN γ production correlates with diminished production of cytokines by dendritic cells in patients infected with hepatitis C virus and receiving therapy. *J Viral Hepat.* 18 (7): 482-92.
 76. Harris DR, Gonin R, Alter HJ, Wright EC, Buskell ZJ, Hollinger FB y cols. 2001. The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Ann Intern Med.* 134 (2): 120-4.
 77. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK y cols. 2003. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol.* 74 (3): 360-9.

-
78. Hayashi N, Okanoue T, Tsubouchi H, Toyota J, Chayama K, Kumada H. 2012. Efficacy and safety of telaprevir, a new protease inhibitor, for difficult-to-treat patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 19 (2): e134-e142.
 79. Helle F, Vieyres G, Elkrief L, Popescu CI, Wychowski C, Descamps V y cols. 2010. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol.* 84 (22): 11905-15.
 80. Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T y cols. 2009. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med.* 360 (18): 1839-50.
 81. Hirayama M, Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hashimoto N y cols. 2001. IgG1 anti-P2 as a marker of response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol.* 126 (1): 92-100.
 82. Hiszczynska-Sawicka E, Li H, Boyu XJ, Akhtar M, Holec-Gasior L, Kur J y cols. 2012. Induction of immune responses in sheep by vaccination with liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* MIC3 gene. *Pol J Vet Sci.* 15 (1): 3-9.
 83. Hoofnagle JH. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 36 (5 Suppl 1): S21-S29.
 84. Hoofnagle JH and Seeff LB. 2006. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 355 (23): 2444-51.
 85. Hopkins S, DiMassimo B, Rusnak P, Heuman D, Lalezari J, Sluder A y cols. 2012. The cyclophilin inhibitor SCY-635 suppresses viral replication and induces endogenous interferons in patients with chronic HCV genotype 1 infection. *J Hepatol.* 57 (1): 47-54.
 86. Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Sato A, Nakanishi F, Ueda K y cols. 2003. Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli. *J Biol Chem.* 278 (31): 28562-71.
 87. Hutnick NA, Myles DJ, Bian CB, Muthumani K, Weiner DB. 2011. Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo. *Curr Opin Virol.* 1 (4): 233-40.
 88. Inchauspe G and Michel ML. 2007. Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Viral Hepat.* 14 (Suppl 1): 97-103.
 89. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De GJ, Gudat F y cols. 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 22 (6): 696-9.
 90. Ishii S and Koziel MJ. 2008. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol.* 128 (2): 133-47.
 91. Islam D, Lindberg AA, Christensson B. 1995. Peripheral blood cell preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. *Cytometry.* 22 (2): 128-34.
 92. Jiang J, Cun W, Wu X, Shi Q, Tang H, Luo G. 2012. Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 86 (13): 7256-67.
 93. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T y cols. 2004. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 173 (10): 6072-81.

-
94. Kalams SA, Parker S, Jin X, Elizaga M, Metch B, Wang M y cols. 2012. Safety and immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine with or without IL-12 and/or IL-15 plasmid cytokine adjuvant in healthy, HIV-1 uninfected adults. *PLoS One*. 7 (1): e29231.
 95. Kamal SM, Ismail A, Graham CS, He Q, Rasenack JW, Peters T y cols. 2004. Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. *Hepatology*. 39 (6): 1721-31.
 96. Kaplan DE, Ikeda F, Li Y, Nakamoto N, Ganesan S, Valiga ME y cols. 2008. Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis. *J Hepatol*. 48 (6): 903-13.
 97. Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, Valiga ME, Ikeda F, Aytaman A y cols. 2007. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 132 (2): 654-66.
 98. Kato N. 2001. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama*. 55 (3): 133-59.
 99. KDIGO. 2008. KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*.(109): S1-99.
 100. Kharfan-Dabaja MA, Boeckh M, Wilck MB, Langston AA, Chu AH, Wloch MK y cols. 2012. A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 12 (4): 290-9.
 101. Klade CS, Wedemeyer H, Berg T, Hinrichsen H, Cholewinska G, Zeuzem S y cols. 2008. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology*. 134 (5): 1385-95.
 102. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T y cols. 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*. 80 (11): 5308-20.
 103. Koziel MJ. 2006. NK cells: natural born killers in the conflict between humans and HCV. *Hepatology*. 43 (3): 395-7.
 104. Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, Pound D y cols. 2010. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet*. 376 (9742): 705-16.
 105. Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgili S, Balestrieri A, Purcell RH y cols. 1994. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet*. 343 (8894): 388-90.
 106. Larrubia JR, Benito-Martinez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. 2008. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 14 (47): 7149-59.
 107. Lauer GM, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL y cols. 2005. Full-breadth analysis of CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J Virol*. 79 (20): 12979-88.
 108. Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, Nguyen TN, Day CL, Purkis DR y cols. 2002. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol*. 76 (12): 6104-13.
 109. Lavanchy D. 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 29 (Suppl): 74-81.
-

-
110. Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, Donot P, Soulier A, Pagkalos E y cols. 2005. Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol.* 79 (10): 6023-34.
 111. Lavillette D, Pecheur EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R y cols. 2007. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol.* 81 (16): 8752-65.
 112. Lawson A. 2010. Hepatitis C virus-infected patients with a persistently normal alanine aminotransferase: do they exist and is this really a group with mild disease? *J Viral Hepat.* 17 (1): 51-8.
 113. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR y cols. 2000a. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol.* 30 (9): 2479-87.
 114. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P y cols. 2000b. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 191 (9): 1499-512.
 115. Leong SS and Middelberg AP. 2006. The refolding of different alpha-fetoprotein variants. *Protein Sci.* 15 (9): 2040-50.
 116. Leroux-Roels G, Depla E, Hulstaert F, Tobback L, Dincq S, Desmet J y cols. 2004. A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers. *Vaccine.* 22 (23-24): 3080-6.
 117. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. 2000. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med.* 132 (4): 296-305.
 118. Lin C, Kwong AD, Perni RB. 2006. Discovery and development of VX-950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3.4A serine protease. *Infect Disord Drug Targets.* 6 (1): 3-16.
 119. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC y cols. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 309 (5734): 623-6.
 120. Lindenbach BD, Pragai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F y cols. 2007. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol.* 81 (17): 8905-18.
 121. Lindenbach BD and Rice CM. 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 436 (7053): 933-8.
 122. Liu MA. 2011. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev.* 239 (1): 62-84.
 123. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P y cols. 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (27): 10149-54.
 124. Lorenzo LJ, Garcia O, Acosta-Rivero N, Dueñas-Carrera S, Martinez G, Alvarez-Obregon J y cols. 2000. Expression and immunological evaluation of the Escherichia coli-derived hepatitis C virus envelope E1 protein. *Biotechnol Appl Biochem.* 32 (Pt 2): 137-43.
 125. Lotfy M, El Kady IM, Nasif WA, El Kenawy AE, Badra G. 2006. Distinct serum immunoglobulin pattern in Egyptian patients with chronic HCV infection analyzed by nephelometry. *J Immunoassay Immunochem.* 27 (1): 103-14.

-
126. Lowrie DB. 2003. DNA vaccination: an update. *Methods Mol Med.* 87:377-90.
 127. Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N y cols. 2004. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol.* 172 (3): 1744-53.
 128. Macdonald A and Harris M. 2004. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol.* 85 (Pt 9): 2485-502.
 129. Maher JJ. 2001. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis.* 21 (3): 417-26.
 130. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. 2008. Acute hepatitis C. *Lancet.* 372 (9635): 321-32.
 131. Maillard P, Huby T, Andreo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A. 2006. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J.* 20 (6): 735-7.
 132. Malcolm BA, Liu R, Lahser F, Agrawal S, Belanger B, Butkiewicz N y cols. 2006. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 50 (3): 1013-20.
 133. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* 55 (9): 1350-9.
 134. Martinez-Donato G, Acosta-Rivero N, Morales-Grillo J, Musacchio A, Vina A, Alvarez C y cols. 2006. Expression and processing of hepatitis C virus structural proteins in *Pichia pastoris* yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 342 (2): 625-31.
 135. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J y cols. 2009. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 361 (6): 580-93.
 136. Mehta SH, Cox A, Hoover DR, Wang XH, Mao Q, Ray S y cols. 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet.* 359 (9316): 1478-83.
 137. Min B, Yamane H, Hu-Li J, Paul WE. 2005. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J Immunol.* 174 (10): 6039-44.
 138. Mohler VL, Heithoff DM, Mahan MJ, Hornitzky MA, Thomson PC, House JK. 2012. Development of a novel in-water vaccination protocol for DNA adenine methylase deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine in adult sheep. *Vaccine.* 30 (8): 1481-91.
 139. Morice Y, Ratinier M, Miladi A, Chevaliez S, Germanidis G, Wedemeyer H y cols. 2009. Seroconversion to hepatitis C virus alternate reading frame protein during acute infection. *Hepatology.* 49 (5): 1449-59.
 140. Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE y cols. 2006. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology.* 43 (3): 573-80.
 141. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* 362 (6422): 758-61.

-
142. Nagayama R, Miyake K, Tsuda F, Okamoto H. 1994. IgM antibody to a hepatitis C virus core peptide (CP14) for monitoring activity of liver disease in patients with acute or chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 42 (3): 311-7.
 143. Naggie S. 2012. Management of hepatitis C virus infection: the basics. *Top Antivir Med.* 20 (5): 154-61.
 144. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42 (9): 3858-63.
 145. Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. 1996. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology.* 24 (4): 759-65.
 146. Negro F, Abate ML, Mondardini A, Baldi M, Leandro G, Lombardi S y cols. 1995. The fluctuations of hepatitis C virus RNA and IgM anti-HCV (core) serum levels correlate with those of alanine aminotransferases during the hepatitis relapses of patients treated with interferon. *J Viral Hepat.* 2 (4): 171-4.
 147. Nelson DR, Zeuzem S, Andreone P, Ferenci P, Herring R, Jensen DM y cols. 2012. Balapiravir plus peginterferon alfa-2a (40KD)/ribavirin in a randomized trial of hepatitis C genotype 1 patients. *Ann Hepatol.* 11 (1): 15-31.
 148. Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. 2005. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol.* 32 (2): 75-85.
 149. Nevens F, Roskams T, Van Vlierberghe H, Horsmans Y, Sprengers D, Elewaut A y cols. 2003. A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 38 (5): 1289-96.
 150. Neville JA, Prescott LE, Bhattacharjee V, Adams N, Pike I, Rodgers B y cols. 1997. Antigenic variation of core, NS3, and NS5 proteins among genotypes of hepatitis C virus. *J Clin Microbiol.* 35 (12): 3062-70.
 151. Nuti S, Rosa D, Valiante NM, Saletti G, Caratozzolo M, Dellabona P y cols. 1998. Dynamics of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for V α 24⁺ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur J Immunol.* 28 (11): 3448-55.
 152. Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Ueda K, Takehara T y cols. 2004. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem.* 279 (12): 11719-26.
 153. Onoe T, Kalscheuer H, Chittenden M, Zhao G, Yang YG, Sykes M. 2010. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of human T cells depend on peripheral interactions with APCs. *J Immunol.* 184 (12): 6756-65.
 154. Op De BA, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z y cols. 2004. Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol.* 78 (6): 2994-3002.
 155. Otto GA and Puglisi JD. 2004. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell.* 119 (3): 369-80.
 156. Palenzuela DO, Pedroso S, Roca J, Villareal A, Lemos G, Reyes O y cols. 2006. A new NS3 recombinant protein shows improved antigenic properties for HCV diagnosis. *Biotechnología Aplicada.* 23 (2): 94-8.
 157. Pawlotsky JM. 2012. New antiviral agents for hepatitis C. *F1000 Biol Rep.* 4: 5-12.

-
158. Pawlotsky JM, Chevaliez S,McHutchison JG. 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*. 132 (5): 1979-98.
 159. Pawlowska M, Pilarczyk M, Foksinska A, Smukalska E, Halota W. 2011. Hematological Adverse events and Sustained Viral Response in Children Undergoing Therapy for Chronic Hepatitis C Infection. *Hepat Mon*. 11 (12): 968-74.
 160. Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais PO, Deleage G, Pawlotsky JM. 2001. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol*. 75 (12): 5703-10.
 161. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 39 (1): 5-19.
 162. Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pilli M, Mori C, Zanelli P y cols. 2002. Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 35 (5): 1225-36.
 163. Persico M, Perrotta S, Persico E, Terracciano L, Folgori A, Ruggeri L y cols. 2006. Hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels: biological peculiarities and update of the natural history of liver disease at 10 years. *J Viral Hepat*. 13 (5): 290-6.
 164. Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL y cols. 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (14): 6025-30.
 165. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R y cols. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282 (5390): 938-41.
 166. Pockros PJ, Nelson D, Godofsky E, Rodriguez-Torres M, Everson GT, Fried MW y cols. 2008. R1626 plus peginterferon Alfa-2a provides potent suppression of hepatitis C virus RNA and significant antiviral synergy in combination with ribavirin. *Hepatology*. 48 (2): 385-97.
 167. Poordad F, Bronowicki JP, Gordon SC, Zeuzem S, Jacobson IM, Sulkowski MS y cols. 2012. Factors That Predict Response of Patients With Hepatitis C Virus Infection to Boceprevir. *Gastroenterology*. 143 (3): 608-18.
 168. Poordad F and Dieterich D. 2012. Treating hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. *J Viral Hepat*. 19 (7): 449-64.
 169. Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P y cols. 2004. 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*. 189 (10): 1846-55.
 170. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G y cols. 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*. 352 (9138): 1426-32.
 171. Prince AM, Brotman B, Lee DH, Ren L, Moore BS, Scheffel JW. 1999. Significance of the anti-E2 response in self-limited and chronic hepatitis C virus infections in chimpanzees and in humans. *J Infect Dis*. 180 (4): 987-91.
 172. Quiroga JA, van Binsbergen J, Wang CY, Pardo M, Navas S, Trines C y cols. 1995. Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus core antigen: correlations with viral replication, histological activity, and liver disease outcome. *Hepatology*. 22 (6): 1635-40.

-
173. Resúmenes ISVHLD. 2006. Abstracts of the 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris, France, July 1-5, 2006. *J Clin Virol.* 36 (Suppl 2): S1-218.
 174. Rigopoulou EI, Abbott WG, Williams R, Naoumov NV. 2007. Direct evidence for immunomodulatory properties of ribavirin on T-cell reactivity to hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 75 (1): 36-42.
 175. Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarselli E, Acali S y cols. 2003. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol.* 77 (3): 1856-67.
 176. Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky JM y cols. 2006. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 194 (7): 895-903.
 177. Roohvand F and Kossari N. 2012. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert Opin Ther Pat.* 22 (4): 391-415.
 178. Ryoo SR, Jang H, Kim KS, Lee B, Kim KB, Kim YK y cols. 2012. Functional delivery of DNAzyme with iron oxide nanoparticles for hepatitis C virus gene knockdown. *Biomaterials.* 33 (9): 2754-61.
 179. Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH y cols. 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (20): 11646-51.
 180. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Kinjo F, Saito A y cols. 1998. Relation between reactivity to the NS-4 region peptides of hepatitis C virus (HCV) and clinical features among patients infected with HCV genotype 1b. *Microbiol Immunol.* 42 (4): 299-303.
 181. Sallberg M, Frelin L, Weiland O. 2009. DNA vaccine therapy for chronic hepatitis C virus (HCV) infection: immune control of a moving target. *Expert Opin Biol Ther.* 9 (7): 805-15.
 182. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz dC, Baixeras E, Labarga P y cols. 2002. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol.* 76 (10): 5062-70.
 183. Sarrazin C, Rouzier R, Wagner F, Forestier N, Larrey D, Gupta SK y cols. 2007. SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology.* 132 (4): 1270-8.
 184. Saxena V, Lai CK, Chao TC, Jeng KS, Lai MM. 2012. Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol.* 86 (8): 4139-50.
 185. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G y cols. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21 (19): 5017-25.
 186. Schirren CA, Jung MC, Gerlach JT, Worzfeld T, Baretton G, Mamin M y cols. 2000. Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology.* 32 (3): 597-603.
 187. Schlaphoff V, Klade CS, Jilma B, Jelovcan SB, Cornberg M, Tauber E y cols. 2007. Functional and phenotypic characterization of peptide-vaccine-induced HCV-specific CD8+ T cells in healthy individuals and chronic hepatitis C patients. *Vaccine.* 25 (37-38): 6793-806.

-
188. Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, Penin F, Rice CM, Blum HE y cols. 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 276 (47): 44052-63.
 189. Schulze Zur WJ, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE y cols. 2005. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol.* 175 (6): 3603-13.
 190. Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, Wiese M, Wedemeyer H y cols. 2004. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest.* 114 (2): 250-9.
 191. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A y cols. 2005. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology.* 41 (5): 1019-28.
 192. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 5 (9): 558-67.
 193. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA y cols. 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 197 (12): 1645-55.
 194. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S y cols. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 42 (4): 962-73.
 195. Sir D, Kuo CF, Tian Y, Liu HM, Huang EJ, Jung JU y cols. 2012. Replication of hepatitis C virus RNA on autophagosomal membranes. *J Biol Chem.* 287 (22): 18036-43.
 196. Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, Burton JR, Jr., Tester IA, Wang CC y cols. 2008. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 197 (1): 46-57.
 197. Smyk-Pearson S, Tester IA, Lezotte D, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Rosen HR. 2006. Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: implications for vaccine design. *J Infect Dis.* 194 (4): 454-63.
 198. Song Y, Friebe P, Tzima E, Junemann C, Bartenschlager R, Niepmann M. 2006. The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol.* 80 (23): 11579-88.
 199. Spangenberg HC, Viazov S, Kersting N, Neumann-Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M y cols. 2005. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 42 (4): 828-37.
 200. Sreenarasimhaiah J, Jaramillo A, Crippin J, Lisker-Melman M, Chapman WC, Mohanakumar T. 2003. Lack of optimal T-cell reactivity against the hepatitis C virus is associated with the development of fibrosis/cirrhosis during chronic hepatitis. *Hum Immunol.* 64 (2): 224-30.
 201. Steinmann D, Barth H, Gissler B, Schurmann P, Adah MI, Gerlach JT y cols. 2004. Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *J Virol.* 78 (17): 9030-40.
 202. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A y cols. 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med.* 6 (5): 578-82.

-
203. Tao W, Xu C, Ding Q, Li R, Xiang Y, Chung J y cols. 2009. A single point mutation in E2 enhances hepatitis C virus infectivity and alters lipoprotein association of viral particles. *Virology*. 395 (1): 67-76.
 204. Tarr AW, Owsianka AM, Jayaraj D, Brown RJ, Hickling TP, Irving WL y cols. 2007. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J Gen Virol*. 88 (Pt 11): 2991-3001.
 205. Tchao NK and Turka LA. 2012. Lymphodepletion and homeostatic proliferation: implications for transplantation. *Am J Transplant*. 12 (5): 1079-90.
 206. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C y cols. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (24): 15661-8.
 207. Thimme R, Lohmann V, Weber F. 2006. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res*. 69 (3): 129-41.
 208. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 194 (10): 1395-406.
 209. Tsubota A, Shimada N, Yoshizawa K, Furihata T, Agata R, Yumoto Y y cols. 2012. Contribution of ribavirin transporter gene polymorphism to treatment response in peginterferon plus ribavirin therapy for HCV genotype 1b patients. *Liver Int*. 32 (5): 826-36.
 210. Urbani S, Amadei B, Fisicaro P, Tola D, Orlandini A, Sacchelli L y cols. 2006. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology*. 44 (1): 126-39.
 211. Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M y cols. 2002. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol*. 76 (24): 12423-34.
 212. Vasan S, Hurley A, Schlesinger SJ, Hannaman D, Gardiner DF, Dugin DP y cols. 2011. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One*. 6 (5): e19252.
 213. Vasan S, Schlesinger SJ, Huang Y, Hurley A, Lombardo A, Chen Z y cols. 2010. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of ADVAX, a multigenic, DNA-based clade C/B' HIV-1 candidate vaccine. *PLoS One*. 5 (1): e8617.
 214. Vauloup-Fellous C, Pene V, Garaud-Aunis J, Harper F, Bardin S, Suire Y y cols. 2006. Signal peptide peptidase-catalyzed cleavage of hepatitis C virus core protein is dispensable for virus budding but destabilizes the viral capsid. *J Biol Chem*. 281 (38): 27679-92.
 215. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z y cols. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 11 (7): 791-6.
 216. Wedemeyer H, Schuller E, Schlaphoff V, Stauber RE, Wiegand J, Schiefke I y cols. 2009. Therapeutic vaccine IC41 as late add-on to standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *Vaccine*. 27 (37): 5142-51.
 217. World Health Organization. 1997. Hepatitis C: global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec*. 72 (46): 341-4.
 218. World Health Organization. 2004. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol*. 44 (1): 20-9.

-
219. Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S y cols. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 20 (14): 3840-8.
 220. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. 2006. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (7): 2310-5.
 221. Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Rehermann B. 2009. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology.* 49 (1): 12-21.
 222. Yu MY, Bartosch B, Zhang P, Guo ZP, Renzi PM, Shen LM y cols. 2004. Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (20): 7705-10.
 223. Yuki N, Hayashi N, Mita E, Hagiwara H, Oshita M, Ohkawa K y cols. 1995a. Clinical characteristics and antibody profiles of chronic hepatitis C patients: relation to hepatitis C virus genotypes. *J Med Virol.* 45 (2): 162-7.
 224. Yuki N, Hayashi N, Ohkawa K, Hagiwara H, Oshita M, Katayama K y cols. 1995b. The significance of immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 22 (2): 402-6.
 225. Yutani S, Komatsu N, Shichijo S, Yoshida K, Takedatsu H, Itou M y cols. 2009. Phase I clinical study of a peptide vaccination for hepatitis C virus-infected patients with different human leukocyte antigen-class I-A alleles. *Cancer Sci.* 100 (10): 1935-42.
 226. Yutani S, Yamada A, Yoshida K, Takao Y, Tamura M, Komatsu N y cols. 2007. Phase I clinical study of a personalized peptide vaccination for patients infected with hepatitis C virus (HCV) 1b who failed to respond to interferon-based therapy. *Vaccine.* 25 (42): 7429-35.
 227. Zeisel MB, Fafi-Kremer S, Fofana I, Barth H, Stoll-Keller F, Doffoel M y cols. 2007. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 13 (36): 4824-30.
 228. Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Rajender RK, Marcellin P, Diago M, Craxi A y cols. 2012. Optimized threshold for serum HCV RNA to predict treatment outcomes in hepatitis C patients receiving peginterferon alfa-2a/ribavirin. *J Viral Hepat.* 19 (11): 766-74.
 229. Zhang ZX, Milich DR, Peterson DL, Birkett A, Schvarcz R, Weiland O y cols. 1997. Interferon-alpha treatment induces delayed CD4 proliferative responses to the hepatitis C virus nonstructural protein 3 regardless of the outcome of therapy. *J Infect Dis.* 175 (6): 1294-301.

AUTOBIBLIOGRAFÍA

1. *Relacionada con la tesis*

1. **Amador Cañizares, Y**, Alvarez-Lajonchere, L, Guerra, I, Rodríguez-Alonso, I, Martínez-Donato, G, Triana, J, González-Horta, EE, Pérez, A, Dueñas-Carrera, S. 2008. Induction of IgA and sustained deficiency of cell proliferative response in chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* 14[44]: 6844-6852.
2. Alvarez-Lajonchere, L, Shoukry, NH, Grá, B, **Amador Cañizares, Y**, Helle, F, Bédard, N, Guerra, I, Drouin, C, Dubuisson, J, González-Horta, EE, Martínez, G, Marante, J, Cinza, Z, Castellanos, M, Dueñas Carrera, S. 2009. Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV-chronically infected individuals in a Phase I clinical trial. *J. Viral Hepat.* 16: 156–167.
3. **Y. Amador-Cañizares**, G. Martínez-Donato, L. Álvarez-Lajonchere, C. Vasallo, M. Dausá, D. Aguilar-Noriega, C. Valenzuela, I. Raíces, J. Dubuisson, C. Wychowski, Z. Cinza-Estévez, M. Castellanos, M. Núñez, A. Armas, YJ González, I. Revé, I. Guerra, Á. Pérez Aguiar, S. Dueñas-Carrera. HCV-specific immune responses induced by CIGB-230 in combination with IFN- α plus ribavirin. *World Journal of Gastroenterology* 2013. En revision.

2. *No relacionada con la tesis*

1. Hepatitis C virus (HCV): ever in reliable partnerships? **Amador-Cañizares Yalena** y Dueñas-Carrera Santiago. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (12), pp. 1259-1270, 16 June 2006.
2. Ultrastructural and Immunological Characterization of Hepatitis C Core Protein-DNA Plasmid Complexes. Acosta-Rivero N, Aguilera Y, Falcon V, Poutou J, Musacchio A, Alvarez-Lajonchere A, Guerra I, Alvarez-Obregón JC, **Amador-Cañizares Y** y cols. *Am J Immunol* 2006; 2(3):67-72.
3. Generation and characterization of recombinant vaccinia viruses expressing a hepatitis C virus Core protein, genotype 1b, individually or as a polyprotein. Liz Alvarez-Lajonchere, Ivis Guerra, **Yalena Amador-Cañizares** y cols. *Biotecnología Aplicada* 2007; 24 (3-4):246-253.
4. Immunization with a recombinant fowlpox virus expressing a hepatitis C virus core-E1 polyprotein variant, protects mice and African green monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) against challenge with a surrogate vaccinia virus. Alvarez-Lajonchere L, **Amador-Cañizares Y** y cols. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2008) 51, 97–105.
5. Plasmid DNA Recovery Using Size-Exclusion and Perfusion Chromatography. Miladys Limonta; Gabriel Márquez; Isabel Rey; Martha Pupo, **Yalena Amador Cañizares** and Santiago Dueñas-Carrera. *BioPharm Internacional*, 2008; 21(9): 38-48.
6. Toxicology and biodistribution study of CIGB-230, a DNA vaccine against hepatitis C virus. Dania Bacardí, **Yalena Amador-Cañizares** y cols. *Human Experimental Toxicology*, 2009 28(8):479-91.
7. Early interferon-based treatment after detection of persistent hepatitis C virus infection: a critical decision. **Yalena Amador-Cañizares**, Santiago Dueñas-Carrera. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2010 30(11). [Epub ahead of print]
8. Ratio of HCV structural antigens in protein based vaccine formulations is critical for functional immune response induction. Gillian Martínez-Donato, Alexis Musacchio, Liz Alvarez-Lajonchere, Nelson Acosta-Rivero, **Yalena Amador** y cols. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2010 56(3):111-8.
9. Analysis of hepatitis C virus core encoding sequences in chronically infected patients reveals mutability, predominance, genetic history and potential impact on therapy of Cuban genotype 1b isolates. González-Horta EE, Marante J, **Amador-Cañizares Y** y cols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15 (11): 1320-1327.
10. Evaluation of Drug Toxicity for DNA Vaccine Candidates Against Infectious Diseases: Hepatitis C as Experimental Model. Book Chapter 14. Source: Toxicity and Drug Testing. Bacardí D, Cosme K, Suárez J, **Amador-Cañizares Y**, Dueñas-Carrera S. ISBN 978-953-51-0004-1. Edited by: William Acree. Publisher: InTech, 2012: 321-344.
11. Interferon-based treatment as adjuvant therapy for hepatitis C virus vaccine candidates against chronic infection. **Yalena Amador Cañizares**. *Biotecnología Aplicada* 2011; 28:123-129.

ANEXOS

Anexo 1. Respuesta de secreción de IFN- γ en los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

T0						
Paciente	Cápsida	E1	E2	NS3	CEF	PMA
1	0	0	0	0	1	1
2	0	0	0	0	0	1
3	0	1	0	0	1	1
4	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	1	1
7	1	0	0	0	1	1
8	0	0	0	0	0	1
9	1	0	0	0	1	1
10	1	1	0	0	1	1
11	0	0	0	0	0	1
12	1	0	1	1	1	1
13	0	1	1	0	1	1
14	0	0	0	0	1	1
15	1	0	0	0	0	1

T24						
Paciente	Cápsida	E1	E2	NS3	CEF	PMA
1	1	0	0	0	1	1
2	0	1	0	0	0	1
3	1	1	0	1	1	1
4	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	1	1
7	1	0	0	0	1	1
8	0	0	0	0	0	1
9	1	0	0	1	1	1
10	0	1	0	1	1	1
11	1	0	0	1	1	1
12	1	0	0	1	1	1
13	1	1	1	0	1	1
14	1	0	0	0	1	1
15	1	0	0	0	0	1

Los resultados se muestran de acuerdo a si la respuesta fue detectable (1) o no detectable (0).

El ensayo de ELISPOT se realizó con mezclas de péptidos solapados correspondientes a las proteínas virales de la cápsida, E1, E2 y NS3. PMA y CEF fueron los controles positivos inespecífico y específico, respectivamente.

Anexo 2. Datos primarios de la histología hepática de los pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

Paciente	Necroinflamación		Fibrosis		Actividad histológica total	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24
1	4	5	0	1	4	6
2	6	7	2	1	8	8
3	3	1	0	1	3	2
4	1	3	1	0	2	3
5	3	4	1	1	4	5
6	2	4	2	3	4	7
7	2	2	1	0	3	2
8	7	ne	5	ne	12	ne
9	4	2	2	0	6	2
10	2	0	2	0	4	0
11	2	4	0	0	2	4
12	3	1	1	0	4	1
13	2	3	1	0	3	3
14	4	ne	0	ne	4	ne
15	3	4	1	2	4	6
Promedio	3,2	3,08	1,27	0,69	4,47	3,77
DE	1,6	1,9	1,3	0,9	2,6	2,5

Estos resultados se obtuvieron por biopsia hepática analizada de acuerdo al índice de Ishak (Ishak y cols., 1995).

Actividad histológica total= Necroinflamación + Fibrosis. Se señalan en negritas los valores que indican estabilización (no variación) o mejoría (reducción) de la actividad histológica total.

Abreviaturas: DE, desviación estándar; ne, No evaluado; T0, evaluación realizada antes de iniciar el tratamiento; T24, evaluación realizada en semana 24.

Anexo 3. Datos primarios de la respuesta proliferativa contra los antígenos NS3 y E1 y de la necroinflamación de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia

Paciente	Prolif NS3_0	Prolif NS3_24	Prolif E1_0	Prolif E1_24	necroinfl 0	necroinfl 24
1	nd	nd	<i>0,16</i>	6,27	4	5
2	<i>1,43</i>	<i>0,52</i>	2,08	3,41	6	7
3	1,13	1,62	4,02	2,84	3	1
4	0,35	2,38	<i>1,35</i>	3,07	1	3
5	1,64	1,81	1,84	3,29	3	4
6	1,04	nd	nd	nd	2	4
7	5,40	<i>0,65</i>	nd	2,74	2	2
8	10,90	2,07	nd	1,17	7	nd
9	4,83	2,37	4,17	<i>0,98</i>	4	2
10	0,90	0,93	<i>2,49</i>	<i>0,96</i>	2	0
11	0,69	5,86	<i>0,76</i>	4,14	2	4
12	1,22	1,18	1,68	2,57	3	1
13	1,88	4,72	3,04	1,08	2	3
14	5,11	1,99	2,75	1,04	4	nd
15	0,50	4,33	<i>0,58</i>	<i>2,42</i>	3	4
Promedio	2,65	2,34	2,08	2,57	3,20	3,08

Los datos de proliferación se ofrecen como índice de estimulación. Los resultados de necroinflamación se obtuvieron por biopsia hepática analizada de acuerdo al índice de Ishak (Ishak y cols., 1995).

En negritas se indican los valores de linfoproliferación que se encuentran por encima del valor de corte del ensayo (2,5). En cursivas se indican los valores que se modificaron en al menos un factor igual a 2 en sentido inverso al comportamiento histológico para el caso de NS3 y en el mismo sentido, para el caso del antígeno E1.

Abreviaturas: nd, no disponible; necroinfl, necroinflamación; prolif, proliferación.

Anexo 4. Salida de resultados del análisis de correspondencias entre la respuesta celular contra más de un antígeno estructural y la mejoría o estabilización de la fibrosis hepática en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 como monoterapia.

Correspondence Table

fibrosis_mejor_e stab	multiAg		
	0	1	Active Margin
0	3	2	5
1	0	9	9
Active Margin	3	11	14

Summary

Dimensi on	Singular Value	Inertia	Chi Square	Sig.	Proportion of Inertia		Confidence Singular Value
					Accounted for	Cumulative	Standard Deviation
1	,701	,491			1,000	1,000	,167
Total		,491	6,873	,009 ^a	1,000	1,000	

a. 1 degrees of freedom

Estos resultados se obtuvieron con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.)

Anexo 5. Respuesta inmune específica contra antígenos del VHC en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina

		Grupo control			Grupos inmunizados		
		T0	T48	Valor de p [†]	T0	T48	Valor de p [†]
Título de anticuerpos IgG	cápsida	30056	17914	< 0,001	43335	29243	< 0,001
	E2	325,9	222,8	0,12	421,8	310,6	0,08
	NS3	15907	9684	0,002	11058	6152	< 0,001
CFP/10 ⁶ células	cápsida	160,5	65,28	0,005	227,2	67,87	0,13
	E2	74,45	35,61	0,04	90,3	17,73	0,02
	NS3	82,62	32,79	0,03	98,87	16,15	0,13
IE	cápsida	1,192	0,8128	0,06	1,710	1,644	0,01
	E2	1,531	1,654	0,67	1,49	1,005	0,27
	NS3	1,258	0,9595	0,78	1,409	1,291	0,06

Abreviaturas: CFP, células formadoras de puntos; IE, índice de estimulación

[†] Se refiere a la comparación entre T0 y T48. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.

Anexo 6. Salida de resultados del análisis de correspondencias entre el aumento en un factor de al menos 1,5 en la actividad neutralizante de los anticuerpos y la capacidad para alcanzar la respuesta virológica sostenida en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina (grupo T6).

Correspondence Table

Aum_AcN	RVS		
	0	1	Active Margin
0	4	6	10
1	3	0	3
Active Margin	7	6	13

Summary

Dimensión	Singular Value	Inertia	Chi Square	Sig.	Proportion of Inertia		Confidence Singular Value
					Accounted for	Cumulative	Standard Deviation
1	,507	,257			1,000	1,000	,155
Total		,257	3,343	,067 ^a	1,000	1,000	

a. 1 degrees of freedom

Estos resultados se obtuvieron con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.)

Anexo 7. Salida de resultados del análisis de correspondencias entre el aumento en un factor de al menos 1,5 en la secreción de IFN- γ y la capacidad para alcanzar la respuesta virológica sostenida en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina (grupo T6).

Correspondence Table

aum_15_ElIcor e_g4	ARN_72_g4		
	0	1	Active Margin
0	3	7	10
1	2	0	2
Active Margin	5	7	12

Summary

Dimensi on	Singular Value	Inertia	Chi Square	Sig.	Proportion of Inertia		Confidence Singular Value
					Accounted for	Cumulative	Standard Deviation
1	,529	,280			1,000	1,000	,180
Total		,280	3,360	,067 ^a	1,000	1,000	

a. 1 degrees of freedom

Estos resultados se obtuvieron con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.)

Anexo 8. Salida de resultados del análisis de correspondencias entre el aumento en un factor de al menos 1,5 en la secreción de IFN- γ y/o la respuesta de anticuerpos neutralizantes y la capacidad para alcanzar la respuesta virológica sostenida en pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina (grupo T6).

Correspondence Table

g4ARN_72	g4_aumAcNyELI		
	0	1	Active Margin
0	3	4	7
1	6	0	6
Active Margin	9	4	13

Summary

Dimensi on	Singular Value	Inertia	Chi Square	Sig.	Proportion of Inertia		Confidence Singular Value
					Accounted for	Cumulative	Standard Deviation
1	,617	,381			1,000	1,000	,157
Total		,381	4,952	,026 ^a	1,000	1,000	

a. 1 degrees of freedom

Estos resultados se obtuvieron con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.)

Anexo 9. Salida de resultados del análisis de correspondencias entre la respuesta proliferativa contra la proteína E2 en T0 y la capacidad para eliminar el ARN viral en T48 en pacientes tratados con IFN- α -2b y ribavirina (grupo control).

Correspondence Table

control_IE_E2_ T0	ARN_pos_control_T48		
	0	1	Active Margin
0	16	5	21
1	1	3	4
Active Margin	17	8	25

Summary

Dimensi on	Singular Value	Inertia	Chi Square	Sig.	Proportion of Inertia		Confidence Singular Value
					Accounted for	Cumulative	Standard Deviation
1	,402	,162			1,000	1,000	,197
Total		,162	4,046	,044 ^a	1,000	1,000	

a. 1 degrees of freedom

Estos resultados se obtuvieron con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.)

Anexo 10. Salida de resultados del análisis de correspondencias entre la respuesta proliferativa contra la proteína E2 en T48 y la capacidad para eliminar el ARN viral en T48 en pacientes tratados con IFN- α -2b y ribavirina (grupo control).

Correspondence Table

control_IE_E2_t 48	ARN_pos_control_T48		
	0	1	Active Margin
0	16	5	21
1	0	2	2
Active Margin	16	7	23

Summary

Dimensi on	Singular Value	Inertia	Chi Square	Sig.	Proportion of Inertia		Confidence Singular Value
					Accounted for	Cumulative	Standard Deviation
1	,467	,218			1,000	1,000	,155
Total		,218	5,007	,025 ^a	1,000	1,000	

a. 1 degrees of freedom

Estos resultados se obtuvieron con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.)

Anexo 11. Datos primarios de la respuesta proliferativa contra el antígeno E2 y de la fibrosis de pacientes tratados con la preparación vacunal CIGB-230 en combinación con IFN- α -2b y ribavirina (todos los pacientes)

Paciente	prolif E2 0	prolif E2 48	Fibro 0	Fibro 72
1	0,98	0,71	1	5
2	3,15	2,30	2	1
3	1,38	1,39	1	1
4	1,50	2,11	2	2
5	<i>0,29</i>	<i>0,05</i>	1	1
6	3,45	<i>1,04</i>	3	5
7	<i>0,50</i>	<i>1,42</i>	1	1
8	4,64	3,07	1	1
9	2,29	0,09	1	0
10	0,42	0,44	0	0
11	1,47	1,08	3	2
12	0,59	0,31	1	2
13	0,82	0,87	4	0
14	0,86	0,99	0	1
15	<i>1,40</i>	<i>0,52</i>	2	2
16	<i>0,40</i>	<i>0,96</i>	0	0
17	<i>1,11</i>	<i>0,44</i>	0	0
18	2,23	<i>0,43</i>	2	2
19	<i>1,10</i>	3,75	1	1
20	0,44	1,59	1	3
21	0,96	0,63	2	2
22	0,88	0,64	3	3
23	<i>1,10</i>	<i>0,48</i>	1	2
24	2,71	0,00	5	2
25	<i>1,43</i>	<i>0,20</i>	0	1
26	2,74	0,72	1	0
27	7,39	<i>1,39</i>	1	1
28	0,83	0,57	1	0
29	0,92	1,00	1	1
30	0,67	0,79	0	0
31	<i>1,95</i>	<i>0,36</i>	3	3
32	2,55	1,35	1	1
33	<i>0,52</i>	<i>0,12</i>	1	1
34	<i>1,94</i>	<i>0,19</i>	1	4
35	7,87	1,29	3	2
36	3,69	<i>1,26</i>	0	0
37	1,80	1,41	4	1
38	1,75	1,22	4	2
39	3,45	<i>0,37</i>	4	5
40	2,57	1,73	3	4
41	0,79	0,54	0	1
Promedio	1,89	0,97	1,61	1,61

Los datos de proliferación se ofrecen como índice de estimulación. Los resultados de fibrosis se obtuvieron por biopsia hepática analizada de acuerdo al índice de Ishak (Ishak y cols., 1995).

En negritas se indican los valores de linfoproliferación que se encuentran por encima del valor de corte del ensayo (2,5). En cursivas se indican los valores que se modificaron en al menos un factor igual a 2 en sentido inverso al comportamiento histológico. Solo se muestran los pacientes que tenían todos los datos disponibles.

Abreviaturas: fibro, fibrosis; prolif, proliferación.