



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Bases inmunogenéticas que participan en la
inmunopatogenia de la Hepatitis viral C (HCV) y
la Hepatitis Autoinmune tipo I (HAI)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Natalia Paladino

Director de Tesis: Prof. Dr. Leonardo Fainboim

Consejero de Estudios: Dr. Omar Cosso

Tesis realizada en el Laboratorio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas
“José de San Martín” de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos
Aires.

Buenos Aires, 2008

Bases inmunogenéticas que participan en la inmunopatogenia de la Hepatitis viral C (HCV) y la Hepatitis Autoinmune tipo I (HAI)

Este trabajo de tesis se concentró en dos actores de la inmunidad; citocinas, en particular IL-10 y TGF- β 1; y un componente central de la inmunidad innata, las células NK. El accionar de estos actores fue evaluado en el daño tisular inducido después de la infección por el virus de la hepatitis C (HCV) y durante el desarrollo de la hepatitis autoinmune de tipo I (HAI).

La HCV se encontró asociada a polimorfismos de alta producción de ambas citocinas, restringido a mujeres en el caso de IL-10. El efecto antifibrótico de IL-10 junto con la acción profibrótica de TGF- β 1 pudo corroborarse en esta patología. En cuanto a las células NK, los análisis genéticos mostraron diferentes receptores KIR activadores de citotoxicidad asociados con la evolución crónica y la cirrosis. Adicionalmente se observó un aumentado porcentaje de células NK KIR+, principalmente de NK CD56^{bright}. Este hallazgo podría estar relacionado con la maduración de esta subpoblación hacia las CD56^{dim} citotóxicas.

En HAI, se analizó el patrón de mRNA de citocinas en el hígado, observándose un perfil Th1 (IFN- γ , IL-12_{p40}, IL-12R β 2, IL-18) junto con IL-4 en pacientes pediátricos, mientras que los adultos presentan IFN- γ pero no IL-4. Elevados niveles de TGF- β 1 junto con valores normales de IL-10 en la patología pediátrica fueron confirmados a nivel de mRNA y de polimorfismos genéticos. Por último, se observó una asociación de la HAI con genes KIR activadores de citotoxicidad, este hallazgo podría estar relacionado con la presencia de células NKT reportada en HAI pediátrica, pudiendo ser estas las responsables de la secreción de IL-4.

Palabras claves: IL-10, TGF- β 1, células NK, receptores KIR, Hepatitis viral C (HCV), Hepatitis Autoinmune tipo I (HAI),

Role of Immunogenetics in the pathogenesis of liver diseases induced after an infection by HCV and during the development of type I autoimmune hepatitis

This work put focus on two actors of the immunity; cytokines, particularly IL-10 and TGF- β 1, and NK cells, a innate immunity central component, in the evolution of two immune mediated pathologies: an infectious one, like the hepatitis by virus C (HCV) and during the development of the type I autoimmune hepatitis (HAI).

The over expression of both cytokines was reported in HCV infection. Our data confirmed their immunopathogenic role at genetic level. Additionally, we observed a gender effect in the association with IL-10. The antifibrotic effect of IL-10 and the profibrotic action of TGF- β 1 could be corroborated in this pathology. As part of the innate immunity, the genetic analysis of KIR receptors in NK cells reveal the presence of cytotoxicity activating receptors associated with chronic evolution and cirrhosis. Additionally, studies on the membrane expression of KIR genes demonstrated a unique expression of these genes on NK CD56^{bright} of HCV patients. This last finding might be associated with the maturation state of the NK cells, probable induced by the virus infection.

In HAI, it was found the up-regulation of cytokines associated with Th1 response (IFN- γ , IL-12_{p40}, IL-12R β 2, IL-18). This profile was accompanied (only in the pediatric forms) with the up-regulation of IL-4. Increased levels of TGF- β 1 and normal values of IL-10 were confirmed both at the mRNA level and by studying genetic polymorphism associated with these cytokines. Finally, was observed an association of activating KIR genes with HAI that might be related to the reported presence of NKT cells in pediatric patients, which also could be responsible for IL-4 secretion.

Key words: IL-10, TGF- β 1, NK cells, KIR receptors, Hepatitis C virus infection (HCV), type I Autoimmune Hepatitis (HAI)

Agradecimientos

La tesis doctoral es el resultado de varios años de trabajo y son muchas las personas que hicieron posible que yo pueda llevar a cabo esta tarea con un enorme placer y disfrutando de cada momento.

En primer lugar, le agradezco a mi hija Agustina quien me llena de felicidad y me brinda su alegría y su vitalidad desde su llegada en el 2004.

A mi marido Hernán, quien compartió conmigo todos estos años de trabajo, apoyándome para seguir siempre adelante.

A mis padres, quienes me enseñaron la importancia de elegir mi carrera para poder disfrutar del trabajo diario el resto de mi vida, y me estimularon siempre a esforzarme para hacer realidad mis sueños.

A mis hermanos, por brindarme su afecto, su apoyo y su compañía durante todo este tiempo.

A Ana Claudia, la mejor compañera de trabajo que tuve y quizá que tenga en mi vida, le agradezco por su amistad, su compañerismo, su generosidad y su sinceridad.

A Mónica, Adriana, Cecilia V, Graciela, Lourdes, Andrea y Cecilia M, por compartir conmigo cada día de trabajo en el laboratorio con alegría y por brindarme su amistad y compañerismo.

A mi jefe Leonardo, por enseñarme a volar en el campo de la investigación y transmitirme su amor e interés hacia este trabajo, y por permitirme trabajar libremente y escuchar con atención mis ideas y proyectos.

Introducción

1. Hepatitis Viral C (HCV)

El virus de la Hepatitis C (HCV) es uno de los agentes infecciosos más importantes en el hombre. Por lo general, la fase aguda de la enfermedad es asintomática pero presenta un alto riesgo de desarrollar una enfermedad crónica. Entre el 70 y el 85% de los pacientes infectados evoluciona hacia la cirrosis y/o hacia el carcinoma hepatocelular. Diversos factores parecen jugar un papel en la evolución de esta infección. Entre ellos debemos incluir la edad, el sexo, el consumo de alcohol, el índice de masa corporal y la esteatosis. Asimismo, la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o con el virus de la hepatitis B (HBV) puede afectar la evolución de la enfermedad.

Los mecanismos por los cuales el virus causa el daño hepático agudo e inicia la cascada de eventos que conducen al establecimiento de la infección persistente y el consiguiente desarrollo de la enfermedad crónica no se encuentran completamente elucidados. En este sentido, se han identificado factores genéticos e inmunológicos que podrían participar en el desarrollo de esta infección (Boyer and Marcellin, 2000).

Las diferentes formas clínicas de esta enfermedad, y el hecho de que el daño tisular sea generado por el propio sistema inmune, hacen de esta patología un modelo interesante para estudiar diferentes aspectos de su fisiopatogenia. En la etapa aguda de la enfermedad, la eliminación del virus es mediada por una potente respuesta inmune de la que participan fundamentalmente las células *natural killer* (NK) y los linfocitos T helper (Th) 1.

Cuando no se produce una eficiente eliminación del virus, la persistencia de la respuesta celular genera el daño tisular y la enfermedad crónica (Khakoo SI y col., 2004).

1.1) Papel de las Citocinas

Conceptos Generales

El sistema inmune se caracteriza por su plasticidad en la naturaleza y en la magnitud de sus respuestas que proveen al organismo la capacidad de adoptar estrategias de defensa adecuadas ante distintos tipos de patógenos. La interacción en órganos linfáticos secundarios entre linfocitos T *helper* (LTh) CD4⁺ vírgenes y células presentadoras de antígeno (CPA), en particular las células dendríticas (CD), inicia la respuesta inmune específica o adaptativa. Los Th se diferencian en células efectoras, que de acuerdo con el patrón de citocinas que producen, se denominan Th1 y Th2. Los Th1 producen principalmente interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral β (TNF- β), mientras que los Th2 sintetizan interleucinas (IL) -4, -5, -9, -10 y -13. En este sentido y por extensión, a las respuestas inmunes dominadas por citocinas de tipo Th1 se las denomina de tipo I, y aquellas en las que participan las citocinas de tipo Th2 se denominan respuestas tipo II. Este concepto abarca no solamente a las células T sino a las diversas fuentes productoras de estas citocinas.

Distintos agentes infecciosos afectan la naturaleza de la interacción entre linfocitos Th vírgenes y células dendríticas e influyen en la diferenciación final hacia células Th1 o Th2. La respuesta inmune innata, además de proveer

una primera línea de defensa, cumple un papel central en la diferenciación de la respuesta adaptativa (Jankovic D. y col., 2001).

Los linfocitos Th1 son activadores de macrófagos, inducen la producción de inmunoglobulina (Ig) G2 (IgG2) involucrada en procesos de opsonización y fagocitosis, y en la diferenciación de linfocitos T CD8⁺. Por su parte, las células Th2 estimulan el crecimiento y diferenciación de mastocitos y eosinófilos y la producción de anticuerpos de diferente isotipo como IgE e IgA (que median la actividad de dichas células) e IgG1 (con función neutralizante).

Además de la naturaleza de las CPA, el microambiente de citocinas presente durante la activación linfocitaria, es determinante de la maduración de la respuesta inmune. La IL-2, IL-12 e IL-18 son necesarias para la diferenciación y el mantenimiento de una respuesta de tipo I, mientras que la IL-4 domina la diferenciación hacia una respuesta de tipo II.

La IL-12, es una citocina sintetizada principalmente por macrófagos y CD activadas. Constituye un heterodímero formado por las subunidades IL-12_{p40} e IL-12_{p35}, que son reguladas en forma independiente. La IL-12 induce respuestas Th1 a través de la diferenciación de linfocitos T y la activación de células *natural killer* (NK). En este caso se genera un *feedback* positivo ya que esta citocina estimula directamente la síntesis de IFN- γ , que a su vez induce la producción de IL-12 en las CD. La IL-12 sintetizada por macrófagos, (que son incapaces de migrar hacia los órganos linfoides), provee el microambiente necesario para el funcionamiento óptimo de los linfocitos Th1 efectores en el sitio de la inflamación. Durante la infección por diversos patógenos, la IL-12 induce la expresión temprana de IL-1 β , TNF- α y quimiocinas. Estos mediadores proinflamatorios conectan la respuesta inmune innata con la respuesta inmune

adaptativa (Trinchieri G., 1994).

La expresión del receptor de IL-12 (IL-12R) juega un papel fundamental en el mantenimiento de la respuesta a esta citocina (Szabo SJ. y col., 1997). Está compuesto por dos subunidades, IL-12R β 1 e IL-12R β 2. A diferencia de IL-12R β 1, la IL-12R β 2, que es indetectable o de muy bajo nivel de expresión en linfocitos T vírgenes, es inducida luego de su activación (Zhang M. y col., 1999) en los clones Th1, pero no en clones Th2 (Rogge L. y col., 1997; Szabo SJ. y col., 1997). Por otro lado, la sobreexpresión IL-12R β 2 ha sido descrita en patologías autoinmunes gastrointestinales como la enfermedad de Crohn (Fiocchi C. y col., 1998.; Parrello T. y col., 2000). La IL-2 induce un pequeño incremento inicial en los niveles de IL-12R β 2 en los LT vírgenes que es fuertemente estimulada por la IL-12 secretada por las CPA. Estos niveles de expresión elevados son mantenidos por la subsecuente producción de IFN- γ (Bittencourt PL. y col., 1999; Chang JT. y col., 2000).

La IL-18 es también una citocina proinflamatoria involucrada en la inducción de IL-1 β , TNF- α , quimioquinas de las familias CC y CXC y Fas-ligando (Dinarello Ch. y col., 1998). Entre las funciones *in vitro* de esta citocina se destaca su capacidad de inducir la diferenciación Th1 a través de su efecto promotor de la síntesis de IL-12R. Una regulación diferencial de la expresión de las especies precursora y madura (biológicamente activa) de IL-18 ha sido reportada en patologías autoinmunes como la enfermedad de Crohn (Monteleone G. y col., 1999; Pizarro T. y col., 1999), o/y la artritis reumatoidea (Mc Innes I. y col., 2000).

Los eventos que conducen a la diferenciación de los LT vírgenes hacia un fenotipo Th2 son menos conocidos. Se asume que se trata de una

respuesta por defecto, cuando los componentes del patógeno no estimulan en células dendríticas la producción de IL-12. Esta hipótesis se fundamenta en que la generación de respuestas Th2 no requiere adyuvantes como ocurre en las respuestas Th1. La IL-4, proveniente tanto de LT convencionales y no convencionales como de células no T, es la única citocina capaz de proveer las primeras señales para la diferenciación Th2 (Jankovic D. y col., 2001).

Los hepatocitos expresan el receptor de la IL-4, proveyendo a esta citocina la capacidad de modular este tipo celular, tanto *in vitro* (en líneas celulares) como *in vivo*. Por ejemplo, puede promover apoptosis en los hepatocitos sin requerimiento de ningún otro tipo celular, y a través de la expresión de diversas caspasas (Guillot C. y col., 2001). En humanos, la expresión de IL-4 se asocia con la inflamación severa durante la fase crónica de la hepatitis B y con patologías autoinmunes hepáticas (Shindo M. y col., 1996; Fukuda R. y col., 1995; Simpson KJ. y col., 1997; Harada K. y col., 1997). En ratones, la IL-4 es esencial para el desarrollo de lesiones hepáticas en el modelo de hepatitis autoinmune inducida por concanavalina A (Kaneko Y. y col., 2000).

Respuesta inmune a la infección por el virus de la hepatitis C

Entre el 15 y el 30% de los individuos infectados con el virus HCV lo eliminan espontáneamente (pacientes auto-limitados o RNA-). Estos pacientes generan una potente respuesta inmune mediada por células T CD4⁺ y CD8⁺, la cual esta dirigida específicamente hacia diversos antígenos virales (Lechner F, y col., 2000). En contraste, en pacientes con infección crónica, la respuesta inmune es usualmente tardía, transiente, y con una insuficiente participación

de linfocitos T (Wedemeyer H. y col., 2002). Trabajos realizados en Chimpancés experimentalmente infectados con el virus HCV mostraron que la depleción de células T CD4⁺ o CD8⁺ previene la eficiente eliminación del virus y la consiguiente recuperación clínica (Shoukry NH. y col., 2003, Grakoui A. y col., 2003).

Diferentes factores han sido postulados para tratar de explicar la ineficiente eliminación viral que ocurre en la mayoría de los individuos infectados por el HCV. En estos pacientes, las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas contra antígenos virales son generadas durante la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, presentan una pobre capacidad proliferativa y desaparecen progresivamente de la periferia (Folgori A. y col., 2006).

Un factor potencialmente importante en esta respuesta ineficiente, parecería estar jugado por las células T regulatorias (Treg). Estas células son importantes para mantener la homeostasis del sistema inmune, contribuyendo a sostener la tolerancia inmunológica hacia antígenos propios, y a controlar la respuesta inmune contra patógenos, antígenos tumorales y alloantígenos. Recientemente ha sido reportado que las células Treg son esenciales en la modulación de la respuesta inmune específica contra el virus HCV, a través de la participación de células Treg CD4⁺CD25⁺ específicas contra el virus (Cabrera R. y col., 2004) y/o por acción de Treg CD8⁺ intrahepáticas secretoras de IL-10 (Accapezzato D. y col., 2004).

Varios estudios coinciden con la participación del IFN- γ en la eliminación viral. Los niveles de esta citocina secretados por líneas de células T derivadas de pacientes auto-limitados luego de la estimulación con antígenos virales es mayor que la obtenida por células provenientes de pacientes

crónicos (Lamonaca V. y col., 1999). La infección recurrente con HCV luego del trasplante hepático es casi universal. Sin embargo, pacientes transplantados que presentan polimorfismos del gen asociados con la capacidad de producir elevados niveles de IFN- γ no mostraron recurrencia de la infección (Ben-Ari Z. y col., 2004).

Como se describió anteriormente, la IL-12 es una citocina clave en la generación de la respuesta inmune Th1 y en la estimulación de la secreción de IFN- γ . Los niveles séricos de IL-12 se mantienen incrementados luego del tratamiento exitoso con IFN- α más Ribavirina, mientras que en pacientes refractarios a la terapia retornan a los niveles basales (Amaraa R. y col., 2002).

Proteínas pertenecientes a la cápside viral del HCV son capaces de inhibir la síntesis de mRNA de la subunidad IL-12_{p40}, y por consiguiente, inhibir la producción de la citocina IL-12_{p70}, la forma funcional de la IL-12. Este efecto es inducido por la interacción de las proteínas virales con el componente C1q del complemento, sobre la superficie de los macrófagos activados (Eisen-Vandervelde AL. y col., 2004).

Una característica que acompaña a la infección crónica con HCV es el desarrollo de folículos linfoides en las áreas portales del hígado. Este hallazgo sugiere que células T vírgenes son reclutadas hacia este órgano. Cuando se lo compara con la sangre periférica, el hígado presenta un porcentaje 30 veces superior de linfocitos T específicos contra el virus. Sin embargo, la mayoría de los linfocitos T CD8⁺ intrahepáticos carecen de especificidad por el virus pero son los responsables de la secreción de IFN- γ y la modulación de la respuesta inmune hacia el establecimiento de la inflamación crónica (Tough DF. y col., 1996, He XS. y col., 1999). Se desprende de estas observaciones, que las

células T inespecíficas, (más que las anti-HCV), serían las responsables de la generación del daño tisular hepático. Experimentos de hibridación *in situ* en pacientes con HCV, confirmaron que la fuente hepática de IFN- γ son los linfocitos T, no los macrófagos, células de Kupffer o hepatocitos (Schweyer S. y col., 2000). En contraste, la IL-2 es sintetizada principalmente por los hepatocitos (Kasprzak A. y col., 2004).

La IL-18 (otra importante citocina involucrada en la generación y el mantenimiento de las respuestas Th1) se encuentra incrementada en el hígado de pacientes crónicos (Mc Guinness PH. y col., 2000) y estaría también involucrada en la generación del daño hepático. Adicionalmente, la secreción de IFN- γ por linfocitos intrahepáticos resultó prácticamente ausente en pacientes con niveles normales de transaminasas hepáticas (marcador de daño en la función del hígado) en comparación con aquellos individuos que presentan niveles elevados de estas enzimas (Rico MA. y col., 2002).

Tomadas en forma conjunta, estas evidencias parecen sugerir en primer lugar que la generación de una potente respuesta inmune Th1 en la fase aguda de la infección es esencial para erradicar al virus. Sin embargo, cuando esta respuesta inicial resulta ineficiente, se genera la inflamación crónica en la cual la respuesta Th1 se transforma en el mecanismo responsable del daño tisular.

Participación de la IL-10 en la patogénesis de la HCV

La IL-10 es una citocina de tipo Th2 con capacidad de inhibir las respuestas Th1. Elevados niveles séricos de IL-10 se hallaron en pacientes con infección crónica no tratada (Boyer and Marcellin, 2000). En este mismo sentido, en pacientes crónicamente infectados con HCV, la producción *in vitro*

de IL-10 por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) es mayor que la observada en individuos con formas auto-limitadas de la infección (Lechmann M. y col., 1999; Woitas y col., 1997). Este comportamiento también fue observado en un estudio prospectivo de pacientes con infección aguda que desarrollan la enfermedad crónica (Tai SL. y col., 1997).

La IL-10 y la fibrosis hepática

La inflamación crónica inducida por virus, toxinas o condiciones como la esteatosis alcohólica y no alcohólica, modifica el balance entre la síntesis y degradación de la matriz extracelular. Dicha alteración en la composición de la matriz permite que ocurra el proceso de fibrosis (Fainboim L. y col., 2007).

Datos clínicos y experimentales sugieren que la IL-10 puede inhibir o detener el proceso de fibrosis hepática (Nelson DR y col., 2000; Rigopoulou EI y col., 2005) y la interleucina-10 recombinante ha sido utilizada como tratamiento en pacientes con infección crónica por el virus HCV. Cuando la terapia se realizó por un corto intervalo de tiempo, el resultado fue satisfactorio promoviendo una disminución de la inflamación hepática y una reducción de la fibrosis. Sin embargo, el tratamiento con IL-10 recombinante durante períodos más prolongados, reduce efectivamente la fibrosis pero provoca un incremento de en los niveles de ARN viral en sangre periférica (Nelson DR y col., 2000, Nelson DR y col., 2003).

Papel del Factor de crecimiento tumoral (TGF)- β en la patogenia de la infección por HCV

Esta es una citocina pleiotrópica que cumple numerosas funciones anti-inflamatorias y es absolutamente requerida para mantener la homeostasis del sistema inmune y prevenir la autoinmunidad (Becker C. y col., 2006).

Según se desprende de trabajos realizados en modelos animales, esta función estaría mediada principalmente por un efecto inhibitorio sobre la capacidad de los LT CD4⁺ de responder hacia antígenos propios. Ratones *knock out* para esta citocina se han utilizados como modelo de enfermedades autoinmunes tejido-específicas (Gorham JD. y col., 2001).

El TGF- β es sintetizado, entre otras células, por los hepatocitos (Bayer EM. y col., 1998), y posee la capacidad de detener el crecimiento e inducir apoptosis de numerosos tipos celulares; inclusive a estas mismas células. Esto se demostró en cultivos primarios de hepatocitos y líneas celulares de hepatoma tanto de origen murino como humano (Galle PR., 1997; Feldmann G., 1997).

Esta citocina posee una potente actividad fibrogénica. Existen en los mamíferos tres isoformas de TGF- β (1, 2 y 3). La primera participa activamente en el desarrollo de cirrosis, induce la transformación de células Ito del hígado en mioblastos, en los cuales promueve su proliferación en forma indirecta y favorece en forma directa la producción de componentes de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina), al mismo tiempo que inhibe la producción de enzimas que degradan esta matriz (elastasas y colagenasas) (Nelson DR. y col., 1997; Marek B. y col., 2005; Ben-Ari Z. y col., 2004). La expresión de TGF- β 1 se encuentra aumentada, tanto en las lesiones como en la sangre periférica,

en patologías hepáticas humanas de origen viral que se acompañan de fibrosis hepática (Bayer EM. y col., 1998). Como contrapartida, aquellos pacientes infectados con HCV que responden al tratamiento con IFN- α disminuyen los niveles de esta citocina (Marek B. y col 2005).

1.2. Células *Natural Killer* (NK)

Las células NK son componentes cruciales del sistema inmune innato donde constituyen la primera línea de defensa contra agentes infecciosos (Trinchieri, G., 1989). Estas células provienen de la médula ósea y constituyen aproximadamente el 10% de los linfocitos circulantes. Las células NK participan de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y destruyen células que presentan alteraciones en el nivel de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH o HLA) de clase I. Son activadas en forma inespecífica por varias citocinas, entre ellas, la IL-2, la IL-15, IL-12 y la IL-8.

Receptores reguladores de la citotoxicidad expresados en las células NK

La activa participación de las células NK en las infecciones virales, y en particular en la infección por el HCV, sugirió analizar la participación de los genes que codifican para sus receptores de citotoxicidad. Hoy sabemos que la citotoxicidad está regulada por un fino balance de señales activadoras e inhibitoras (Yokohama, WM., 1993).

Se han identificado dos familias de receptores de células NK que reconocen moléculas HLA de clase I: A) la superfamilia de Inmunoglobulinas (Igs) y B) las lectinas de tipo C.

La superfamilia de las Igs incluye a los genes KIR (*killer cell Ig-like receptor*), los genes LILR (*leucocyte Ig-like receptor*), LAIR (*leucocyte-associated inhibitory receptor*), y NKp; todos localizados en el cromosoma 19. En el grupo de las lectinas de tipo C se incluye el heterodímero NKG2/CD94 ubicado en el cromosoma 12.

La probabilidad de que los genes KIR y los CD94/NKG2 se expresen en la misma célula es baja. De acuerdo a la intensidad en la expresión de la molécula CD56, se definen dos subpoblaciones de células NK, las CD56^{bright} y las CD56^{dim}. Las células NK CD56^{bright} expresan bajos niveles de KIR pero una alta expresión de CD94-NKG2A. Se ha sugerido que las células CD56^{bright} serían precursoras de las CD56^{dim} y que expresarían las moléculas KIR durante su maduración y diferenciación hacia las CD56^{dim} (Romagnani C. y col., 2007). Se pudo establecer que todas las células NK de un individuo no expresan los mismos receptores. Sin embargo, cada célula NK posee receptores inhibidores para las moléculas HLA de clase I. En cualquier caso, la afinidad de los receptores activadores es mucho menor que la de los inhibidores favoreciendo así la predominancia de la señal negativa. Estas características evitan la autoreactividad contra células normales (Parham P, 2005).

Los Receptores KIR (*killer cell Ig-like receptor*)

Los genes KIR se expresan en las células NK y en algunas células T, como receptores de simple cadena que expresan dos o tres dominios

extracelulares de tipo Ig. La nomenclatura de estos genes se desprende de su estructura. De este modo se denominan KIR2D o KIR3D, a aquellos genes que codifican para un producto con 2 o 3 dominios Ig respectivamente (Parham P, 2005).

Por otro lado, las características de los dominios intracitoplasmáticos determinan que estos receptores puedan comportarse como moléculas inhibitoras o activadoras de la citotoxicidad. Las moléculas KIR inhibitoras poseen un largo dominio intracitoplasmático, que también determina su nomenclatura. Por ej: KIR2DL indica que además de los 2 dominios extracelulares tiene una larga cola intracitoplasmático (L) con motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*). Este motivo se une a la tirosina-fosfatasa SHP-1 y, como consecuencia de esta interacción, se detiene el envío de señales positivas vía otros receptores.

Los moléculas KIR activadoras presentan una corta cola intracitoplasmática (KIR2DS; S for "*short*") que carece de motivos ITIM. Además, esta región es rica en aminoácidos cargados positivamente que permite su asociación con la molécula DAP12 y la consecuente transmisión de la señal de activación.

En los dominios citoplasmáticos largos de los receptores inhibitoras, los motivos ITIM se expresan de a pares. La excepción es el KIR 2DL4 que posee un sólo motivo ITIM y un residuo cargado en su región transmembrana. Estas características han permitido plantear que este receptor presenta funciones tanto activadoras como inhibitoras.

Hasta el momento se han identificado 14 genes KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3 y

3DS1) y 2 pseudogenes (2DP1 y 3DP1) (Gráfico 1). Estos genes poseen una alta homología de secuencia entre sí. Se ha observado que esto favorece un *crossing over* desigual que genera inserciones, deleciones y recombinación para ese locus.

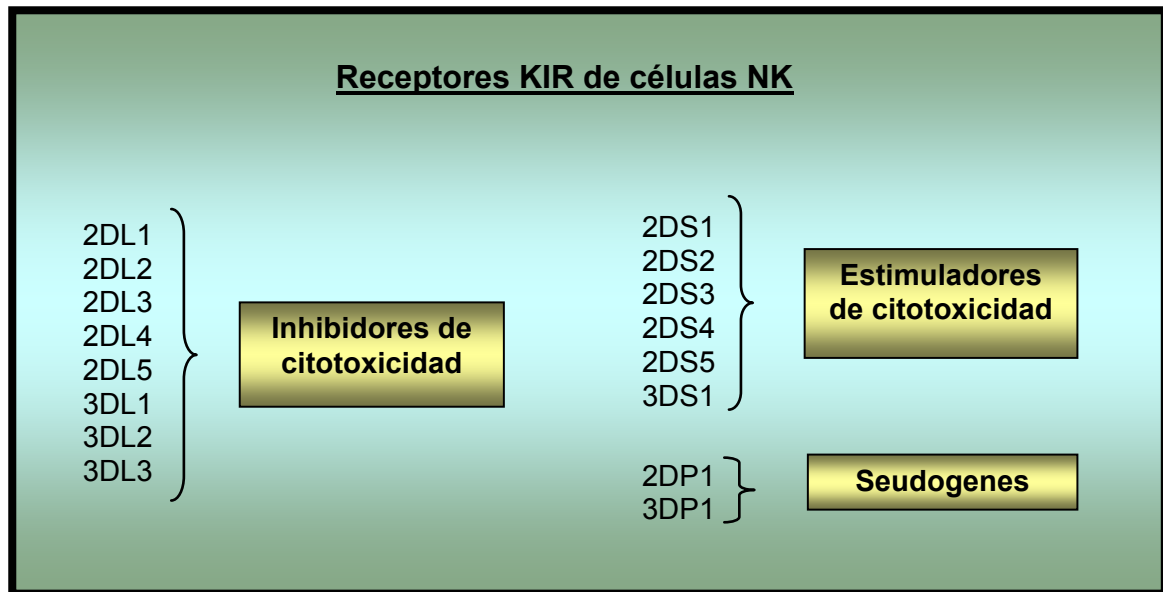


Gráfico 1: Receptores KIR de las células NK

Cada uno de los genes KIR presenta diferentes alelos. Si bien muchos de ellos ya han sido caracterizados, otros esperan su identificación.

Una de las características genéticas de los receptores KIR es que no todos los individuos poseen el mismo número de genes (Parham P., 2005). Esto se debe a que los genes están organizados en el genoma formando haplotipos (Uhrberg M., y col 1997). Cada uno de estos haplotipos posee una combinación diferente de genes KIR. En la figura 1 se representan los haplotipos más comunes presentes en la población caucásica. Se han identificado 2 grupos de haplotipos: A y B. El grupo A comprende un solo

haplotipo que presenta 7 genes KIR y 2 pseudogenes (aunque pueden distinguirse variantes alélicas). El grupo B comprende al menos 9 haplotipos diferentes. Estos últimos, poseen, además de los genes presentes en el haplotipo A, una combinación variable de los genes KIR 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 2DL2 (alelo de 2DL3) y 3DS1 (alelo de 3DL1). Como puede observarse, los haplotipos del grupo B poseen mayor cantidad de genes activadores de citotoxicidad que los pertenecientes al grupo A, que sólo presenta el gen KIR 2DS4.

Debemos destacar que los genes KIR 3DL3, 3DP1, 2DL4 y 3DL2 están presentes en todos los individuos. Sin embargo, se han descrito haplotipos "raros" en los cuales no se encuentran algunos de estos genes.

Por lo tanto, al polimorfismo alélico debe agregarse diferencias haplotípicas, contribuyendo de este modo a la diversidad de genes KIR humanos. Esta diversidad, tiene una implicancia funcional, debido a la existencia de diferentes ligandos para cada gen KIR.

Genes KIR	Haplotipos KIR									Frecuencia génica (%)		
	A	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7-8	B9	A + B	A	B
2DL4										100	100	100
2DL5										27.4	0	69.1
3DL1 3DS1	L	L	L	S	S	S	S	L	L	88.8 11.2	100 0	71.7 28.3
2DL3										100	100	100
2DL1										96.9	100	92.1
2DL2 2DL3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	36.6 63.4	0 100	92.1 7.9
2DS1										19.0	0	47.9
2DS2										36.6	0	92.1
2DS3										15.5	0	39.0
2DS4							?			88.8	100	71.7
2DS5										8.7	0	21.9
3DL3										100	100	100
Frecuencia haplotípica (%)	58.1	11.8	8.1	3.4	2.4	2.0	3.0	6.5	1.0			

Figura 1: Haplotipos de los receptores KIR. Figura tomada del trabajo de P. Parham (2005), donde se representan el haplotipo A y los 9 haplotipos B más comunes presentes en la población caucásica. La casilla coloreada indica la presencia del gen: los genes conservados están representados en verde, los genes que pueden estar presente tanto en el haplotipo A como B se muestran en rosa y los genes y/o alelos específicos de los haplotipos B figuran en celeste. En la fila de los receptores 3DL1/3DS1, la letra “L” significa que el haplotipo presenta el KIR 3DL1 y la “S” que posee el KIR 3DS1. Para los genes 2DL2/2DL3, el “2” implica la presencia de KIR 2DL2 y el “3” de KIR 2DL3.

Como se comenta anteriormente, todas las células NK de un individuo no expresan los mismos receptores KIR. A diferencia de ello, cada clon de células NK presenta en su membrana plasmática una combinación particular de los genes que porta en su genoma. Mediante un proceso estocástico aún no establecido, varios de los genes KIR de una célula NK son metilados, y por lo tanto no expresados. Dicho patrón de metilación es transmitido a las células hijas, obteniéndose clones con igual patrón de expresión de estos receptores (Santourlidis S. y col., 2002; Chan HW. y col., 2003).

En el gráfico 2 se representan los ligandos de HLA clase I identificados hasta el momento para los receptores KIR (Rajegopalan SY. and Long EO., 2005). Como se observa en la figura, los ligandos para muchos de los genes KIR aún se desconocen. Un dimorfismo en la posición 80 de la cadena aminoacídica define dos grupos de HLA-C: el grupo C1 posee una asparagina mientras que el grupo C2 una lisina. Los alelos de HLA-C2 son ligandos de los receptores KIR 2DL1 y 2DS1, en tanto que los del grupo C1 son ligando de los KIR 2DL2, 2DL3 y 2DS2. Como se comentó anteriormente, la afinidad de unión entre los genes activadores 2DS1 y 2DS2 y sus respectivos ligandos resulta, menor que la del receptor KIR inhibitorio correspondiente (indicado en el gráfico 2 por el grosor de la flecha que une cada KIR con su ligando). Adicionalmente, se reportó que la interacción entre el KIR 2DL1–HLA-C2 es más fuerte que la observada para el par 2DL2-HLA-C1, mientras que la interacción 2DL3-HLA-C1 es más débil que las 2 anteriores (Colona M. y col, 1993; Boyington JC. y col, 2001; Parham P., 2005).

En forma similar al HLA-C, el HLA-B se puede separar en 2 grupos: Bw4 y Bw6, los cuales se diferencian por un dimorfismo en la región C terminal.

Sin embargo, solo el HLA-Bw4 funciona como ligando de KIR, en particular de 3DL1. Debido a que la porción extracelular del receptor KIR 3DS1 es igual al 3DL1, se supone que el primero también reconoce al HLA-Bw4, sin embargo, esta interacción no ha sido experimentalmente comprobada. La combinación 3DS1-HLA-Bw4 ha sido asociada a la progresión lenta en pacientes infectados con el virus HIV (O'Connor GM. y col., 2007).

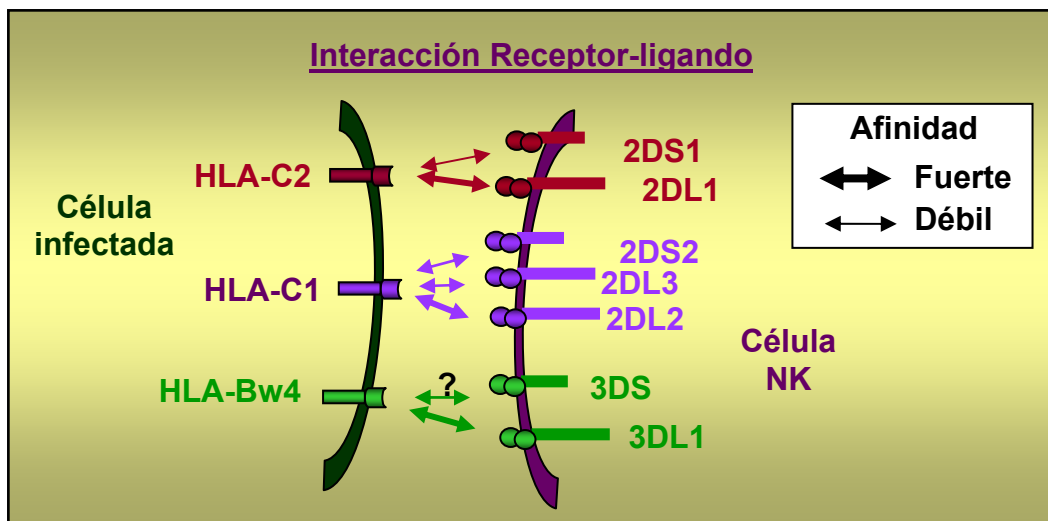


Gráfico 2: Especificidad de ligandos de los receptores KIR de las células NK

Papel de las células NK en HCV

Como se describió previamente, las células NK participan activamente en las infecciones virales y son numerosos los estudios que han determinado su participación en la patogénesis de la HCV. Uno de estos trabajos involucró un numeroso grupo de individuos infectados. Se observó que la combinación de homocigosis para el receptor KIR 2DL3 y homocigosis para el ligandos HLA-C1 esta asociada con la eliminación del virus y la recuperación clínica (Khakoo

Sl. y col., 2004). La carencia de HLA-C2 impide la inhibición de la citotoxicidad mediada por KIR 2DL1, en tanto que la ausencia de KIR 2DL2 (la contraparte alélica de 2DL3) posiciona a la combinación HLA-C1/KIR 2DL3 como único par funcional de este sistema. Como se describió anteriormente, dicho par receptor/ligando posee menor afinidad que las restantes combinaciones, sugiriendo que estos individuos tienen un aumento en la capacidad citotóxica de sus células NK.

Adicionalmente, se demostró que el virus puede interferir con el normal funcionamiento de las células NK. Por ejemplo, células NK de individuos infectados con HCV, muestran una secreción disminuida de citocinas y una pobre capacidad de activar células dendríticas (Jinushi M. y col., 2004). Asimismo, se demostró que la proteína E2 de la envoltura viral puede bloquear la actividad de las células NK (Tseng CT. y col., 2002).

2) Hepatitis Autoinmune Tipo I (HAI)

2.1) La autoinmunidad

Generación de Tolerancia Inmunológica

La tolerancia inmunológica hacia antígenos propios depende de la habilidad del sistema inmune de discriminar entre lo propio y lo extraño, a través de la inducción de la denominada tolerancia central, mediada por la depleción en el timo de LT autoreactivos en un estadio temprano de la ontogenia T. Sin embargo, el sistema inmune está expuesto a antígenos propios fuera del timo (Limmer A. y col., 1998), y a una repetida estimulación por antígenos no patogénicos que ingresan al cuerpo por inhalación o ingestión. Para evitar la inflamación crónica este sistema debe desarrollar mecanismos que le permitan no responder a tales estímulos, lo que se conoce como tolerancia periférica. Los mecanismos responsables de este tipo de tolerancia incluyen a la anergia, la depleción de linfocitos T específicos por apoptosis en los órganos linfoides secundarios o al accionar de las células Treg (Groux HT. y col., 1997). El grado de activación de las células dendríticas cumple un papel esencial en el establecimiento de la tolerancia central y periférica (Banchereau J. y col., 1998).

El hígado participa activamente en los mecanismos de tolerancia periférica. Este órgano presenta una arquitectura única, que favorece el intercambio de linfocitos vírgenes o activados entre la sangre y el parénquima, facilitando el proceso de generación de tolerancia periférica. Este fenómeno

parece estar determinado por mecanismos independientes para LT CD8⁺ y CD4⁺ (Bertolino P., Klimpel G. and Lemon SM., 2000).

El hígado contiene linfocitos T convencionales (CD4⁺ y CD8⁺) y no convencionales (Racanelli V. and Rehermann B., 2006). Estas últimas comprenden 2 subpoblaciones que se diferencian por la coexpresión de marcadores NK. Las células que coexpresan marcadores T y NK, denominadas NKT, poseen fenotipo CD56⁺, CD3⁺, y un alto porcentaje de CD8⁺ con la expresión de niveles intermedios del TCR. Las células NKT pueden subdividirse también en 2 grupos: las NKT clásicas que expresan invariablemente la cadena V α 24-J α Q y V β 11 del TCR y las NKT no clásicas que pueden llevar TCR- $\gamma\delta$ ⁺ o TCR- $\alpha\beta$ ⁺ pero no utilizan la cadena V α 24 ni expresan la cadena β del coreceptor CD8 (Norris S. y col., 1999; Fainboim L., y col., 2007). Las células NKT producen IFN- γ e IL-4, y menores cantidades TNF- α e IL-2 (Doherty DG. y col., 1999). La producción de IL-4 por este subtipo celular en estadios tempranos de la respuesta inmune permite iniciar respuestas de tipo II. Poseen una potente actividad citotóxica, tipo NK, que requiere estimulación con IL-2. La actividad citotóxica mediada por el TCR V α 24-J α Q involucra el reconocimiento de residuos glicosilceramida presentados en el contexto de la molécula CD1d (Jin Y. y col., 1998; Doherty DG. y col., 1999). Además de la coexpresión de CD8, expresan también receptores KIR, que transducen señales inhibitorias de citotoxicidad luego de su interacción con moléculas HLA clase I (Norris S. y col., 1999). Las células NKT han sido implicadas en diversas patologías autoinmunes, tanto en modelos animales como en humanos, patologías virales, como hepatitis C, alergias y fenómenos anti-tumorales (Wilson SB. y col., 1998; Bertolino P.,

Klimpel G., and Lemon S. M., 2000). Estas características sugieren una importante función para las células NKT en la regulación de la respuesta inmune intrahepática

En el modelo experimental murino de hepatitis autoinmune tipo I inducida por Concanavalina A, las células NKT son necesarias y suficientes para el desarrollo de la patología y la producción de IL-4 por estas células cumple una función fundamental en este sistema por aumentar, en forma autócrina, su actividad citotóxica, induciendo la expresión de granzima B y Fas L (Smyth MJ. y col., 2003). Además, inducen activación de LT CD4⁺ por expresión del IL-2R y TNF- α (Toyabe S. y col., 1997).

Características del proceso autoinmune

Las enfermedades autoinmunes ocurren cuando una respuesta inmune adaptativa es montada específicamente contra un antígeno propio, o sea cuando se pierde la tolerancia inmunológica hacia un antígeno en particular. Los mecanismos de daño tisular son esencialmente los mismos que operan en la inmunidad protectora. La especificidad, tanto de tejido como de antígeno, es afectada por el modo de presentación y reconocimiento de éste, sus niveles de expresión y el estado y capacidad de respuesta del órgano blanco (Marrack P. y col., 1997).

La función del ambiente puede ser muy diversa. Por ejemplo, el accionar de productos de determinados microorganismos que actúan como adyuvantes, por mimetismo molecular o cuando un patógeno provoca la inflamación en un órgano particular. En el modelo murino, la activación de las células T específicas para antígenos hepáticos genera un proceso autoinmune

solamente cuando se acompaña de la remodelación del microambiente local (Limmer A. y col., 1998).

El *background* genético cumple un papel importante, las mismas manipulaciones realizadas en animales de distintas cepas muestran diferencias en la generación de patologías autoinmunes, en cuanto a la severidad del proceso inflamatorio y la elección del órgano blanco (Gorham JD. y col., 2001). La hepatitis autoinmune es un ejemplo de ello ya que presenta, como se describirá más adelante, una marcada asociación con alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA).

Las patologías de origen autoinmune afectan entre el 3 y el 5 % de la población y pueden ser clasificadas principalmente en dos grupos: (i) las que atacan específicamente a un tejido u órgano, entre las cuales se encuentra la hepatitis autoinmune, la esclerosis múltiple, la tiroiditis y la diabetes tipo I; (ii) las sistémicas, como la artritis reumatoidea o el lupus eritromatoso sistémico, donde la respuesta es dirigida hacia antígenos que se encuentran ampliamente expresados en diferentes tejidos (Marrack P. y col., 2001; Maas K. y col., 2002).

2.2) Inmunopatogénesis de la Hepatitis Autoinmune

La hepatitis crónica autoinmune (HAI) es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, presencia de autoanticuerpos y una respuesta necroinflamatoria hepática progresiva que frecuentemente evoluciona hacia la cirrosis y la falla hepática fulminante (Ichiki

Y. y col., 2005). Es una de las causas más frecuentes de hepatitis crónica en la infancia en nuestro país (Cuarterolo M. y col., 2005), tiene predominio en mujeres (70-90%) y responde favorablemente al tratamiento con agentes inmunosupresores (Ichiki Y. y col., 2005, Czaja AJ. y col., 2000, Obermayer-Straub P. y col.; 2000). La HAI se define como hepatitis crónica activa, de moderada a severa actividad, y que carece de lesiones biliares granulomatosas, siderosis o depósitos de cobre (Alvarez F. y col., 1999).

Modo de presentación de la enfermedad y diagnóstico

La patología se presenta con malestar general, hiporexia y fatiga, y en 30% de los pacientes con síntomas semejantes a la hepatitis viral aguda, pudiendo evolucionar hacia una insuficiencia hepática fulminante. Un alto porcentaje de los pacientes (30-80%) ya han desarrollado cirrosis cuando son diagnosticados (Mieli-Vergani G. and Vergani D., 1998). El 50% de los pacientes no tratados fallece durante los primeros cinco años de enfermedad siendo la remisión espontánea poco frecuente.

El diagnóstico es complejo ya que ningún elemento (clínico, de laboratorio o histológico) es patognómico. El Grupo Internacional de Estudio de la Hepatitis Autoinmune estableció los criterios para el diagnóstico de esta enfermedad (Alvarez F. y col., 1999). Se deben descartar diversos factores etiológicos más o menos frecuentes como infecciones por virus A, B, C u otros virus hepatotrofos (citomegalovirus, Epstein Barr), la colangitis esclerosante primaria, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo, la deficiencia de α 1-antitripsina, y la hepatitis tóxica. La presencia de autoanticuerpos es uno de los componentes distintivos (Obermayer-Straub P. y col., 2000).

Alteraciones serológicas

La especificidad de los anticuerpos define los diferentes tipos de HAI. La HAI tipo I se caracteriza por la presencia de anticuerpos dirigidos contra los filamentos de actina del músculo liso (SMA) y/o contra proteínas presentes en la membrana nuclear (factor antinuclear o FAN). Estos autoanticuerpos no órgano-específicos, ayudan eficientemente al diagnóstico sin estar directamente involucrados en el daño por necrosis hepatocelular (Ichiki Y. y col., 2005; Mieli-Vergani G. and Vergani D, 1998). En consecuencia, el perfil de estos anticuerpos no correlaciona con la actividad necroinflamatoria; sin embargo, sus niveles suelen disminuir como respuesta al tratamiento (Obermayer-Straub P. y col., 2000).

Los niveles séricos de transaminasas hepáticas (aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa) reflejan la severidad del proceso inflamatorio hepático y descienden rápidamente como respuesta al tratamiento con esteroides al igual que la bilirrubina. Los niveles de bilirrubina y fosfatasas alcalinas se encuentran levemente elevados en el 80 % de los pacientes, y valores bajos de albúmina caracterizan al 75% de los mismos. Es común la hipergamaglobulinemia por aumento de IgG policlonal.

Alteraciones histológicas

La evaluación histológica en las HAI comprende el análisis de la actividad necroinflamatoria (grado de actividad) y de la fibrosis, la distorsión de la arquitectura del parénquima hepático y la cirrosis (estadificación) según criterios histológicos universalmente adoptados utilizando el índice de actividad histológica (IAH) de Knodell (Alvarez F. y col., 1999).

Los hallazgos histológicos más frecuentes son hepatitis de interfase (periportal o periseptal), con infiltrado inflamatorio predominantemente linfocitario, con o sin compromiso lobular (intra-acinar) y puentes necróticos porto-portales o porto-centrales, generalmente con formación de rosetas y regeneración nodular.

Los linfocitos T son predominantemente portadores de TCR $\alpha\beta$. Las células CD8⁺ son predominantes en las áreas de hepatitis de interfase mientras que los CD4⁺ lo son en la zona portal. Dentro del infiltrado portal se han identificado también células plasmáticas y NK (Ichiki Y. y col., 2005).

Diferencias entre Pacientes Adultos y Pediátricos

Si bien la HAI de tipo I tiene características histológicas y serológicas comunes en adultos y niños, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que el cuadro clínico y el control genético son diferentes en sus formas pediátrica (HAIp) y adulta (HAAla). En los pacientes pediátricos la presentación clínica de esta enfermedad es indistinguible de una hepatitis viral aguda en el 70% de los casos, mientras que esto ocurre en el 54% de los pacientes adultos. La falla hepática fulminante es ocasionalmente observada en niños pero no en los adultos. Se alcanza remisión completa en 90% de los pacientes adultos pero sólo en el 68% de los pediátricos a pesar de recibir éstos mayores dosis del agente inmunosupresor (Fainboim L, y col., 1994). Otra diferencia importante es la presencia de manifestaciones autoinmunes extrahepáticas (artritis, enfermedad tiroidea con autoanticuerpos, anemia hemolítica, enfermedad celíaca, etc.) en el 48% de los pacientes adultos (Marcos Y. y col., 1994) pero sólo en el 13% de los pediátricos (Fainboim L. y

col., 1994). La hipergamaglobulinemia, es mucho más marcada en niños que en adultos, mientras que los niveles de bilirrubina y transaminasas hepáticas son similares en ambos grupos. Los anticuerpos SMA son más frecuentes en los niños (95%) que en adultos (74%), mientras que los FAN predominan en pacientes adultos (73%) respecto de niños (55%) (Pando M. y col., 1999).

Los pacientes con HAI tipo I en la población argentina presentan diferente asociación al sistema HLA según sean niños o adultos. La patología pediátrica se asocia primariamente al alelo HLA de clase II DRB1*1301. Este alelo se encuentra presente en el 66% de los pacientes en comparación con un 9% en la población normal. Se desprende de este estudio, que poseer el alelo DRB1*1301 genera un riesgo 16 veces mayor de desarrollar la HAIp que un individuo que no presente dicho alelo (Fainboim L. y col., 1994). Estos estudios realizados en nuestro laboratorio pusieron en evidencia además que el alelo DRB1*1302, que difiere del anterior en un solo aminoácido en la posición 86 de la cadena β , confiere una marcada protección a los niños de padecer esta enfermedad. Por su parte, el 31% de los pacientes adultos posee una asociación primaria al alelo HLA-A11 de clase I, presente en 6% de individuos control, y una asociación secundaria al alelo DR4 de clase II (44%), presente en 29% de individuos control (Marcos Y. y col., 1994). Las características genéticas y clínicas distintivas sugieren la hipótesis de que las formas pediátrica y del adulto involucrarían diferentes vías inmunopatogénicas (Pando y col., 1999).

Etiología de la HAI

La estrecha asociación con alelos de HLA clase II y la falta de asociación con alelos de HLA clase I en población pediátrica, sugiere que los

linfocitos T CD4⁺ podrían ser el principal tipo celular involucrado en la patogénesis de esta enfermedad (Fainboim L. y col., 1994; Pando M. y col., 1999), mediante la inducción de una respuesta predominantemente celular (Czaja AJ. y col., 2000), este fenómeno también explicaría el característico patrón de autoanticuerpos. Los hepatocitos provenientes de pacientes con esta patología expresan moléculas del CMH de clase II, con lo cual serían capaces de presentar péptidos a LT CD4⁺ (Czaja AJ. y col., 2000).

Defectos en los mecanismos inmunoregulatorios han sido documentados en hepatitis autoinmune. Una disminución en la actividad supresora y en el porcentaje de LT CD8⁺ en PBMC, asociada a un incremento en la función citotóxica y en los niveles de expresión del HLA-DR y del receptor de IL-2 en las mismas células, han sido observados en estos pacientes. La actividad supresora se normaliza por tratamiento con corticoides, tanto *in vivo* como *in vitro* (Mieli-Vergani G. y col., 1989; Mieli-Vergani G. and Vergani D. 1998).

Un hallazgo interesante es la expansión oligoclonal de LT CD8⁺ en el hígado de pacientes adultos con HAI identificados por técnicas de RT-PCR y *southern blot* de la región CDR3 de la cadena β del TCR (Tanaka A. y col., 1997).

Se considera que el mecanismo patogénico principal es la pérdida de tolerancia inmunológica. Se ha postulado como un potencial candidato de autoantígeno a la familia de receptores de asialoglicoproteínas (Ichiki Y. y col., 2005). Entre los virus involucrados se encuentran los de la hepatitis A, B, C y el del sarampión, debido a que estas infecciones preceden, en algunos casos, al desarrollo de esta enfermedad (Obermayer-Straub P. y col., 2000). Otros

mecanismos desencadenantes de autoinmunidad, mencionados previamente, como la formación de neoantígenos, la existencia de mimetismo molecular o la inducción de citocinas proinflamatorias que modifiquen el microambiente tolerogénico presente normalmente en este órgano deberían ser incluidos en la posible patogenia de la HAI (Czaja AJ. y col., 2000.). El tratamiento con IFN- α en hepatitis crónicas B o C promueve la aparición de autoanticuerpos séricos y en algunos pacientes existen evidencias de que inicia la patogenia autoinmune (Obermayer-Straub P. y col., 2000).

Citocinas en HAI

La producción constitutiva de citocinas es mínima o ausente en la mayoría de los tejidos no linfoides incluyendo el hígado (Tracey KJ. y col., 1993). Conocida la influencia que el microambiente local puede ejercer en el mantenimiento de las respuestas autoinmunes (Limmer A. y col., 1998), es importante conocer los niveles de expresión de las diversas citocinas en el hígado de los pacientes. Lamentablemente, existen escasos estudios que han encarado este tema, algunos con resultados contradictorios. Por ejemplo, un estudio analizó la producción *in vitro* de citocinas por linfocitos provenientes de biopsias hepáticas de pacientes adultos. El mismo demostró la síntesis simultánea de IFN- γ e IL-4 (Schlaak JF. y col., 1993). En cambio, otro trabajo que empleó la técnica de RT-PCR sólo confirmó la presencia de IFN- γ , con bajos niveles de IL-4 tanto en tejidos patológicos como normales (Napoli J. y col., 1996).

Adicionalmente, otro reporte detectó un aumento en la expresión de TGF- β 1 en sitios de masiva inflamación y especialmente en áreas de fibrosis

(Bayer EM. y col., 1998). Este trabajo fue realizado en pacientes adultos mediante ensayos de inmunohistoquímica y confirma la asociación de esta citocina en la generación de la fibrosis hepática.

Objetivos

A)- Analizar el papel que el polimorfismo de los genes que codifican para la IL-10 y el TGF- β 1 pueden jugar en la infección por el virus de la hepatitis C (HCV). Para dicho objetivo, en una primera fase se deberán establecer las frecuencias haplotípicas y genotípicas de los polimorfismos del promotor de IL-10 y del exon 1 del TGF- β 1 en la población normal. Con esta información se procederá a compararlos retrospectivamente con un panel de individuos argentinos infectados con HCV tomando en cuenta los diferentes momentos evolutivos de la infección.

B)- Como se describió en la introducción, las células NK juegan un papel central como primera línea de defensa frente a la infección viral. En este contexto, se describió el papel de los genes KIR y sus ligandos en dicho control. Por lo tanto, será un objetivo para esta etapa de la tesis, investigar en primer lugar la frecuencia de los diferentes genes KIR, inhibidores de la citotoxicidad (2DL1-5 y 3DL1-3), y estimuladores (2DS1-5 y 3DS1), junto con los seudogenes 2DP1 y 3DP1, y de sus ligandos específicos, (los HLA clase I) en pacientes infectados por HCV. Luego de analizar las frecuencias de los diferentes genes KIR, y en función de los datos obtenidos se intentará estudiar en particular el papel de los alelos del gen KIR 2DS4

C)- Con el propósito de asignar una implicancia funcional para los receptores KIR en la patogénesis de la HCV, se intentará demostrar si el polimorfismo genético se traduce en la expresión diferencial de estos receptores a nivel de la membrana plasmática. Para este objetivo se analizarán

por citometría de flujo los receptores KIR en las células NK en controles sanos y en pacientes con esta enfermedad.

D)- Definir el patrón de citocinas predominantes en el hígado de pacientes con hepatitis autoinmune tipo I en sus formas pediátrica (HAIp) y adulta (HAAla). Este objetivo pretende evaluar la presencia de las citocinas prototípicas Th1 (IFN- γ , IL-12_{p40}, IL-18 y la cadena β 2 del receptor de IL-12) y Th2 (IL-4 e IL-10) y TGF- β 1. Mediante el análisis del polimorfismo de los genes que codifican a IL-10 y TGF- β 1 se intentará establecer un papel para estas citocinas en la fisiopatogenesis de la HAI. Adicionalmente, se estudiarán los genes que codifican para los receptores KIR de las células NK en estos mismos pacientes.

Materiales y Métodos

Población en estudio

Para la realización del presente estudio retrospectivo se incluyó una población control de 420 individuos adultos sanos (42% mujeres, 58% hombres). Estos individuos fueron analizados y encontrados negativos para marcadores de enfermedades infecciosas (HIV, HBV, HCV, cytomegalovirus y enfermedad de Chagas). Esta población se comparó con dos grupos de pacientes: uno constituido por 286 individuos infectados con el virus de la Hepatitis C (HCV), y otra formada por 197 pacientes que padecen Hepatitis Autoinmune Tipo I (HAI); 117 pediátricos (HAIp) y 80 adultos (HAIA). Estos pacientes fueron derivados de los Servicios de Hepatología del Hospital de Enfermedades Infecciosas "F. J. Muñiz", del Hospital de Gastroenterología "Dr. C. Bonorino Udaondo", del Hospital Italiano de Buenos Aires, del Hospital General de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez", del Hospital de pediatría "J. P. Garrahan", y del Hospital Municipal de Niños de San Justo. Tanto la población control como la de los pacientes se encuadran dentro del grupo étnico denominado caucasoide latinoamericano.

El consentimiento informado fue obtenido de cada paciente y control, en tanto que el protocolo de estudio cumple con las condiciones éticas de todas las instituciones participantes.

Características clínicas de los pacientes infectados con el virus de la hepatitis C

Como se describe en la tabla 1, y en el gráfico 3 todos los pacientes presentaron anticuerpos séricos anti-HCV, detectados mediante la técnica de ELISA de tercera generación (4.0 Murex-Abbott). Los pacientes fueron agrupados en función de la evolución de la infección: a) El grupo **HCV RNA+**, (n=261) representa a pacientes con niveles detectables de RNA viral medido por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cualitativa (AMPLICOR® Hepatitis C virus test, version 2.0); b) El grupo **HCV RNA-**, (n=25) es el menos representado y esta compuesto por individuos infectados, que auto-limitaron la infección, por lo cual no presentan RNA viral circulante y resultan positivos para el test confirmatorio de anticuerpo anti-HCV mediante el test suplementario LIA 3 (INNO-LIA™ HCV-AbIII, Inogenetics). Dentro de los pacientes RNA+, 200 mostraron niveles séricos de transaminasas hepáticas (ALAT) elevados en forma persistente entre 1.2 y 7 veces sobre los valores normales, a este grupo de pacientes se lo denomina **HCV RNA+ ALATE**; mientras que 61 tuvieron niveles normales de ALAT (**HCV RNA+ ALATN**).

Dentro del grupo HCV RNA+, se realizaron 188 biopsias por punción intrahepática y en ellas, el grado de fibrosis fue asignado aplicándole sistema METAVIR (F0-4), donde F4 es cirrosis (Bedossa and Poynard, 1996). En los restantes 73 pacientes pertenecientes a este grupo el diagnóstico de cirrosis fue realizado mediante estudios clínicos y ultrasonográficos.

Dentro de los diferentes grupos de pacientes no se hallaron diferencias significativas en la edad de la infección, el genotipo viral, el nivel de RNA viral circulante o el consumo de alcohol. Todos los individuos resultaron negativos

para marcadores del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), así como también para otras enfermedades de origen hepático como infección por el virus de la hepatitis B (HBV), enfermedades metabólicas, hepatitis inducida por drogas y hepatitis autoinmune.

Grupos de Pacientes ^a	n	Edad (años)	Hombres:	RNA HCV (IU/ml)	% Genotipo 1 ^c
		Media (rango)	mujeres	Media (Rango) ^c	
Pacientes HCV	286	50 (22-77)	161:125		
HCV RNA-	25	40 (27-61)	8:17		
HCV RNA+	261	51 (22-77)	154:107	1.768.700 (1.589-20.000.000)	73
HCV RNA+ ALATN	61	54 (22-76)	25:36	1.747.607 (126.191-6.234.555)	nd
HCV RNA+ ALATE	200	50 (25-77)	126:74	1.771.336 (1.589-20.000.000)	72
HCV RNA+ cirróticos	138	49 (25-77)	84:54	1.960.393 (1.589-20.000.000)	63
HCV RNA+ no cirróticos	123	57 (27-76)	69:54	1.837.171 (10.000-10.416.512)	85

Tabla 1: Características clínicas de los individuos infectados con el virus de la Hepatitis C (HCV). ^a Todos los individuos presentan anticuerpos anti-HCV medido por ELISA de tercera generación. El RNA HCV fue detectado por PCR cualitativa. ^c Porcentaje obtenido de los datos disponibles (HCV RNA: n=45, genotipo: n=82). Nd: no determinado.

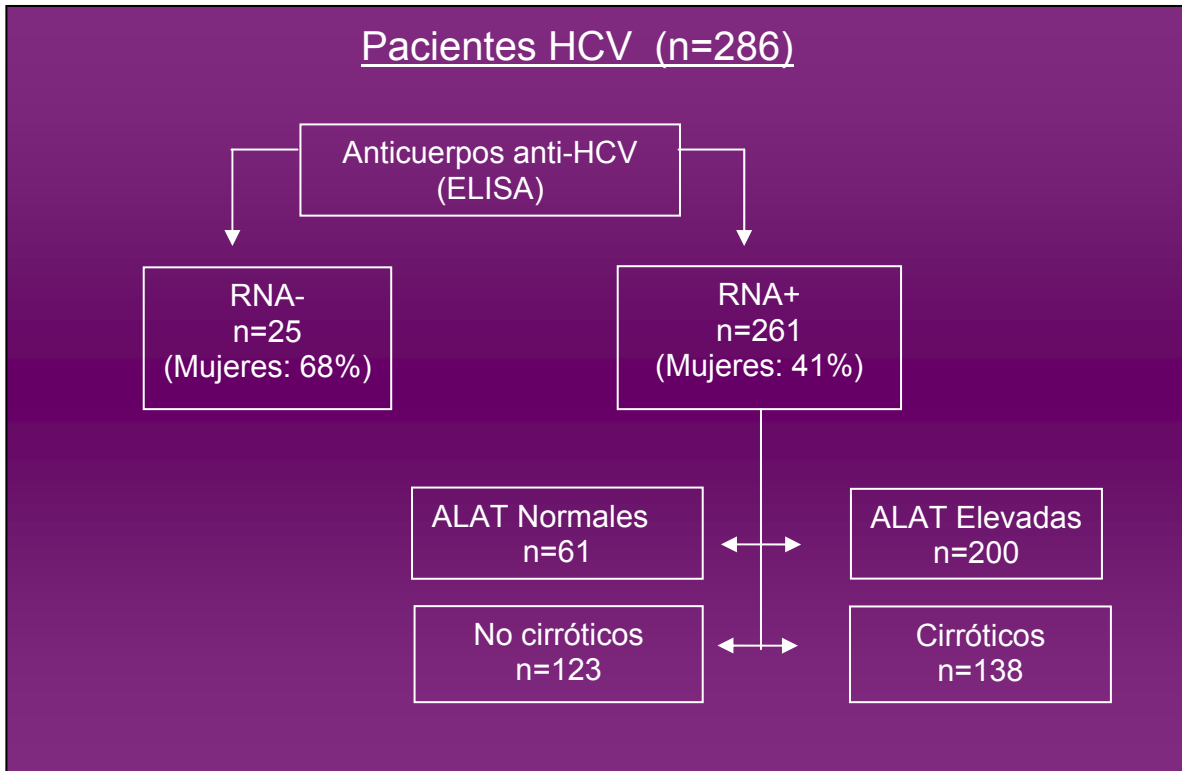


Gráfico 3: Grupos de pacientes con hepatitis viral C (HCV) analizados en este trabajo

Características clínicas de los pacientes con Hepatitis Autoinmune Tipo I

Este estudio incluyó un total de 197 pacientes con hepatitis autoinmune tipo I (HAI), 117 pediátricos y 80 adultos (tabla 2). El diagnóstico de esta patología fue confirmado siguiendo los criterios previamente publicados (Alvarez F. y col, 1999). Todos los pacientes fueron negativos para marcadores de virus de hepatitis B y C, y del virus de inmunodeficiencia humana (HIV).

En el caso de los experimentos en los cuales se utilizó mARN de tejido hepático de pacientes con HAI, las biopsias fueron obtenidas por punción hepática utilizando agujas de Menghini (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Esta biopsia fue realizada en 25 niños (10 años, rango 6-14) y 4 adultos (42 años, rango: 30-51 años), como parte del estudio diagnóstico y por lo tanto se encontraban libres de tratamiento inmunosupresor. El tejido normal

utilizado en estos experimentos fue obtenido a partir de reducción de hígados provenientes de donantes cadavéricos (28 años, rango: 15-46) de individuos libres de enfermedades infecciosas (HIV, hepatitis B, hepatitis C, citomegalovirus y Chagas), obtenido en virtud de un convenio con INCUCAI.

Pacientes con HAI	n	Edad (años)	Hombres:	% AutoAc positivos	% HLA-
		Media (rango)	mujeres	(SMA/ANA)	DR1301
HAI pediátricos	117	9 (1-17)	22:85	78%/ 49%	54%
HAI adultos	80	42 (18-85)	12:68	66%/ 61%	19%

Tabla 2: Características de los individuos que padecen hepatitis autoinmune tipo I (HAI) pediátricos y adultos.

Metodologías

1) Detección de mRNA y proteínas de tejido hepático

Purificación de ARN y ADN a partir de tejidos

A partir del tejido hepático se purificó ARN según la técnica descrita en el catálogo de Trizol ®Reagent (GIBCO BRL). Aproximadamente 10 mg de tejido fueron homogenizados en 1 ml del reactivo Trizol e incubados 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agregó 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente el tubo por 15 seg, se incubó 2-3 min a TA y se centrifugó a 12000g durante 15' a 4° C. Al finalizar la centrifugación la mezcla se separó en una fase orgánica inferior (fenol-cloroformo), una interfase y una fase acuosa superior. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, la cual fue transferida a un tubo nuevo, mezclada con 500 µl de isopropanol, incubada 10 min a TA y centrifugada a 12000g por 10 min a 4° C para precipitar el ARN. El sobrenadante fue removido y el pellet fue lavado con 1 ml de etanol 75%, sedimentado por centrifugación a 7500g durante 5 min a 4° C, secado a TA durante 10-15 min y resuspendido en 15-20 µl de agua libre de RNAsas.

Retrotranscripción (RT)

La síntesis de cADN total (*primers* oligo-dT) para TGF-β1 y β-actina o específico (primer 3') para las citocinas IFN-γ, IL-4, IL-12_{p40}, IL-18 e IL-12Rβ2 (tabla 3) fue realizada como indica el catálogo Promega: el ARN total fue

calentado a 70° C durante 4 min, centrifugado brevemente e incubado a 42° C durante 1 h con 625 µM de dNTPs, 15 unidades de RNAsin (Promega, Madison WI), 30-45 pmoles del *primer* y 0,1 unidad de transcriptasa reversa de MMLV (Promega, Madison WI) en Tris-HCl 10 mM, KCl 15 mM, MgCl₂ 0,6 mM, DTT 2 mM. Posteriormente se calentó la mezcla de reacción a 95° C por 10 min para inactivar la enzima. El control negativo fue realizado sin ARN. Como control positivo para las citocinas se utilizó ARN de PBMC estimuladas durante 36-48 hs con 1 mg/ml phytohemaglutinina A (PHA).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN complementario (cADN) fue incubado con 25-50 µM de cada uno de los *primers* (Tabla 3), 1,5-2 mM de MgCl₂, 250 µM de dNTPs, y 2,5 U de Taq polimerasa (Highway), en KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9 y Triton X-100 0,1% en un volumen final de 50 µl y amplificado en un termociclador PTC-100™ MJ Reserch (MJ Reserch Inc., Watertown, CT). Los pares de primers que figuran en la tabla 1 se localizan en diferentes exones para evitar la amplificación a partir de posibles trazas de ADN genómico contaminante. Las citocinas, al igual que β-actina fueron amplificadas por 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a la temperatura de *annealing* (59° C para IL-18 e IFN-γ, 60° C para IL-12_{p40}, TGF-β1 e IL-4 y 66° C para β-actina) y 1 min a 72° C; posteriormente se realiza un último paso de extensión de 5 min a 72° C.

La masa de ARN total utilizada, dependió de la sensibilidad de las reacciones de RT y PCR, y de la abundancia de cada transcripto en las muestras. Dicha masa fue previamente normalizada según el contenido de β-actina de cada muestra. Se realizó una técnica semicuantitativa prestando

especial atención en evitar la saturación de las señales de amplificación, mediante la determinación preliminar de cada condición de amplificación.

mARN	Primer 5' (5'→3')	Primer 3' (5'→3')
β-actina ¹	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCC	TAGAAGCATTTCGCGGACGATGGAGGG
IL-4 ²	GCGATATCACCTTACAGGAG	TTGGCTTCCTTCACAGGACA
IL-12_{p40} ²	GCAAAACCCTGACCATCCAA	GGCCAGTACACCTGTCAC
IL-12Rβ2 ³	GAGGGACTGGTACTGCTTAATCGAC	TCACACAGGTTTCATTATGTTAATACGAGT
IFN-γ ¹	AAGATGACCAGAGCATCCAA	TCCTTTTTCGCTTCCCTGTT
TGF-β1 ⁴	GCCCTGGACACCAACTATTGCT	AGGCTCCAAATGTAGGGGCAGG
IL-18 ⁵	CATGTCCTGGGACACTTCTC	GCTGCTGAACCAGTAGAAGA

Tabla 3: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT y PCR. ¹ Somoza N. y col., 1994; ² Kirk AD. y col., 1995; ³ Zhang M.y col., 1999; ⁴ GenBank accession N° EO3028; ⁵ Ushio S. y col., 1996.

Southern blot

Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de agarosa 2% en TBE 1X (Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 0,5 M, pH 8), utilizando para la siembra de 10 µl de cADN y 2µl de buffer conteniendo 0,25% de azul de bromofenol en una solución de sacarosa 40%. Los geles fueron corridos en buffer TBE 1X durante 30 min a 100 V. Las bandas obtenidas tuvieron los siguientes tamaños: β-actina, 661 pb; TGF-β1 160 pb; IFN-γ, 211 pb; IL-4, 308 pb; IL-12_{p40}, 347pb; IL-18, 433 pb e IL-12Rβ2, 511 pb. Se utilizó un marcador de peso molecular (PM) adecuado a los tamaños esperados para los productos de amplificación (100-1000pb). Una vez corridos, los geles fueron

incubados 20 min en NaOH 0,4 N y posteriormente transferidos a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Internacional, Buckinghamshire, England) por capilaridad durante 16 hs en NaOH 0,4 N. Posteriormente las membranas se incubaron 5 min en SSPE 2X (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4) y sometidas a luz ultravioleta (120 mJ) para unir en forma covalente el ADN al nylon en un UV Stratalinker®1800 (SRATEGENE).

Las membranas fueron hibridadas con oligonucleótidos internos al fragmento amplificado. Para ello 10 pmoles de cada sonda (Tabla 4) se marcaron con 30 µCi de 5'γ-ATP [32P] durante 30 min a 37° C con polinucleótido kinasa del fago T4 (NEW ENGLAND BioLabs Inc.), en Tris-HCl 70 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, a pH 7,6. Las membranas fueron preincubadas a 42° C durante 1 h en una solución con SSPE 6X, Denhardt's 5X (Ficoll 0,1%, PVP 0,1%, BSA 0,1%), 0,25% (m/v) de dodecyl sulfato de sodio (SDS) y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón simple cadena (Sigma, Saint Louis, MO). Posteriormente se agregó la sonda marcada y se incubó 12 hs a 42° C con agitación. Transcurrido dicho tiempo se realizaron dos lavados de 10 min con SDS 0,1%, SSPE 2X a TA, un lavado de 10 min con solución TMAC 3M (cloruro de tetrametilamonio; Fisher Scientific, Pittsburg, PAA) a TA y un último lavado de 20 min con esta misma solución a temperaturas específicas para cada sonda utilizada (59° C para IL-12_{p40}, TGF-β1 e IFN-γ y 60° C para IL-12Rβ2, IL-4, IL-18 y β-actina). Luego las membranas fueron expuestas a autoradiografías por diferentes tiempos (1-4 hs a TA para β-actina y TGF-β, 24 hs a -70° C para IFN-γ y 72 hs a -70° C en el resto de los casos). Dichas placas se revelaron por incubación en revelador radiográfico (G-

150 AGFA) por 10-30 seg, posterior incubación en fijador radiográfico (G-334 AGFA) por 5 min y lavado con agua corriente.

cADN	Sonda (5'→ 3')
β -actina ¹	AAAAAAGCTTGGTGATGTCTGG
IL-4 ²	CATGAGAAGGACACTCGCTG
IL-12 _{p40} ²	GGCCAGTACACCTGTCCAC
IL-12R β 2 ³	TCTCCACTATCAGGTGACCT
IFN- γ ¹	GACCTACTGTCCTACCTG
TGF- β 1 ⁴	AGTCAATGTACAGCTGCCGCA
IL-18 ⁵	CAACTCTCTCCTGTGAGAAC

Tabla 4: Secuencia de las sondas utilizadas en los ensayos de southern blot. ¹ Somoza N. y col, 1994; ² Kirk A. D. y col.; 1995; ³ Zhang M.y col, 1999; ⁴ GenBank accession N° EO3028; ⁵ Ushio S. y col., 1996.

Análisis de los datos

Las placas autorradiográficas fueron escaneadas y densitometradas utilizando el programa Imagen Quant (MD ImagenQuant Software Version 3.3). Los valores para cada transcripto fueron expresados como unidades arbitrarias de densitometría (uad), y los datos normalizados fueron expresados (sin unidades) como la relación entre las uad obtenidas para el transcripto específico y las uad obtenidas para β -actina, de este modo se corrige cualquier diferencia en el contenido de ARN entre las muestras analizadas.

Preparación de extractos proteicos

Las secciones de tejido hepático fresco tanto normal como patológico fueron pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido y colocadas en 200-300

μl buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA) con inhibidores de proteasas (PMSF 0,2 mM, aprotinina 0,1%, pepstatina 0,7 μg/ml y leupeptina 1 μg/ml); una vez obtenida la completa homogeinización del tejido, se agregó el detergente Nonidet P40 1%. La solución fue incubada 20 min en hielo y centrifugada a 12000g por 15 min para separar la fracción insoluble. El sobrenadante fue recuperado y las proteínas fueron cuantificadas mediante el método de micro BCA utilizando un kit comercial (Micro BCA Protein Assay reagent kit-Pierce).

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot

Treinta μg de extractos proteicos fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida 7,5% para IL-12_{p40} y 15% para IL-18. En cada calle se sembró la muestra previamente mezclada con un volumen igual de buffer de siembra (BioRad) con β-mercaptoetanol (2,5%, para IL-18 y 5% para IL-12_{p40}), hervida durante 3 min y brevemente centrifugada. Los geles fueron corridos durante 1h a 150V, en glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1%, utilizando una cuba de electroforesis Miniprotean II (BioRad). En una de las calles se sembró un marcador de peso molecular preteñido.

Las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad) en la misma cuba durante 1h a 220 mA, utilizando un buffer metanol 20%, glicina 192 mM, Tris 25 mM, pH 8. Se verificó la transferencia de proteínas por tinción reversible de las membranas con solución de Rojo Ponceau 0,1% en ácido tricloroacético 1% durante 5 min.

Las membranas fueron bloqueadas por 12 hs de incubación a 4° C con leche descremada 5% en buffer TBS (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,5), lavadas 4 veces (10 min) con buffer TBS-T (TBS suplementado con Tween 20 0,1%) e incubadas con el anticuerpos primarios específicos diluidos en TBS-T - leche descremada 1%. Se utilizaron anticuerpos policlonales de cabra anti-IL-18 o anti-IL-12_{p40} humanas (Santa Cruz Biothecnology, Inc.), 1:500 con incubación 12 hs a 4° C para IL-18 y 1:400 con incubación 1 h a 37° C para IL-12_{p40}. Se utilizó un anticuerpo de conejo anti IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rabanita (Santa Cruz Biothecnology, Inc.), 1:3000 1 h a TA como anticuerpo secundario.

Como sistema de detección se utilizó un kit comercial (NENTMLife Science products, Boston, MA) para productos quimioluminiscentes según protocolo adjunto. Las placas autoradiográficas fueron reveladas como se explica más arriba para el Southern blot.

2) Tipificación de polimorfismos genéticos

Extracción de ADN genómico

La sangre periférica de individuos sanos y de pacientes fue colectada en tubos estériles conteniendo EDTA. Para la extracción de ADN genómico se partió de 700 µl de sangre entera, los cuales fueron digeridos con proteinasa K (100 µg/ml) en 500 µl buffer pellet (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.4%) durante 2 hs a 56°C. Posteriormente, se realizó una extracción con 500 µl de fenol, y la fase acuosa (superior) se extrajo con 500 µl de cloroformo.

Nuevamente se tomó la fase acuosa (superior) para precipitar el ADN con etanol puro y frío por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. Luego de secado el ADN genómico fue resuspendido en 200-300 μ l de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

Tipificación del polimorfismo en el promotor de IL-10.

El ADN genómico fue amplificado en un termociclador PTC-100TM MJ Research (MJ Research Inc., Watertown, CT). Cada 30 μ l de la mezcla de reacción contuvo 100-300 ng de ADN genómico en 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton^R X-100, pH 9, 250 μ M de cada dNTPs, 3 mM MgCl₂, 600 μ M de cada *primer* (tabla 5) junto con 1 U de Taq polimerasa (Inbio-Highway, Buenos Aires, Argentina). Luego de un ciclo inicial de 3 min a 94°C, las muestras fueron sometidas a 39 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 51°C y 1 min a 72°C, con un paso final de extensión de 5 min a 72°C. El producto de amplificación de 587 pb (correspondiente a la región amplificada -1115 a -528) fue monitoreado por electroforesis en gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio 0.5 μ g/ml (Figura 2B).

Gen	Primer 5' (5'→ 3')	Primer 3' (5'→ 3')
IL-10 ¹	ATCCAAGACAACACTACTAA	TAAATATCCTCAAAGTTCC
TGF- β 1 ¹	CTTACCAGCTCCATGTCGATAG	ACTGCGCCCTTCTCCCTG

Tabla 5: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como *primers* en las PCRs de IL-10 y TGF- β 1 a partir de ADN genómico. ¹ Perrey C. y col., 1998.

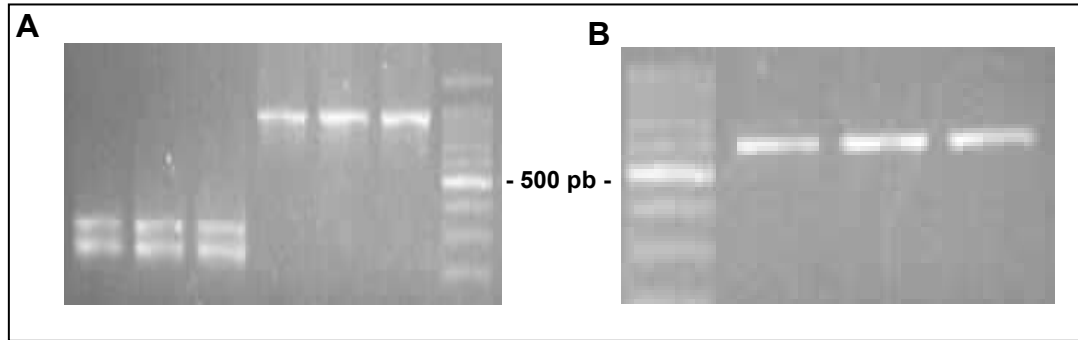


Figura 2: A) Producto de PCR de genes KIR, calle 1-3 PCR para dominios 1 y 2, calles 6-8, PCR para dominio transmembrana-citoplasmático, calle 9, *ladder* 100 pb. B) Producto de PCR para IL-10 calles 2-4, calle 1, *ladder* 100 pb.

Para la tipificación de los diferentes polimorfismos de simple nucleótido o SNPs (*simple nucleotide polymorphism*) del promotor de IL-10 se emplea la técnica de SSOP (ver más adelante) utilizando las sondas específicas para cada alelo de las posiciones -1082; -819 y -592 que figuran en la tabla 6 (Perrey C. y col., 1998). Los resultados obtenidos en los dot blot utilizando las sondas específicas para cada alelo fueron usados para determinar el genotipo de cada SNP. Los haplotipos del promotor de IL-10 fueron inferidos luego del análisis conjunto de los 3 SNPs.

SNP	alelo	Secuencia sonda (5'→ 3')	Temperatura de lavado
-1082	G	TTCTTTGGGAGGGGGAAG	51°C
	A	ACTTCCCCTTCCCAAAGAA	58°C
-819	C	GAGGTGATGTAACATCTCTGTGC	66°C
	T	GCACAGAGATATTACATCACCTGT	62°C
-592	C	CCGCCTGTCCTGTAGGAA	58°C
	A	TTCCTACAGTACAGGCGGG	58°C

Tabla 6: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como sondas en la técnica de SSOP para tipificar los SNPs del promotor de IL-10.

Tipificación de polimorfismo en el exón 1 del gen de TGF-β1

El ADN genómico fue amplificado en un termociclador PTC-100™ MJ Research (MJ Research Inc., Watertown, CT). Cada 25 µl de la mezcla de reacción contuvo 100-300 ng de ADN genómico en 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton^R X-100, pH 9, 250 µM de cada dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 600 µM de cada primer (tabla 5) junto con 1 U Taq polymerase (Inbio-Highway, Buenos Aires, Argentina). Luego de un ciclo inicial de 3 min a 94°C, las muestras fueron sujetas a 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 56°C y 1 min a 72°C, con un paso final de extensión de 5 min a 72°C. El producto de amplificación de 274 pb (correspondiente a la región amplificada +691 a +965) fue monitoreado por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml).

Luego se continuó con la técnica de SSOP (ver más adelante) utilizando sondas específicas para cada alelo del codón 10 y para el alelo Pro

del codón 25 (Perrey C. y col., 1998) que se muestran en la tabla 7. Los resultados del dot blot obtenidos para las 2 sondas del codón 10 fueron usados para determinar el genotipo de este sitio de cada individuo analizado. Para el codón 25 solo se determinó la presencia o ausencia del alelo Pro según el resultado del dot blot para esta sonda.

SNP	alelo	Secuencia sonda (5'→ 3')	Temperatura de lavado
Codón 10	Leu (T)	GCTGCTGCTGCTGCTGCT	59°C
	Pro (C)	GCTGCTGCCGCTGCTGC	57°C
Codón 25	Pro (C)	GCCTGGCCCCGCCGGCCG	56°C

Tabla 7: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como sondas en la técnica de SSOP para tipificar los SNPs del gen de TGF-β1.

Tipificación de los genes KIR

Como muestra el gráfico 4, para la tipificación de los genes KIR se realizaron 2 amplificaciones por PCR (Figura 2A), una de ellas genera 2 fragmentos correspondientes a los dominios 1 (240 pb) y 2 (302 pb) y la otra genera un fragmento correspondiente a la región transmembrana y citoplasmática del gen (930 pb), para dichas amplificaciones se utilizaron los *primers* que figuran en la tabla 8 (Middleton D. y col., 2005). Ambas PCRs fueron realizadas en un termociclador Perkin Elmer 9600. Cada 50 µl de mezcla de reacción contuvo 200-600 ng de muestras de ADN genómico, 67

mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM MgCl₂, 0.01% Tween, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 400 μM de cada primer y 2 U Taq polymerase (Inbio-Highway, Buenos Aires, Argentina). Luego de un ciclo inicial de *melting* de 5 min a 96°C, las muestras fueron sujetas a 39 ciclos de 60 seg a 96°C, 30 seg a 60°C y 90 seg a 72°C, con un paso final de extensión de 5 min a 72°C. El producto de amplificación fue monitoreada por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio (0.5 μg/ml).

Los productos de ambas PCRs fueron hibridizados con 20 sondas (tabla 9) como muestra el gráfico 4 mediante la técnica de SSOP (ver más adelante) y la presencia de cada uno de los genes KIR fue deducida según las sondas que resultan positivas para cada dominio.

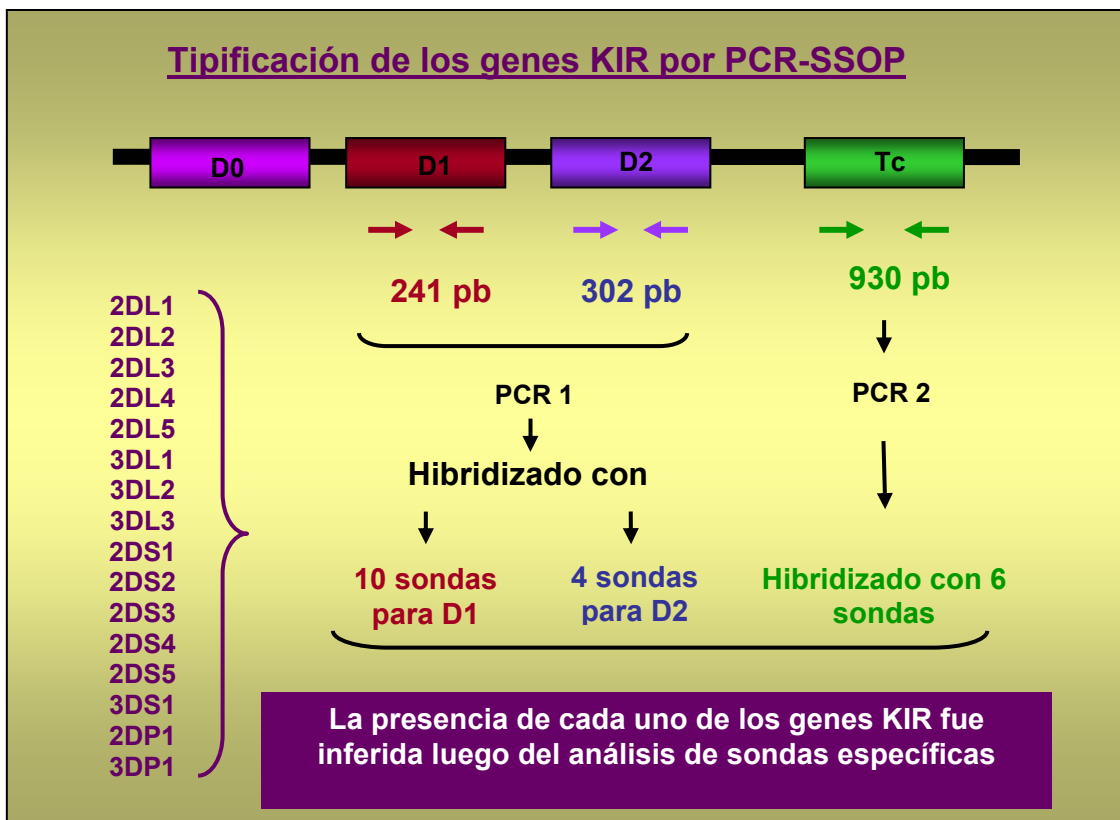


Gráfico 4: Diseño de la técnica de PCR-SSOP para la tipificación de los genes KIR

<i>primer</i>		secuencia (5'→ 3')
D2F1 sentido		CTTCCAGGTCYATATGAGAAACCTTC
D2R1 antisentido	D2	CTCACCTGTGACAGAAACRGGCAGTGG
D2F2 sentido		CTTCCAGGTCTATKTGGGAAACCTTC
D2R2 antisentido		CTCACCTITGACRGAAACAAGCAGTGG
D1F sentido	D1	AGAGAIIGTCATCCTGCARTGTTGGTC
D1R antisentido		GATCACIATGTCCAGRGGRTCACTGG
TMF1 sentido		GCTGTGATTAGGTACTIONCAGTGGCC
TMF2 sentido	Tc	GTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTC
TMF3 sentido		ATTCTGATTGGGACCTCAGTGGCT
DmcytR antisentido		TTGAGACAGGGCT(GA)TTGTCTCC

Tabla 8: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como *primers* en las PCR 1 y 2 realizadas para tipificar los genes KIR.

Genes KIR	Sondas positivas	Secuencia (5'→ 3')	Temperatura de lavado
2DL1	P20	CCTATCAGGTGTCAGCT	58°C
	P34	TCTGCAGGAAACAGAAC	49°C
2DL2	P30	CCATGAATGTAGGTTT	47°C
2DL3	P38	CTGGTGCTGCAACAAA	49°C
2DL4	P40	GCCTGCGGGACACAGAAC	60°C
2DL5	P35	CATTGCTGCTGCTAAC	47°C
3DL1	P41	CAGAACAGCCAACAGCGA	56°C
3DL2	P10	TACAGATGTTATGGTTCT	48°C
3DL3	P19	CACGATGCGGGTTCCCAG	60°C
2DS1	P22	CCATCAGTCGCATGAAGCAAG	66°C
	P31	TTGACCTTGGTCCCTGCAGG	61°C
2DS2	P11	GGGGAAGTATAAGGACA	47°C
2DS3	P14	CTATCAGTTTTTCAGCTCC	54°C
	P33	ATCTATCCACGGAGGG	50°C
2DS4	P12	TTCTCCATTGGTCCCAT	53°C
	P28	CTGCAGCT--22pb--CCATCTAT	47°C
2DS5	P17	ACGTTTAACCACTTTG	50°C
3DS1	P36	GGAACAGAAGTGAACAG	51°C
2DP1	P15	CCATGCTGGAAGACCTG	54°C
3DP1	P18	GAAGTTTAATGACTTTG	50°C

Tabla 9: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como sondas en la técnica de SSOP para tipificar los genes KIR.

Tipificación de los alelos de KIR 2DS4

La tipificación de los alelos del gen KIR 2DS4 se realizó mediante 1 reacción de PCR que genera 2 fragmentos: uno deletado de 199 pb y otro no deletado de 221 pb (Maxwell LD. y col., 2004). Se realizó la amplificación con un termociclador Perkin Elmer 9600. Cada 50 µl de la mezcla de reacción contuvo 100-300 ng de ADN genómico en 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton^R X-100, pH 9, 250 µM de cada dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 750 µM de cada primer (tabla 10, Maxwell LD. Y col, 2004) junto con 1 U Taq polymerase (Inbio-Highway, Buenos Aires, Argentina). Luego de un ciclo inicial de *melting* de 5 min a 96°C, las muestras fueron sujetas a 25 ciclos de 1 min a 96°C, 30 seg a 62°C y 1 min a 72°C y 15 ciclos posteriores de 1 min a 96°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C, con un paso final de extensión de 5 min a 72°C. El producto de amplificación fue monitoreado por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml). La aparición diferencial de los alelos deletados y no deletados fue observada en todos los casos.

primer	secuencia (5'→ 3')
Exón5F sentido	ACGGTTCAGGCAGGAGAGAA
Exón5R antisentido	TTGACCACTCGTAGGGAGC

Tabla 10: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como *primers* en la reacción de PCR para el receptor KIR 2DS4.

Los productos de PCR obtenidos fueron hibridizados con 11 sondas específicas (tabla 11) para los diferentes alelos no deletados (101, 102, 2) y deletados (3, 11y 12) mediante la técnica SSOP (según se explica más adelante). La presencia de cada uno de los alelos de KIR 2DS4 fue deducida según una combinación de sondas que resultan positivas en la técnica de dot blot (Figura 3; Maxwel LD. y col., 2004). Debido a que este gen no está presente en todos los haplotipos, los individuos que resultaron positivos para el gen KIR 2DS4 pueden tener 1 o 2 alelos del mismo. Entre los individuos que tienen 2 alelos encontraremos aquellos que poseen ambos alelos deletados, ambos no deletados o uno de cada. En aquellos individuos donde sólo se reportó un alelo no podemos descartar la presencia de dos alelos iguales

sonda	secuencia (5'→ 3')	Temperatura de lavado
P1	ATCCAGGGAGGGGGAGG	59°C
P2	ATCCAGGGAAGGGGAGG	56°C
P3	GCAGCTCC--Δ22pb--ATCTATCCAGG	62°C
P4	GGAGCTCCTATGACATG	55°C
P5	CGCAGCATCCACGGAACA	61°C
P6	GCGCAGCATCAACGGAACA	63°C
P7	TCCGTGACGCTCCCTAC	62°C
P8	CTCC--Δ22pb—ATCTATCCAGGGAAGGGGA	68°C
P9	CTCC--Δ22pb-- ATCTATCCAGGGAGGGGGA	66°C
P10	ATGTGTCCTTGCCTG	53°C
P11	TGTGTCCTTGCCTGCAGCTCC--Δ22pb--AT	74°C

Tabla 11: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas como sondas en la técnica de SSOP para tipificar los alelos de KIR 2DS4.

Alelos de KIR 2DS4	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
101		■		■		■	■				
102	■			■	■	■	■				
2	■			■	■		■			■	
3		■	■			■	■	■			
11	■		■			■	■		■		
12	■		■		■		■		■	■	■

Figura 3: combinación de sondas que resultan positivas (casilleros coloreados) para cada uno de los alelos deletados (3, 11 y 12) y no deletados (101, 102 y 2) del receptor KIR 2DS4

Tipificación de los genes de HLA-C

La tipificación de los alelos de HLA-Cw y HLA-Bw fue realizada por el servicio de histocompatibilidad que funciona en nuestro laboratorio. La identificación de los 15 alelos de HLA-Cw (*01, *02, *03, *04, *05, *06, *07, *08, *12, *13, *14, *15, *16, *17, *18) fue realizada como describe Cereb y colaboradores (1995) mediante la técnica de SSOP empleando 37 sondas marcadas con dioxigenina en su extremo 5' que reconocen los exones 2 y 3 de dicho gen. Esta técnica permite distinguir a los alelos HLA-C del grupo C1 de los pertenecientes al grupo C2. La tipificación de los grupos de alelos de HLA-B, Bw4 y BW6, fue realizada mediante el uso de la misma técnica utilizando 4 sondas marcadas que reconocen el exón 2 de este gen (Cereb N., y col., 1995).

Técnica de sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia o *Sequence-specific oligonucleotide probing (SSOP)*

Sondas marcadas con dioxigenina en su extremo 5' fueron utilizadas para identificar positivamente cada SNP de las citocinas IL-10 y TGF- β 1, los diferentes genes KIR y los alelos de KIR 2DS4 mediante la técnica de Dot blot (tablas 6, 7, 9 y 11). Un total de 2 μ l del producto de PCR fue sembrado en membranas de nylon Hybond N+ (Amersham International, Slough, UK). La doble cadena de ADN fue separada por incubación de las membranas en NaOH 0.4 M por 5 min y luego neutralizadas con solución SSPE 2X (0.3 M NaCl, 20 mM PO₄H₂Na, 2 mM EDTA, pH 7.4) por 5 min. Posteriormente el ADN fue inmovilizado por *crosslinking* en un UV Stratalinker (Stratagen Ltd, Cambridge, UK) a 1200 mJ/cm² y las membranas incubadas en 5 ml de solución de prehibridación [5X SSC (0.75 M NaCl, 2.2 % sodium citrate), 1% casein, 0.1% N-lauryl sarcosine and 0.02% SDS] por 30 min a 45°C. Luego, para la hibridización se agregaron 800 pmoles de cada una de las sondas específicas a sus respectivos tubos y se los incubó durante toda la noche a 48°C (IL-10 y genes KIR) o durante 1 hora a 45°C (TGF- β 1 y alelos de KIR 2DS4) en hornos rotatorios. Las membranas fueron lavadas en SSPE 2X conteniendo 0.1% SDS (por 10 min, a temperatura ambiente), en SSC 5X con 0.5% SDS por 20 min a temperatura específica para cada sonda (tablas 6, 7, 9 y 11) y en SSPE 2X (por 10 min a temperatura ambiente). Después de 5 min de lavado en buffer 1 (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5), las membranas fueron bloqueadas para reducir la unión no específica en buffer 1 conteniendo leche descremada al 1% (buffer 2) e incubadas con anticuerpo anti-dioxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1/10000. Roche Diagnosis,

Indianapolis, USA) en buffer 2 (por 30 min a temperatura ambiente). Las membranas fueron lavadas 2 veces en buffer 1 (10 min), una vez en buffer 3 (0.1 M Tris, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl, pH 9.5; 5 min), incubadas con 25 mM del sustrato quimioluminisciente CSPD (Roche Diagnosis, Indianapolis, USA) en buffer 3 (por 20 seg a temperatura ambiente) e incubadas por 15 min a 37°C. Por último, las membranas fueron expuestas a placas radiográficas por 30 min y luego reveladas como se describe anteriormente para el Southern blot.

3) Detección de IL-10 e IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de PBMC

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas de pacientes crónicamente infectados con HCV y de controles sanos a partir de sangre entera colectada con Heparina mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque. Para la realización del gradiente, 10 ml de sangre fueron diluidos al medio con solución fisiológica estéril y sembrados suavemente sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque estéril. Luego de una centrifugación a 2000 rpm durante 20 min a TA, las células mononucleares forman una interfase opaca. Dicha interfase fue recolectada con pipeta pasteur, colocada en un tubo nuevo y lavada 2 veces con 15 ml de solución fisiológica estéril, en cada lavado las células fueron centrifugadas durante 5 min a 2000 rpm a TA. La recuperación fue de aproximadamente $1-1.5 \times 10^6$ células/ml de sangre entera.

Cien mil células fueron activadas en forma inespecífica mediante una incubación durante 72 hs con LPS (1 μ g/ml), o con IL-2 (16 ng/ml) o de manera

específica con 10 ng/ml de dos péptidos correspondiente a la proteína NS3 del virus: aminoácido 1246 a 1263 del genitivo 1a H77 (QGYKVLVLNPSVAATLGF) y aminoácidos 1260 a 1277 del mismo genotipo (TLGFGAYMSKAHGVDPI). Las incubaciones se realizaron por triplicado en una microplaca con fondo en U (3077, Becton Dickinson) de 96 fosas en medio de cultivo IMDM con 10% de suero fetal bovino, pirivato 1 mM, gentamicina y glutamina. Transcurrido dicho tiempo, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y los niveles de IL-10 e IFN- γ determinados en pg/ml utilizando la técnica de ELISA sándwich. En todos los casos se realizó un blanco sin estímulo cuyo valor se restó al obtenido en cada fosa.

La técnica de ELISA sándwich fue realizada en microplacas de 96 fosas COSTAR 3590 (High Binding) con fondo en U. Dichas placas fueron incubadas con 50 μ l de anticuerpo anti-IL-10 humano (Endogen; 4 μ g/ml) o anti-IFN- γ humano (Endogen; 2 μ g/ml) en PBS durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, y posteriormente incubadas con 200 μ l de PBS con 2% de albúmina sérica bovina para evitar el pegado inespecífico (bloqueo) durante 90 min a TA en la misma cámara. Luego de 3 lavados con 200 μ l de Tris 50 mM, Tween-20 0.2%, se sembraron por duplicado 50 μ l de las muestras correspondientes o de la proteína recombinante en diferentes concentraciones (diluidas en medio de cultivo IMDM) para realizar la curva de calibración (15, 30, 60, 150, 450 y 750 pg/ml de IFN- γ o IL-10 humanos; Endogen), y se incubaron las placas nuevamente 90 min a TA en la cámara húmeda. El paso siguiente de la técnica consiste en la incubación con 50 μ l del anticuerpo anti-IL-10 o anti-IFN- γ conjugados a biotina (ambos 0.75 μ g/ml en PBS con 2% de albúmina sérica bovina, Endogen) durante 1 h a TA en la misma cámara.

Luego de 3 lavados, se agregaron 50 μ l de la enzima fosfatasa alcalina conjugada a extravidina (Sigma) diluida 1/10000 en PBS con 2% de albúmina sérica bovina y se incubó 30 min a TA. Luego de realizar nuevamente 3 lavados, se incubó con 100 μ l del sustrato nitrofenil fosfato 1 mg/ml (Boehringer Mannheim) en buffer dietanolamina (97 ml de dietanolamina y 155 μ l de solución saturada de Cl_2Mg por litro, pH 9.6) a TA en cámara oscura hasta obtener un producto coloreado (60-120 min). Los resultados fueron obtenidos luego de analizar la DO a 405 nm de cada fosa con un lector de ELISA (Labsystem Multiskan MS). Los valores obtenidos para la proteína recombinante se graficaron en una recta DO vs. pg/ml cuyos parámetros fueron utilizados para convertir los valores de DO de las muestras en pg/ml.

4) Citometría de flujo de los receptores de las células NK

Se obtuvieron los PBMC por gradiente de Ficoll-Hypaque a partir de sangre entera como se explica en el ítem anterior. Se colocaron entre 1-1.5 $\times 10^6$ células en diferentes tubos y se las incubó con diferentes anticuerpos. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón no comerciales que reconocen los receptores KIR 3DL1/3DL2 (10 μ l; clon 5.133), KIR 2DL2/2DS2/2DL3 (10 μ l; clon CHL), KIR 2DL1/2DS1 (10 μ l; clon HPMA4), KIR 2DL1/2DS1/2DS3 (10 μ l; clon HP3E4), CD94 (10 μ l; clon 3D9) y NKG2A (10 μ l; clon Z199) obtenidos por gentileza del Dr. Bottet; y anticuerpos comerciales de ratón para detectar 3DL1 (5 μ l; clon DX9; Becton Dickinson), 2DL4 (5 μ l; R & D Systems), 2DS4 (5 μ l; R & D Systems) y 2DL3 (10 μ l; R & D Systems). El anticuerpo anti-3DL1 se

encuentra conjugado con fluoresceína (FITC) y el anti-2DL3 con ficoeritrina (PE), el resto no tiene unido ningún fluorocromo. Adicionalmente se utilizaron 5 μ l de los correspondientes controles de isotipo de ratón no marcados IgG1 (para 3DL1/3DL2 y CD94, Dako), IgG2b (para 2DL2/2DS2/2DL3, 2DL1/2DS1 y NKG2A; Caltag), IgG2a (para 2DL4 y 2DS4; Caltag), e IgM (para 2DL1/2DS1/2DS3; DaKo); así como IgG1-FITC (para 3DL1; BD Biociences) e IgG2a-PE (para 2DL3; BD PharmingenTM). La incubación de las células con todos los anticuerpos mencionados anteriormente se realizó a TA durante 30 min y luego las células fueron lavadas 2 veces con 1 ml de solución fisiológica y centrifugadas 5 min a 1800 g. En el caso de los anticuerpos no marcados se requirió una incubación posterior con 3 μ l de un anticuerpo anti-Immunoglobulinas de ratón conjugado con FITC (DakoCytomation) durante 30 min TA, luego de la cual se repitieron los lavados. A fin de analizar la inmunomarcación correspondiente a las células NK se realizó una incubación posterior con 3 μ l de anti-CD56 (Becton Dickinson) conjugado con PE, excepto en los tubos correspondientes al anti-2DL3 e IgG2a-PE en los cuales se utilizó anti-CD56 conjugado con PerCy5 (BD PharmingenTM), por 15 min a TA. Luego de ser lavadas nuevamente con solución fisiológica, las células fueron fijadas con paraformaldehído 2% y posteriormente analizadas mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). El análisis de los resultados obtenidos fue realizado con el programa informático WinMDI2.8, el cual nos arrojó los valores de porcentaje de células positivas e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para cada marcador en las poblaciones requeridas (población linfóide total; población CD56 de alta intensidad o CD56^{bright}; y CD56 de baja intensidad o CD56^{dim}).

5) Análisis estadísticos

Las frecuencias alélicas, haplotípicas y genotípicas de los diferentes grupos de pacientes y controles se analizaron mediante tablas de contingencia de 3 x 2, empleando el test de Chi-cuadrado para muestras independientes (IL-10: GG vs. GA vs. AA; TGF- β 1 codón 10: Pro/Pro vs. Pro/Leu vs. Leu/Leu) o con tablas de 2 x 2 con el test de Fisher (IL-10: GG vs. no-GG y GA vs. no-GA; presencia vs. ausencia del alelos Pro del codón 25 de TGF- β 1, de cada uno de los genes KIR y de poblaciones observadas por citometría de flujo de receptores KIR). La corrección de Bonferoni (p_c) fue aplicada a los valores de p obtenido por el test de Fisher para IL-10 (3 grupos). Todos los análisis estadísticos fueron realizados adicionalmente por regresión logística, este método arrojó los mismos resultados que las tablas de contingencia. La frecuencia de los alelos deletados y no deletados de KIR 2DS4 fue analizada por regresión logística. En todos los casos se calculó el *Odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza del 95% (IC).

Las diferencias de medias de los experimentos de RT-PCR-Southern blot de citocinas, de ELISA de IFN- γ e IL-10 y de citometrías de flujo de receptores KIR fueron analizadas mediante el test T de Student, cuando los valores obtenidos presentaron una distribución normal, o por el test U de Mann-Witney cuando esto no sucedía. La normalidad de los datos obtenidos fue evaluada mediante el test de Shapiro Wilks modificado. Los análisis estadísticos fueron realizados con los programas informáticos Infostat y Graph-Pad Prism. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, $p < 0.01$, muy significativos y $p < 0.001$, extremadamente significativos.

Resultados

Hepatitis Viral C (HCV)

1) Polimorfismos en el promotor de IL-10

Secreción de IL-10 e INF- γ por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con HCV y controles sanos

Como se describe en la introducción, ha sido reportado en varias ocasiones que los pacientes infectados con HCV sintetizan mayores niveles de IL-10. Un primer objetivo de esta tesis fue confirmar los mencionados reportes. Para ello se analizó la síntesis de IL-10 e INF- γ por PBMC de pacientes con HCV y de controles sanos.

La síntesis de IL-10 o de INF- γ se investigó en PBMC estimuladas durante 72 hs *in vitro* en forma inespecífica con LPS (para IL-10) o IL-2 (para INF- γ) y específicamente con péptidos correspondientes a proteínas no estructurales del virus HCV (en particular la proteína NS3). Los niveles de IL-10 e INF- γ fueron medidos en los sobrenadantes de cultivo mediante la técnica de ELISA.

La respuesta inespecífica a LPS de pacientes HCV mostró mayores niveles de IL-10 que los controles (874 ± 107.1 pg/ml, n=19 vs. 436.5 ± 98.76 pg/ml, n=11; p=0.009; figura 4). En tanto que niveles de INF- γ luego de estimular con IL-2 fueron muy variados y en promedio similares en ambos grupos de pacientes.

Cuando se estimularon PBMC con péptidos virales, se observó que tanto los pacientes HCV como los controles responden principalmente con la secreción de IL-10 más que con la secreción de INF- γ (figura 4B).

A raíz de estos datos, resultó interesante estudiar la capacidad de secretar IL-10 desde el punto de vista genético, evaluando diferentes polimorfismos que afectan los niveles de expresión de esta citocina.

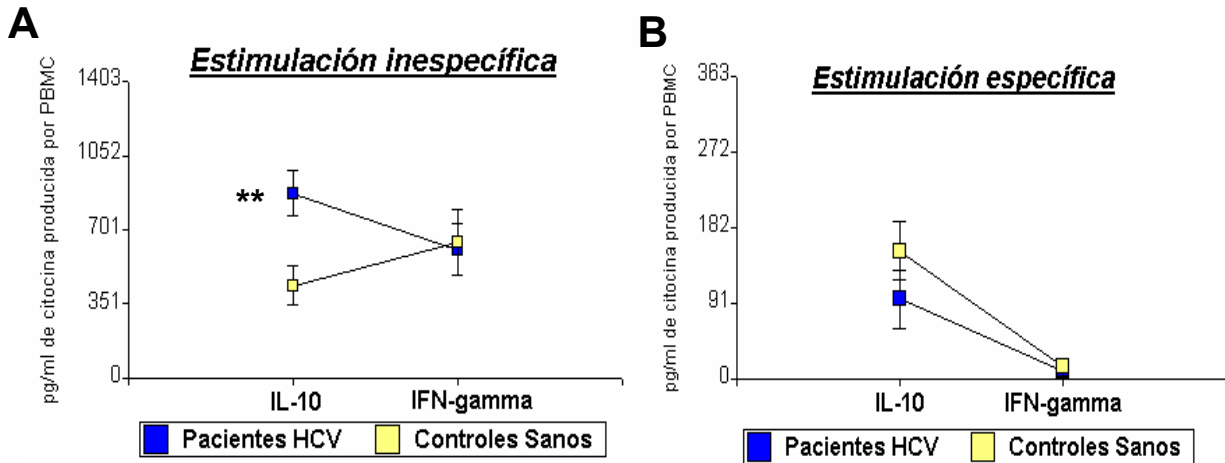


Figura 4: Producción de IL-10 e INF- γ por PBMC de pacientes con HCV y controles sanos luego de la estimulación inespecífica con LPS o IL-2, respectivamente (A) o luego de la estimulación específica con péptidos virales (B). Las citocinas fueron detectadas en los sobrenadantes de cultivo mediante la técnica de ELISA luego de 72 hs de estimulación. ** $p < 0.01$ comparando los niveles de IL-10 producidos por pacientes y controles (test T de Student).

Polimorfismos funcionales en el promotor de IL-10

Como se ilustra en el gráfico 5, el promotor del gen de la IL-10 presenta 3 sitios polimórficos (SNPs) ubicados en las posiciones -1082 (G/A); -819 (C/T) y -592 (C/A). Estos sitios han permitido identificar en diferentes poblaciones la presencia de tres haplotipos; GCC, ACC y ATA.

El haplotipo GCC se asocia con una alta expresión de IL-10, el ACC con media y el ATA con baja. En homocigosis, el alelo GCC, genera niveles de IL-10 mucho mayores que los producidos por el resto de las combinaciones (Plothow A. y col, 2003). A partir de estos haplotipos se pueden identificar en los diferentes individuos de la población los genotipos GCC/GCC (a los que llamaremos GG), GCC/ACC, GCC/ATA (GA), ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA (denominado AA).

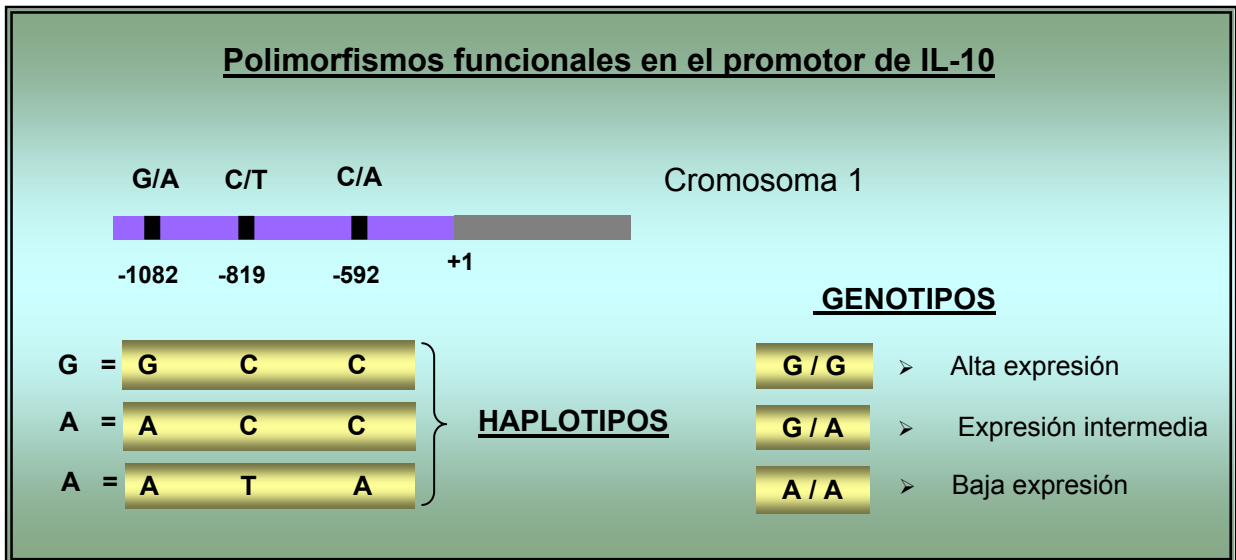


Gráfico 5: Polimorfismos funcionales en el promotor del gen de IL-10.

Frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de IL-10 en individuos sanos

En estudios previos, se han encontrado diferencias étnicas en las frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de IL-10. Las frecuencias de los genotipos GG, GA y AA halladas en la población caucásica argentina resultaron muy similares a las reportadas en la población caucásica de Brasil (Plothow A y col., 2003). Sin embargo, como muestra la tabla 12, estas frecuencias difieren de las reportadas en otras poblaciones. Por ejemplo, en Inglaterra y Australia el haplotipo GCC esta presente en aproximadamente el 50% de los individuos blancos (Edwards-Smith CJ. y col., 1999; Lim S. y col., 1998), encontrándose en forma homocigota en el 16-26% de los individuos de Noruega, América del Norte de Italia (Lio D. y col., 2003; Mangia AR. y col., 2004; Myhr KM. y col., 2003; Vidigal PG. y col., 2002). Por otro lado, un estudio de Japón, demostró que el haplotipo GCC es sumamente infrecuente (4-6%), no encontrándose ningún individuo con el genotipo GG (Hamada H. y col., 2003; Ide AE. y col., 2002; Moraes MO. y col., 2003).

Haplotipos del promotor de IL-10	Frecuencia Haplótica			Frecuencia Genotípica		
	GCC	ACC	ATA	GG	GA	AA
Argentinos	0.35	0.40	0.26	0.10	0.48	0.42
Brasileros	-	-	-	0.11	0.45	0.44
Australianos blancos	0.51	0.28	0.21	-	-	-
Ingleses blancos	0.49	0.29	0.22	-	-	-
Noruegos	-	-	-	0.26	0.49	0.24
Sicilianos	-	-	-	0.25	0.64	0.11
Norteamericanos	-	-	-	0.17	0.39	0.44
Italianos	-	-	-	0.16	0.46	0.39
Japoneses	0.04	0.27	0.69	0.00	0.08	0.92

Tabla 12: Frecuencia de los haplotipos y genotipos del promotor de IL-10 en individuos sanos de diferentes poblaciones.

Frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de IL-10 en pacientes con HCV en función del género

Cuando se compararon el total de pacientes HCV con los controles sanos, las frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de IL-10 resultaron similares. Sin embargo, las diferencias resultaron significativas al comparar las frecuencias genotípicas de los controles (GG, GA y AA), con las mujeres infectadas con HCV ($p=0.039$, tabla 13).

Adicionalmente, se hicieron las comparaciones GA vs. no-GA y GG vs. no-GG. Dicho análisis reveló la existencia de una disminución en la frecuencia del genotipo GA ($p=0.03$, $pc=0.09$, $OR=0.9$, $IC=0.4-0.95$), junto con una tendencia a un incremento en la frecuencia del genotipo GG en las mujeres con

HCV (0.17 en mujeres HCV vs. 0.10 en controles). Estos resultados permiten asignar un efecto de género en la participación del polimorfismo de IL-10 en la patogénesis de la HCV. Cabe aclarar que no se han encontrado diferencias en las frecuencias genotípicas y haplotípicas del promotor de IL-10 en relación con la edad y el genotipo viral de los pacientes infectados con HCV.

El análisis de los controles sanos, no mostró diferencias en las frecuencias entre hombres y mujeres, por lo tanto, todas las comparaciones subsecuentes que involucraron tanto hombres como mujeres con HCV fueron realizadas con el total de la población control (mujeres más hombres)

Efecto del género en las frecuencias del promotor de IL-10 en pacientes HCV que no eliminan el virus (RNA+)

El efecto de género descrito en la sección anterior se obtuvo analizando a todas las mujeres, sin tener en cuenta la forma clínica de la infección. Resultó muy ilustrativo el efecto de género cuando el análisis comparó las frecuencias genotípicas (GG/GA/AA) de las mujeres que no eliminaron el virus (HCV RNA+) con los controles, ($p=0.004$) o con los hombres HCV RNA+ ($p=0.04$; tabla 13). En particular, las mujeres que no eliminan el virus (HCV RNA+) muestran una asociación más fuerte cuando en este grupo se incluyen sólo aquellas que presentan transaminasas (ALAT) elevadas (mujeres HCV RNA+ ALATE vs. CS: $p=0.0006$; mujeres HCV RNA+ ALATE vs. hombres HCV RNA+ ALATE: $p=0.028$).

El análisis de la frecuencias GG vs. no-GG mostró un incremento en la frecuencia del genotipo GG en las mujeres HCV RNA+ vs. los controles ($p=0.03$, $pc=0.09$, $OR=2.2$, $IC=1.1-4.2$). Nuevamente, esta comparación llega a

ser más significativa cuando sólo se toman en cuenta las mujeres RNA+ ALATE ($p=0.0013$, $pc=0.039$, $OR=3.3$, $IC=1.6-6.5$).

El aumento en la frecuencia del genotipo GG en las mujeres HCV RNA+ resultó acompañado por una disminución en la frecuencia del genotipo GA, tanto en comparación con los controles ($p=0.004$, $pc=0.012$, $OR=0.5$, $IC=0.3-0.8$) como con los hombres HCV RNA+ ($p=0.015$, $pc=0.045$, $OR=0.5$, $IC=0.3-0.9$).

Estos resultados nos permiten asociar a los mayores niveles de IL-10 a través de la presencia del genotipo alto productor (-1082GG) con un peor pronóstico de la enfermedad en mujeres infectadas con HCV (RNA+ ALATE). Esto indicaría que una alta expresión de IL-10 favorecería la generación del daño tisular hepático (transaminasas elevadas). Estos resultados son consistentes con el hecho de que una importante respuesta Th1 en la fase aguda de la infección podría ser la clave de la resolución de la infección (Khakoo SI. y col., 2004), evento difícil de obtener en individuos con altos niveles de IL-10.

	n	Frecuencia genotípica				GG vs. GA vs. AA	GG vs. No GG	GA vs. No GA
		GG	GA	AA		(test Chi-cuadrado)	(Test Fisher)	(Test Fisher)
Controles Sanos (CS)	209	0.10	0.48	0.42				
Mujeres (M)	88	0.10	0.50	0.40				
Hombres (H)	121	0.09	0.50	0.41				
pacientes HCV	286	0.15	0.43	0.42				
Mujeres (M)	125	0.17	0.36	0.47	M HCV vs. CS	p=0.039	pc=0.09, OR=0.9	
Hombres (H)	161	0.13	0.49	0.38				
					RNA – vs. CS	p=0.03	pc=0.03, OR=0.3	
HCV RNA-	25	0.04	0.76	0.20	RNA – vs. total HCV	p=0.005	pc=0.003, OR=0.23	
					RNA – vs. RNA+	p=0.002	pc=0.0015, OR=0.2	
HCV RNA+	261	0.16	0.40	0.44				
Mujeres (M)	107	0.19	0.31	0.50	M RNA+ vs. CS	p=0.004	pc=0.09, OR=2.2	
					M RNA+ vs. H RNA+	p=0.04	pc=0.045, OR=0.5	
HCV RNA+ ALATN	61	0.13	0.32	0.55				
HCV RNA+ ALATE	200	0.19	0.42	0.39	RNA+ ALATE vs. CS	p=0.02		
Mujeres (M)	74	0.25	0.30	0.45	M ALATE vs. CS	p=0.0006	pc=0.039, OR=3.3	
					M ALATE vs. H ALATE	p=0.028		
HCV RNA+ con cirrosis	123	0.16	0.40	0.44				
HCV RNA+ sin cirrosis	138	0.16	0.44	0.39				
Mujeres (M)	54	0.24	0.27	0.49	M s/cirr vs. CS	p=0.003	pc=0.027, OR=0.3	
					M s/cirr vs. H s/cirr	p=0.009	pc=0.009, OR=3	
HCV RNA+ sin cirrosis > de 40 años	98	0.18	0.42	0.40				
Mujeres (M)	41	0.27	0.27	0.46	M s/cirr > 40 a vs. CS	p=0.0026	pc=0.021, OR=0.29	
							pc=0.45, OR=2.5	

Tabla 13: Frecuencia de genotipos del promotor de IL-10 en controles sanos y en individuos infectados con el virus de la Hepatitis C (HCV) en la población argentina en función del género y de la evolución de la infección. Resultados publicados en *Journal of Virology*, 2006.

Frecuencias del promotor de IL-10 en pacientes con formas auto-limitadas de la infección (RNA-)

En los pacientes con formas autolimitadas de la infección, las frecuencias genotípicas del promotor de IL-10 (GG/GA/AA) mostraron diferencias significativas con la población control ($p=0.03$), o con los pacientes HCV RNA+ ($p=0.002$). Como muestra la tabla 13, estas diferencias se deben a un incremento en la frecuencia del genotipo GA (RNA- vs. CS: $p=0.01$, $p_c=0.03$, OR=0.3, IC=0.1-0.76; RNA- vs. RNA+: $p=0.0005$, $p_c=0.0015$, OR=0.2, IC=0.08-0.5).

Estos resultados refuerzan los mostrados anteriormente, dado que así como el genotipo GG se asocia a un peor pronóstico de la infección, el genotipo GA facilitaría la auto-eliminación del virus.

Efecto antifibrótico del genotipo GG del promotor de IL-10 en mujeres con HCV

En los pacientes cirróticos, las frecuencias genotípicas del promotor de IL-10 (GG/GA/AA) resultaron similares a la población control (tabla 13). Sin embargo, encontramos una diferencia significativa cuando evaluamos a las mujeres no cirróticas en comparación con la población control ($p=0.003$) y con el grupo de pacientes hombres no cirróticos ($p=0.009$).

Un análisis más exhaustivo de dichas frecuencias mostró que el genotipo GG se encuentra aumentado en las mujeres no cirróticas en comparación con los controles sanos ($p=0.009$, $p_c=0.027$, OR=0.3, IC=0.15-0.7), indicando un efecto antifibrótico al genotipo alto productor de IL-10. Además, una disminución de la frecuencia del genotipo GA fue evidente en

estas mujeres en comparación con los controles ($p=0.009$, $pc=0.027$, $OR=2.4$, $IC=1.3-4.7$) y con los hombres no cirróticos ($p=0.003$, $pc=0.009$, $OR=3$, $IC=1.4-6.2$). La asociación del genotipo de alta expresión de IL-10 con la ausencia de cirrosis concuerda con el rol antifibrótico reportado para esta citocina (Nelson DR. y col., 2000).

Frecuencias del promotor de IL-10 en pacientes HCV en función de la edad

Como se describió anteriormente, la evolución de la infección por el virus HCV depende de diversos factores, uno de ellos es la edad a la cual los individuos contraen la infección. El análisis de las frecuencias genotípicas del promotor de IL-10 en función de la edad de los pacientes mostró diferencias significativas en las mujeres no cirróticas mayores de 40 años en comparación con la población control ($p=0.0026$) y con los hombres infectados con las mismas características ($p=0.02$), a pesar de no haber encontrado diferencias en función de la edad cuando tomamos al grupo de pacientes en su totalidad. Estas diferencias resultan de un incremento en la frecuencia del genotipo GG (mujeres HCV no cirróticas mayores de 40 años vs. CS: $p=0.007$, $pc=0.021$, $OR=0.29$, $IC=0.13-0.66$); y de una disminución del genotipo GA (mujeres HCV no cirróticas mayores de 40 años vs. CS: $p=0.015$, $pc=0.045$, $OR=2.5$, $IC=1.2-5.4$; mujeres HCV no cirróticas mayores de 40 años vs. hombres HCV no cirróticos mayores de 40 años: $p=0.02$, $pc=0.06$, $OR=2.9$, $IC=1.2-6.9$).

Las frecuencias genotípicas del promotor de IL-10 encontradas en las mujeres con HCV menores de 40 años no resultaron diferentes de las

presentes en la población control. Sin embargo, el número de pacientes incluidos en este grupo fue pequeño.

Como controles adicionales se analizó el polimorfismo del promotor de IL-10 en 55 individuos con enfermedad pulmonar crónica y 102 pacientes con enfermedad celíaca. En estas patologías no se observaron diferencias con los individuos controles.

Producción de IL-10 e IFN- γ por PBMC de pacientes infectados por el HCV en función del genotipo del promotor de IL-10

A fin de confirmar que el polimorfismo en el promotor de IL-10 opera en nuestro grupo de pacientes con HCV del mismo modo en que ha sido reportado en otras poblaciones, evaluamos el genotipo del promotor de IL-10 en los individuos con infección crónica por HCV en los cuales se analizó previamente la producción de IL-10 e IFN- γ por PBMC

Como se observa en la figura 5A, los niveles de secreción de IL-10 luego de la estimulación con LPS son mucho mayores en los PBMC provenientes de individuos portadores del genotipo -1082GG de alta expresión del promotor de IL-10 que en los pacientes con genotipo GA o AA. Cuando observamos la secreción de IFN- γ por estimulación con IL-2, encontramos el fenotipo opuesto. Los individuos portadores del genotipo GG secretan niveles menores de dicha citocina que el resto de los pacientes. Sin embargo, las diferencias observadas no alcanzan la significación estadística.

En virtud de que las mayores diferencias de la secreción de IL-10 se encuentran en los individuos con genotipo GG, en concordancia con las evidencias bibliográficas, reagrupamos a los pacientes en dos grupos:

portadores y no portadores del genotipo de alta expresión -1082GG (GG y no-GG, respectivamente).

En el caso de la estimulación inespecífica con LPS, los niveles de IL-10 obtenidos en pacientes con genotipo -1082GG resultaron significativamente mayores que los niveles de los obtenidos en los pacientes que no llevan este genotipo (pg/ml de IL-10 secretados en respuesta a LPS de pacientes con genotipo GG: 1512 ± 87 n=2; vs. pacientes con genotipo no-GG: 773.5 ± 124.9 , n=14; p=0.048; test T de Student; figura 5B).

Los niveles de secreción de IFN- γ en respuesta a IL-2, parecen ser superiores en los individuos no-GG que en los pertenecientes al grupo GG, sin embargo, no presentan diferencias significativas.

En un subsecuente análisis se comparó la respuesta a LPS y a IL-2 en los individuos GG y en los no GG. Los pacientes con genotipo -1082GG, la producción de IL-10 en respuesta a LPS resultó significativamente superior que la producción de IFN- γ en respuesta a IL-2 (pg/ml de IL-10 secretados en respuesta a LPS de pacientes con genotipo GG: 1512 ± 87 , n=2; vs pg/ml de IFN- γ en respuesta a IL-2 de los mismos pacientes: 139 ± 52 , n=2; p=0.007; test T de Student). Por el contrario, los pacientes con genotipo no-GG secretan niveles comparables de ambas citocinas tanto ante la estimulación específica como inespecífica (figura 5B).

Cuando se analizó la secreción de IL-10 en respuesta a la estimulación específica con péptidos virales, se observó un perfil de respuesta similar al obtenido en la estimulación inespecífica (Figura 5C). Por el contrario, no se detectaron diferencias en los niveles medios de secreción de IFN- γ luego de este tipo de estimulación.

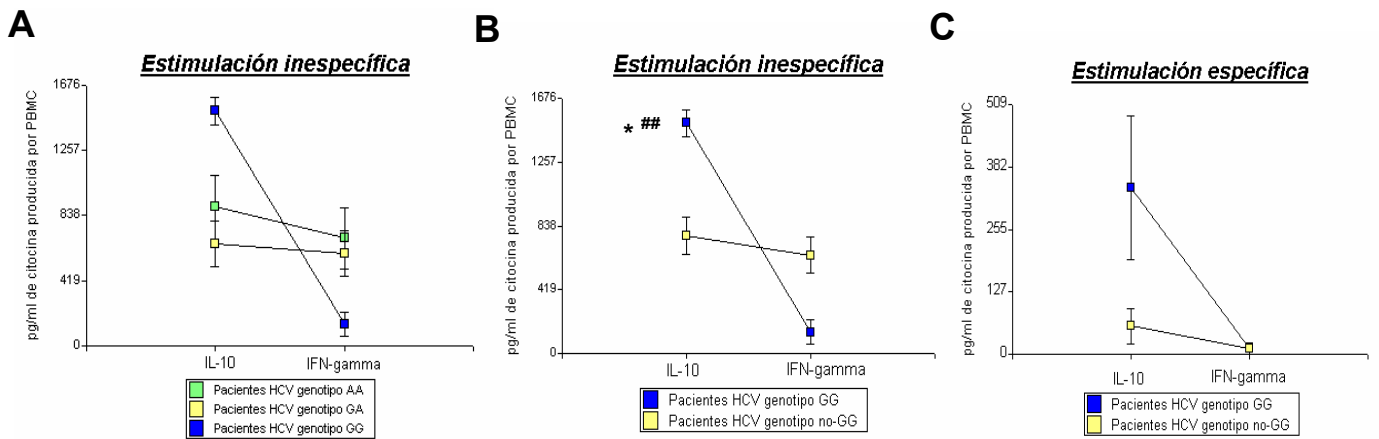


Figura 5: Producción de IL-10 e INF- γ por PBMC de pacientes con HCV en función del polimorfismo del promotor de IL-10 luego de la estimulación inespecífica con LPS o IL-2, respectivamente (A-B) o luego de la estimulación específica con péptidos virales (C). Los pacientes fueron clasificados según su genotipo en GG, GA y AA (A), o en GG y no-GG (B y C). Las citocinas fueron detectadas en los sobrenadantes de cultivo mediante la técnica de ELISA luego de 72 hs de estimulación.* $p < 0.05$ en comparación con los niveles de IL-10 producidos por pacientes con genotipo no-GG, ## $p < 0.01$ en comparación con los niveles de INF- γ producidos por pacientes con genotipo GG (test T de Student).

2) Polimorfismos en el gen de TGF- β 1

Polimorfismos funcionales en el exón 1 del gen de TGF- β 1

El gen TGF- β 1 presenta numerosos sitios polimórficos, muchos de los cuales afectan los niveles de expresión o secreción de esta citocina. Entre ellos se encuentran el polimorfismo en el codón 10 del exón 1, que consiste en una sustitución de una Leucina por una Prolina (Leu/Pro). Esta sustitución ubicada en la secuencia señal afecta los niveles de secreción de la proteína. También en el exón 1 se localiza un polimorfismo en el codón 25, que consiste en una

sustitución de una Arginina por una Prolina (Arg/Pro). La presencia del alelo Arg se asocia con la producción de niveles mayores de TGF-β1 que la observada en individuos que poseen el alelo Pro (Bijlsma FJ. y col., 2002).

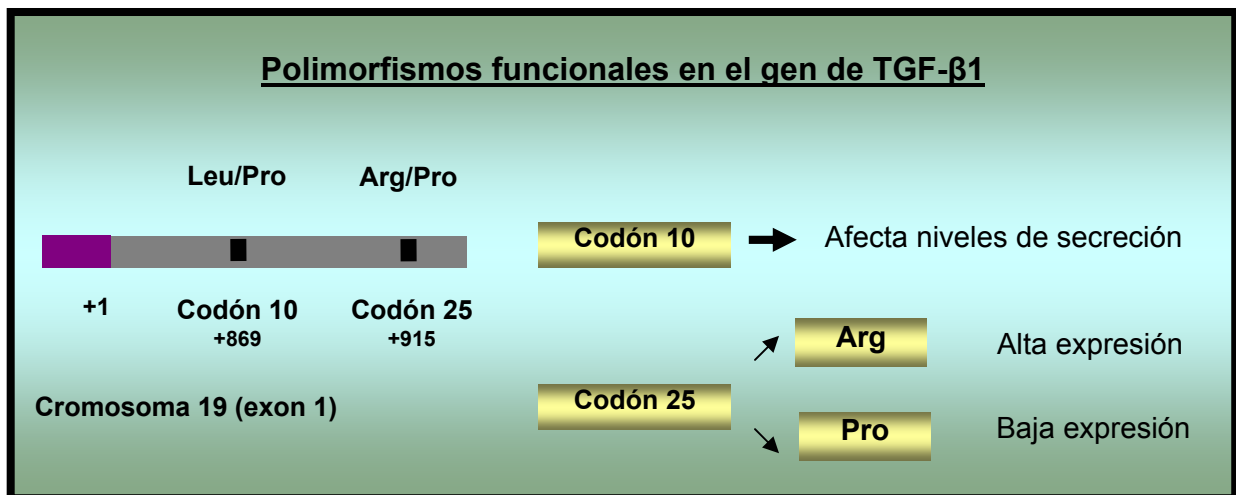


Gráfico 6: Polimorfismos funcionales en los codones 10 y 25 del gen de TGF-β1.

Análisis de los polimorfismos en el gen de TGF-β1 en HCV

Como muestra la tabla 14, cuando se comparan con los controles, los pacientes infectados con HCV muestran una disminución en la frecuencia del alelo 25Pro (bajo productor; $p=0.043$, $OR=0.55$). Esta disminución resultó más evidente en individuos que presentan algún grado de fibrosis (F1-4; $p=0.018$, $OR=0.25$). Debido a que este es un alelo de baja producción, esta disminución implica un aumento en la frecuencia de individuos capaces de producir mayores niveles de TGF-β1.

El análisis conjunto del polimorfismo de TGF- β 1 e IL-10 reveló un incremento en la frecuencia de individuos 25Pro+ IL-10GG en los pacientes que no desarrollan fibrosis (F0; $p=0.045$, $OR=0.09$, tabla 14). Estos individuos (25Pro+, IL-10 -1082GG) secretan bajos niveles de TGF- β 1, junto con elevados niveles de IL-10. La combinación de bajos niveles de una citocina profibrótica y elevados niveles de una citocina antifibrótica, sería clave para evitar el proceso fibrogénico.

Adicionalmente, se observó una disminución de la frecuencia 25Pro+ IL-10 no-GG en los individuos RNA+ ($p=0.009$, $OR=0.4$), en particular en aquellos con ALAT elevadas ($p=0.01$, $OR=0.37$). Dicha combinación de genotipos implica baja expresión de ambas citocinas. Esta disminución de frecuencia es sinónimo de protección, indicando que la disminución de TGF- β 1 e IL-10 evitaría la generación de la patología crónica.

Polimorfismos	n	Frecuencia genotípica					
		TGF- β 1		TGF- β 1 + IL-10			
		Pro+	Pro-	Pro+		Pro-	
	Pro+	Pro-	GG	No-GG	GG	No-GG	
Controles sanos	183	0.17	0.83	0.01	0.16	0.10	0.73
Pacientes HCV	246	0.10*	0.90	0.02	0.08	0.10	0.80
HCV RNA-	21	0.16	0.84	0.00	0.16	0.00	0.84
HCV RNA+	225	0.10	0.90	0.03	0.07**	0.11	0.79
RNA+ ALATN	58	0.12	0.88	0.04	0.10	0.06	0.80
RNA+ ALATE	166	0.08	0.92	0.02	0.07**	0.13	0.78
RNA+ sin fibrosis (F0)	35	0.14	0.86	0.11*	0.05	0.17	0.67
RNA+ con fibrosis (F1-4)	190	0.07*	0.93	0.01	0.06	0.10	0.83

Tabla 14: Frecuencias alélicas y genotípicas del codón 25 del gen de TGF- β 1 solo y en combinación con el polimorfismo en el promotor de IL-10 en controles sanos y en individuos infectados con HCV en relación con la evolución de la infección. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ en comparación con los controles sanos.

El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas del codón 10 del gen de TGF- β 1 mostraron frecuencias similares entre pacientes y controles (tabla 15), sugiriendo un papel más importante para el alelo 25Pro.

Estos resultados indicarían que la capacidad genética de producir elevados niveles de TGF- β 1 sería un factor de riesgo para la evolución a cirrosis, en tanto que elevados niveles de IL-10 contribuyen a prevenir el desarrollo de fibrosis en pacientes infectados con HCV.

Polimorfismos del codón 10 del gen de TGF- β 1	n	Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica		
		Pro	Leu	Pro/Pro	Pro/Leu	Leu/Leu
Controles	183	0.46	0.54	0.17	0.83	0.28
Pacientes HCV	245	0.47	0.53	0.24	0.47	0.29
HCV RNA-	21	0.42	0.58	0.16	0.53	0.32
HCV RNA+	224	0.47	0.53	0.24	0.47	0.30
RNA+ sin fibrosis (F0)	34	0.52	0.48	0.19	0.67	0.14
RNA+ con fibrosis (F1-4)	190	0.44	0.56	0.24	0.41	0.35

Tabla 15: Frecuencias alélicas y genotípicas del codón 10 del gen de TGF- β 1 en controles sanos y en individuos infectados con el virus HCV en relación con la evolución de la infección.

3) Papel de los Receptores KIR de las células NK en la infección por HCV

Frecuencias génicas de los receptores KIR en HCV

Un primer análisis de la frecuencia de los genes **KIR 2DS1-3 2DS5, 3DS1, 2DL1-3, 2DL5 y 2DP1** en pacientes infectados con HCV mostró resultados similares a los hallados en los controles (tabla 16). Cabe aclarar que no se incluye el análisis de los genes **KIR 2DL4, 3DL2, 3DL3 y 3DP1** ya que se hallan presentes en todos los individuos de ambas poblaciones. Sin embargo, se hallaron diferencias cuando el análisis de la frecuencia de los genes KIR se realizó teniendo en cuenta la evolución de la infección

Frecuencias de los genes KIR en pacientes HCV que auto-eliminaron el virus (RNA-)

En estos pacientes, el análisis de las frecuencias genómicas reveló algunas diferencias con la población normal. Las frecuencias de los genes **KIR 2DS2 y 2DL2** se encuentran disminuida en los pacientes con patología auto-limitada (2DL2: HCV RNA- vs. controles: $p=0.047$, RNA- vs. RNA+: $p=0.04$; 2DS2: HCV RNA- vs. RNA+: $p=0.014$). Como estos genes se encuentran juntos en la mayoría de los haplotipos, se podría inferir que el gen 2DL2 presente en estos haplotipos podría estar asociado con un efecto inhibitor de la eliminación viral, y su disminución favorecería el efecto de genes activadores como el 2DS5, que se halló aumentado en estos pacientes (HCV RNA- vs. controles:

p=0.04) sugiriendo que el aumento de la actividad citotóxica favorecería la eliminación viral.

Genes KIR	n	Genes KIR activadores					genes KIR inhibidores					2DP1	
		2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5		3DL1
Controles Sanos	339	0.45	0.58	0.29	0.95	0.35	0.40	0.95	0.61	0.85	0.55	0.95	0.95
Pacientes HCV	257	0.40	0.61	0.35	0,88**	0.36	0.47	0.96	0.61	0.86	0.58	0.91	0.96
HCV RNA+	234	0.43	0.62	0.35	0,88**	0.35	0.46	0.96	0.63	0.87	0.57	0,90*	0.96
HCV RNA -	23	0.62	0,38[#]	0.29	0.90	0,57*	0.57	0.95	0,38**	0.90	0.67	0.95	0.95
RNA+ ALATE	180	0.42	0.65	0,40*	0,89*	0.30	0.44	0.97	0.66	0.88	0.55	0.90	0.97
RNA+ ALATN	54	0.47	0.56	0.30	0.88	0.42	0.51	0.93	0.60	0.81	0.58	0.93	0.93
No cirróticos	125	0.42	0.58	0.30	0.92	0.32	0.48	0.96	0.65	0.91	0.55	0.94	0.96
Cirróticos	109	0.42	0.64	0.37	0,86**	0.31	0.42	0.97	0.57	0.85	0.55	0,86**	0.97

Tabla 16: Frecuencia de los genes KIR en controles sanos y en individuos infectados con HCV en función de la evolución de la infección. Los genes KIR 2DL4, 3DL2, 3DL3 y 3DP1 están presentes en todos los individuos. Los controles sanos fueron evaluados por la Lic. en Biotecnología Ana Claudia Flores, becaria doctoral de la CONICET. * p<0.05, ** p<0.01 en comparación con los controles sanos y [#] p<0.05 en comparación con los pacientes HCV RNA+; Test de Fisher. Resultados publicados en *Tissue Antigens*, 2007.

Frecuencias de los genes KIR en pacientes HCV crónicos (RNA+)

En los pacientes con infección persistente (RNA+) y daño hepático (enzimas hepáticas elevadas, ALATE) se observó un aumento significativo del

gen **KIR 2DS3** (HCV RNA+ ALATE vs. CS: $p=0.018$). Este dato es de interés, dado que este gen tiene una baja frecuencia en la población caucasoide y se encuentra prácticamente ausente en la mayoría de las poblaciones amerindias estudiadas (Flores AC y col., 2007; Gendzekhadze K. y col., 2006).

Otro hallazgo potencialmente relevante en los pacientes RNA+ que desarrollan cirrosis es la disminución de la frecuencia del gen KIR 3DL1 (otro gen inhibidor de citotoxicidad). Los KIR 3DL1 y 3DS1 son alelos del mismo gen correspondiente a un locus presente en todos los individuos. Por lo tanto, la disminución de 3DL1 implica un aumento en la frecuencia de individuos homocigotos para el gen activador KIR 3DS1. Como muestra la figura 6, la frecuencia de homocigotos para 3DS1 está aumentada en los pacientes cirróticos, particularmente cuando los individuos son positivos u homocigotos para HLA-Bw4 (ligando de estos genes).

Esto colocaría a los genes estimuladores de citotoxicidad **KIR 2DS3** y **3DS1** en la lista de los factores de riesgo asociado con formas evolutivas de la infección por HCV.

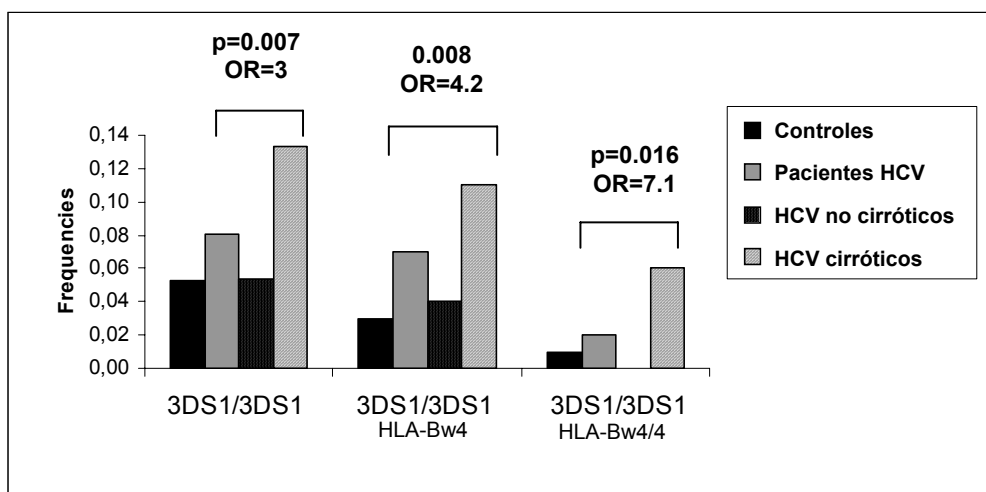


Figura 6: Frecuencia de los genes 3DS1 y HLA-Bw4 en pacientes cirróticos. Los controles sanos fueron evaluados por la Lic. en Biotecnología Ana Claudia Flores, becaria doctoral de la CONICET.

La frecuencia de las restantes combinaciones receptor/ligando, KIR/MHC de clase I conocidas hasta el momento (2DL1 y 2DS1 en combinación con HLA-C2 y 2DL2, 2DL3 y 2DS2 en combinación con HLA-C1) resultaron similares a las obtenidas en la población control (la tipificación de los alelos de HLA clase I fue realizada por el servicio de Histocompatibilidad que funciona en nuestro laboratorio. Datos no mostrados).

Frecuencias alélicas del gen KIR 2DS4 en HCV

Un primer análisis del gen KIR 2DS4 mostró una frecuencia disminuida en los pacientes con HCV ($p=0.002$), en particular en aquellos que presentan cirrosis ($p=0.01$). Como este resultado no se correspondía con el aumento observado de los genes estimuladores KIR 2DS3 y KIR3DS1, (ver sección previa) se analizó la frecuencia de los diferentes alelos del gen KIR 2DS4. El motivo de este análisis se origina en que KIR 2DS4 presenta varios alelos, algunos de los cuales tienen una delección en la porción transmembrana, son secretados al medio extracelular, y al no expresarse en la membrana no podrían ejercer su función estimuladora de citotoxicidad (3, 11 y 12) (Maxwell LD. Y col., 2004; Middleton D. y col., 2007).

Cuando se efectuó el análisis de los diferentes alelos de KIR 2DS4, comparando a los pacientes con HCV (en particular pacientes cirróticos) con controles sanos, se observó una disminución muy significativa de los alelos deletados (HCV cirróticos vs., CS: $p=0.0006$, $OR=0.36$; Tabla 17). En particular se hallaron disminuidos los alelos deletados 11 y 12 en los pacientes RNA+ (HCV RNA+ vs. CS: $p=0.01$, $OR=0.55$ y $p=0.004$, $OR=0.29$; respectivamente), y el alelo 3 en los pacientes que evolucionaron hacia la cirrosis (HCV cirróticos

vs. HCV no cirróticos: $p=0.003$, $OR=0.3$). El hecho de que los alelos deletados de KIR 2DS4 sean secretados al medio extracelular nos permite suponer que pueden tener una función inhibitoria sobre la actividad citotóxica secuestrando ligandos.

Frecuencia de alelos de KIR 2DS4	N	NO DELETADOS (Estimulador de citotoxicidad)				DELETADOS (Receptor soluble)			
		No deletado	101	102	2	Deletado	3	11	12
Controles Sanos	420	0.37	0.36	0.02	0.00	0.77	0.53	0.31	0.11
Pacientes HCV	257	0.47	0.46	0.01	0,004	0.65**	0.51	0.20*	0.04**
HCV RNA+	218	0.46	0.45	0.01	0,01	0.66*	0.52	0.21*	0.03**
HCV RNA -	21	0.44	0,44	0.00	0.00	0.63	0,50	0.19	0.00
RNA+ ALATE	142	0.48	0.47	0,01	0,00	0.67**	0.52	0.20	0.03*
RNA+ ALATN	52	0.47	0.45	0.02	0.02	0.67	0.53	0.24	0.04
No cirróticos	77	0.42	0.42	0.00	0.00	0.75	0.65	0.18	0.03
Cirróticos	67	0.55	0.52	0.02	0,02	0.53***##	0.38##	0.22	0.02

Tabla 17: Frecuencia de los alelos del gen KIR 2DS4 en controles sanos y en individuos infectados con HCV en función de la evolución de la infección. Las frecuencias fueron calculadas dividiendo el número de individuos positivos para cada alelo o grupo de alelos (deletado y no deletado) sobre el total de individuos de la población (individuos 2DS4 positivos y negativos). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ en comparación con los controles sanos y ## $p<0.01$ en comparación con los pacientes HCV RNA+ no cirróticos, Test Chi cuadrado por Regresión Logística.

Debido a que el gen KIR 2DS4 no está presente en todos los individuos (por no formar parte de todos los haplotipos), resultó interesante analizar la frecuencia de sus alelos considerando únicamente a los individuos positivos para el mismo. En este sentido, la disminución de los alelos deletados implica que los alelos de KIR 2DS4 no deletados (que sí se expresan en membrana y poseen acción citotóxica), presentan un incremento relativo similar al hallado al de los otros genes estimuladores. En efecto, las frecuencias de los alelos no deletados en la población **KIR 2DS4 positiva** muestran un incremento (CS vs. HCV: $p=0.003$, $OR=1.79$; CS vs. HCV RNA+: $p=0.005$, $OR=1.76$; CS vs. HCV cirróticos: $p=0.002$, $OR=2.69$). Estos resultados contribuyen a explicar el papel de los genes activadores de la citotoxicidad como responsables de facilitar la evolución hacia la cirrosis.

Frecuencias alélicas del gen KIR 2DS4 en HCV en relación con los diferentes haplotipos

Como se explicó en la introducción, los genes KIR se encuentran agrupados en haplotipos, el haplotipo A cuenta sólo con el gen KIR 2DS4 como activador de citotoxicidad, en tanto que los numerosos haplotipos B existentes presentan otros genes estimuladores en diferente número y combinación. Nosotros evaluamos la frecuencia de los alelos de KIR 2DS4 en individuos homocigotas para el haplotipo A (genotipo AA) en comparación con el resto de los individuos. Este análisis mostró que la disminución en la frecuencia de alelos deletados se daba en los individuos que no tienen el genotipo AA (HCV vs. CS: $p=0.004$, $OR=0.53$; HCV cirróticos vs. CS: $p=0.002$, $OR=0.36$), en tanto

que en los individuos AA las frecuencias de todos los alelos de este gen son similares en pacientes y controles (Datos no mostrados).

Fenotipo de receptores KIR en células NK de pacientes con HCV

A partir de los hallazgos genotípicos descritos en la sección anterior, en particular el incremento en la frecuencia de algunos genes activadores, el paso siguiente fue intentar asignar a estos incrementos una implicancia funcional. Determinar la expresión de los genes KIR es relevante por las características particulares de expresión de estos genes. Como se explicó en la introducción, las células NK no expresan todos los genes KIR que poseen en su genoma. Se concluye que diferentes células NK de un mismo individuo podrán expresar diferentes genes KIR. Por este motivo se intentó demostrar si las diferencias genéticas se traducen en la expresión diferencial de estos receptores en la membrana plasmática.

Se analizó por citometría de flujo la expresión de los receptores KIR en las células NK CD56 positivas de controles sanos y de pacientes con HCV (la tabla 18 muestra los pacientes HCV incluidos en este análisis). Se utilizaron anticuerpos monoclonales no comerciales que reconocen epitopes de las moléculas 3DL1/3DL2, 2DL2/2DS2/2DL3, 2DL1/2DS1 y 2DL1/2DS1/2DS3, y anticuerpos comerciales que reconocen 3DL1, 2DL4, 2DS4, 2DL3. Además, se analizó la expresión de CD94 y NKG2A. Como se explicó en la introducción, estas últimas moléculas pertenecen a una familia diferente a los receptores KIR y forman un dímero inhibidor de citotoxicidad en la superficie de las células NK. Además de una expresión diferencial de los diversos genes KIR presentes en

el genotipo de un individuo, debemos recordar que la expresión de KIR o de los dímeros CD94-NKG2 en cada clon de células NK es mutuamente excluyente.

Pacientes	Sexo	Anticuerpos anti-HCV	RNA HCV	Transaminasas Hepáticas (ALAT)	Cirrosis	Tratamiento
HCV-1	M	pos	pos	elevada	no	NR
HCV-2	M	pos	pos	normal	no	NR
HCV-3	F	pos	pos	elevada	si	NR
HCV-4	F	pos	pos	elevada	no	sin/trat
HCV-5	F	pos	pos	normal	no	sin/trat
HCV-6	M	pos	pos	elevada	no	sin/trat
HCV-7	F	pos	pos	elevada	si	sin/trat
HCV-8	M	pos	pos	elevada	no	sin/trat
HCV-9	F	pos	pos	elevada	no	sin/trat
HCV-10	M	pos	pos	elevada	no	sin/trat
HCV-11	M	pos	pos	elevada	no	sin/trat
HCV-12	M	pos	pos	normal	no	sin/trat
HCV-13	F	pos	pos	normal	si	sin/trat
HCV-14	F	pos	pos	elevada	no	sin/trat
HCV-15	M	pos	pos	elevada	no	sin/trat

Tabla 18: Características clínicas de los individuos infectados con el virus de la Hepatitis C (HCV) que fueron incluidos en los experimentos de citometría de flujo. Los anticuerpos anti-HCV fueron medidos por ELISA de tercera generación. El RNA HCV fue detectado por PCR cualitativa. Los niveles séricos de transaminasas hepáticas (ALAT) se consideran elevados en forma persistente cuando superan entre 1.2 y 7 veces los valores normales. NR: pacientes que no respondieron a tratamientos previos con IFN- α solo o combinado con Rivabirina; sin/trat: individuos que aún no han sido tratados.

La figura 7 muestra la frecuencia relativa de células reconocidas por cada uno de los anticuerpos mencionados dentro de la población CD56 positiva. Como ya fue descrito, de acuerdo a la intensidad en la expresión de membrana de la molécula CD56, las células NK se subdividen en células NK CD56^{dim} y CD56^{bright}, que representan dos subpoblaciones de células NK que poseen diferencias funcionales.

En los pacientes HCV, se halló un incremento en el porcentaje de células **KIR 2DS4** en la subpoblación **NK^{dim}** (p=0.025). Este resultado guardaría relación con el incremento de los alelos no deletados (los que se expresan en la membrana plasmática) descritos en la sección anterior. También se observó un aumento en la frecuencia de células NK^{dim} que expresan **KIR 2DL1/2DS1** y **KIR 3DL1** (Fig 7B).

Cuando el análisis se focalizo en la subpoblación **NK^{bright}**, resultó interesante observar en los pacientes HCV el incremento en la frecuencia del receptor **KIR 2DL4**, restringido a esta subpoblación (p=0.015; Figura 7C).

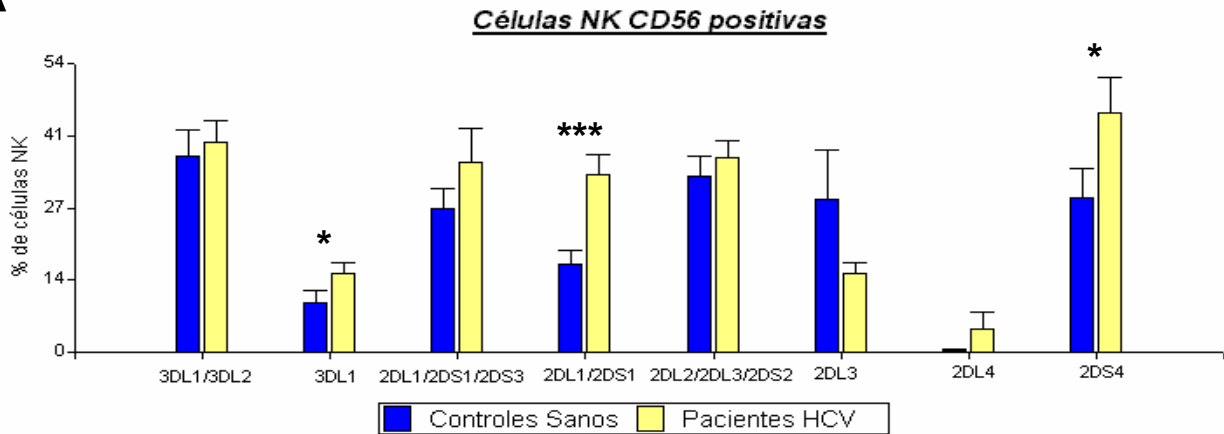
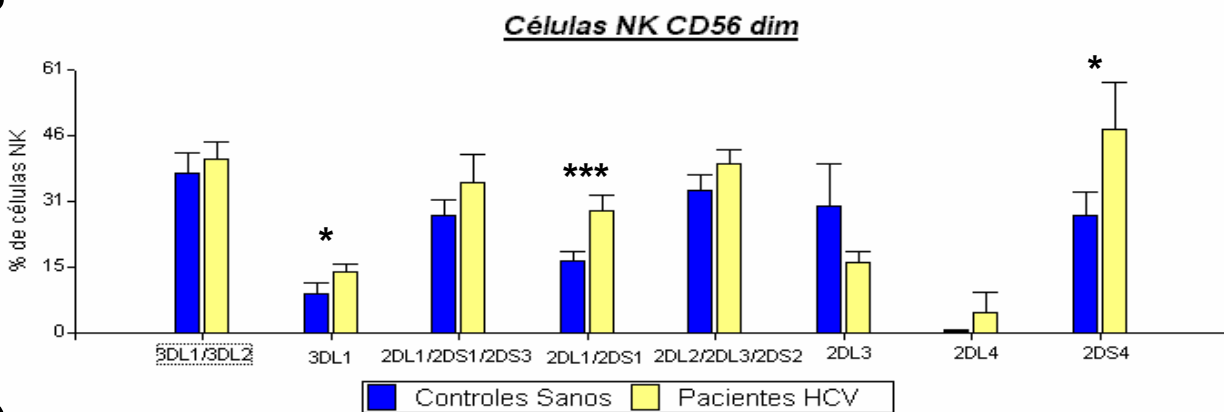
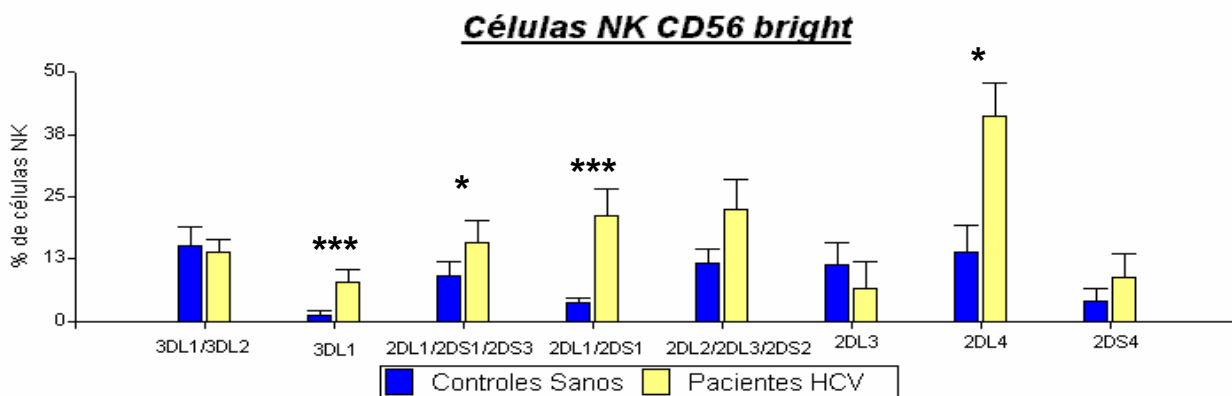
A**B****C**

Figura 7: Porcentaje de células positivas para el anticuerpo específico dentro de la población total de células NK CD56+ (A), dentro de las células NK CD56^{dim} (B) y dentro de las células NK CD56^{bright} (C). Las células NK son detectadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD56; las células NK CD56^{dim} son aquellas con baja intensidad de fluorescencia (IMF) para dicho marcador, mientras que las CD56^{bright} son aquellas muestran una alta IMF. * p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001 de pacientes HCV en comparación con los controles sanos, test U de Mann Whitney.

Fenotipo del las células NK KIR 3DL1 positivas en pacientes con HCV

Como se describió en el párrafo anterior, la frecuencia de **KIR 3DL1** se halló incrementada en los pacientes HCV ($p=0.039$). Este aumento se observa no sólo en las células $CD56^{dim}$ ($p=0.039$), sino también en la población de células $CD56^{bright}$ ($p=0.0007$). En la figura 8 se muestran los dot plot representativos que corresponden a un control (B) y un paciente (C). Adicionalmente, analizamos la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células NK para este marcador y encontramos que no hay diferencia en las células NK^{dim} pero si en las **NK^{bright}** ($p=0.0004$, figura 8E). Aunque este resultado podría ser un artefacto asociado con el incremento en el número de células NK^{bright} positivas.

Otro resultado interesante surge de la comparación por tablas de contingencia del número de individuos que presentan células **NK^{bright}** positivas para **KIR 3DL1**. Este análisis arroja un resultado de 31% en controles sanos (4/13) y 100% en pacientes HCV (12/12), lo que implica una diferencia altamente significativa ($p=0.0003$, test Chi cuadrado). En este análisis sólo fueron considerados aquellos individuos cuya tipificación genómica mostró la presencia del gen KIR 3DL1 y que expresan el mismo en la membrana plasmática (fueron excluidos los individuos 3DL1 negativos y a los 3DL1 positivos que no fueron reconocidos por el anticuerpo anti-3DL1, y que podrían ser portadores del alelo 004, ver más adelante).

El anticuerpo DX9 utilizado en este estudio que reconoce KIR 3DL1 identifica dos grupos de alelos de este gen. La figura 8D, muestra dos nubes claramente distinguibles (no detecta el alelo 004 pues este no se expresa en la membrana; Yawata M. y col., 2006). En cuanto al porcentaje de células

positivas para cada pico, pudimos observar una tendencia hacia un incremento en los pacientes que no alcanza la significación estadística (pico1: 5.4% en CS vs. 13% en HCV; pico 2: 9.7% en CS vs. 13.6% en HCV). La diferencia entre controles y pacientes sólo resulta significativa cuando tomamos a los dos picos juntos.

Como se recordará, los estudios genéticos, mostraron en los pacientes HCV una frecuencia disminuida del receptor KIR 3DL1. Esto contrasta con los resultados de expresión que muestran un incremento del porcentaje de clones NK que expresan KIR 3DL1. Esta aparente contradicción podría deberse a modificaciones postranscripcionales inducidas por la injuria provocada por la infección.

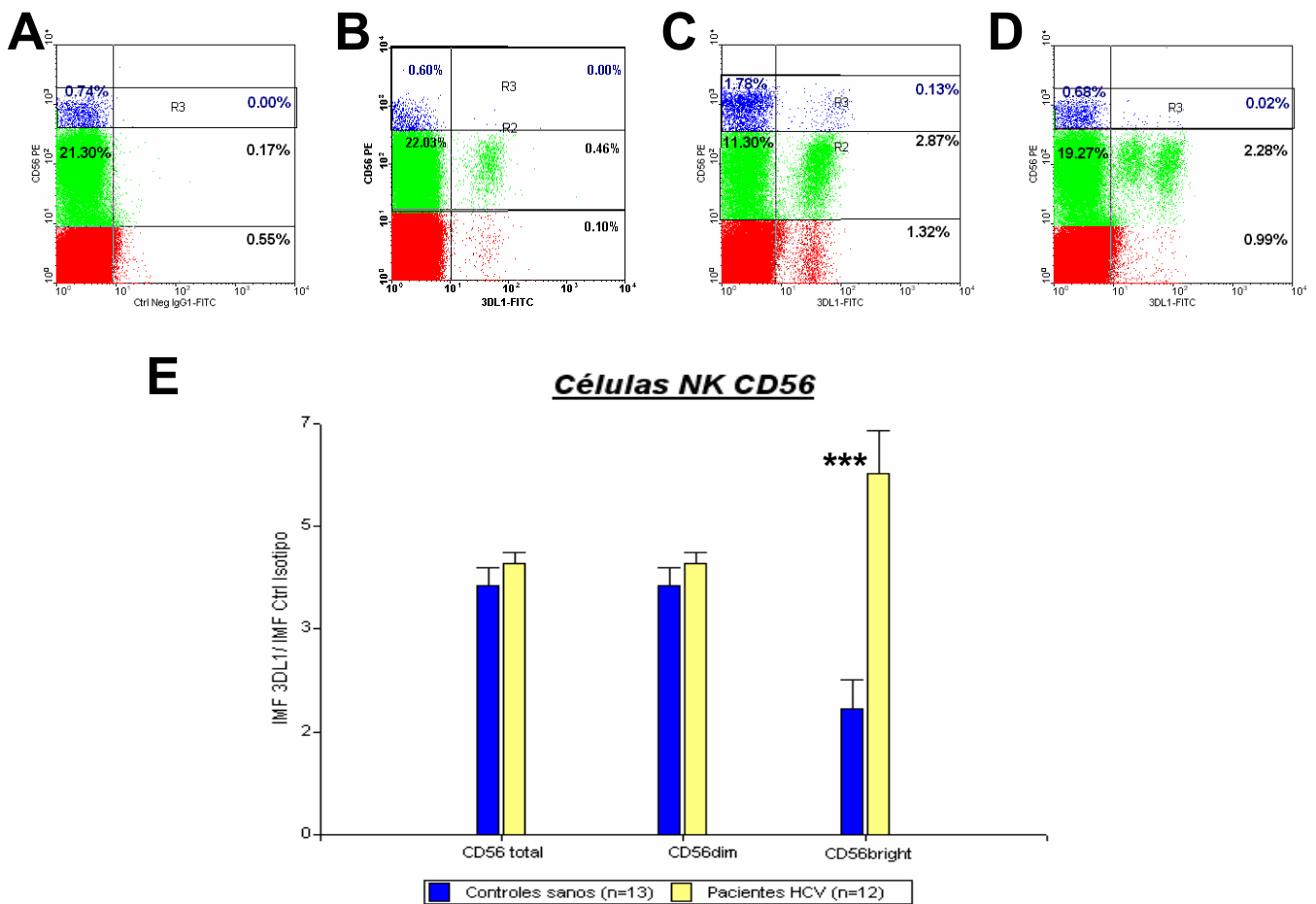


Figura 8: Dot plot representativos de la inmunomarcación con anti-CD56 y anti-KIR 3DL1 de A) un control de isotipo, B) un individuo sano, C) un paciente que expresa un solo alelo de KIR 3DL1 y D) un control que expresa dos alelos de este receptor. E) Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las células positivas para el anticuerpo anti-KIR 3DL1 dentro de la población de células NK CD56⁺, CD56^{dim} y CD56^{bright}. A-D) Eje Y: inmunomarcación con anti-CD56-PE, eje X: anti-3DL1-FITC. Región verde: células NK^{dim}; región azul, NK^{bright}. E) El valor graficado corresponde a la tasa entre la IMF obtenida para el anticuerpo anti-3DL1 y la IMF obtenida para el control de isotipo. *** p<0.001; test U de Mann Whitney.

Perfil de marcación de los KIR 3DL1 y 3DL2 en pacientes con HCV

El perfil de marcación del anticuerpo que reconoce conjuntamente a los receptores **KIR 3DL1 y 3DL2** muestra la presencia de 3 nubes o picos diferentes que aparecen aleatoriamente en las diferentes muestras en las células **NK CD56^{dim}** (figura 9). La nube de menor intensidad se encuentra muy cercana al pico de células negativas, pero forma un plato o claramente visible. Adicionalmente, se diferencian dos picos con intensidades diferentes (media y alta, pico 1 y 2 respectivamente).

La presencia o ausencia de una de las nubes puede corresponder a la ausencia o presencia de los genes 3DL1 y/o 3DL2 o alelos de estos presentes en cada individuo y no tendría ninguna relación con la patogénesis de la HCV.

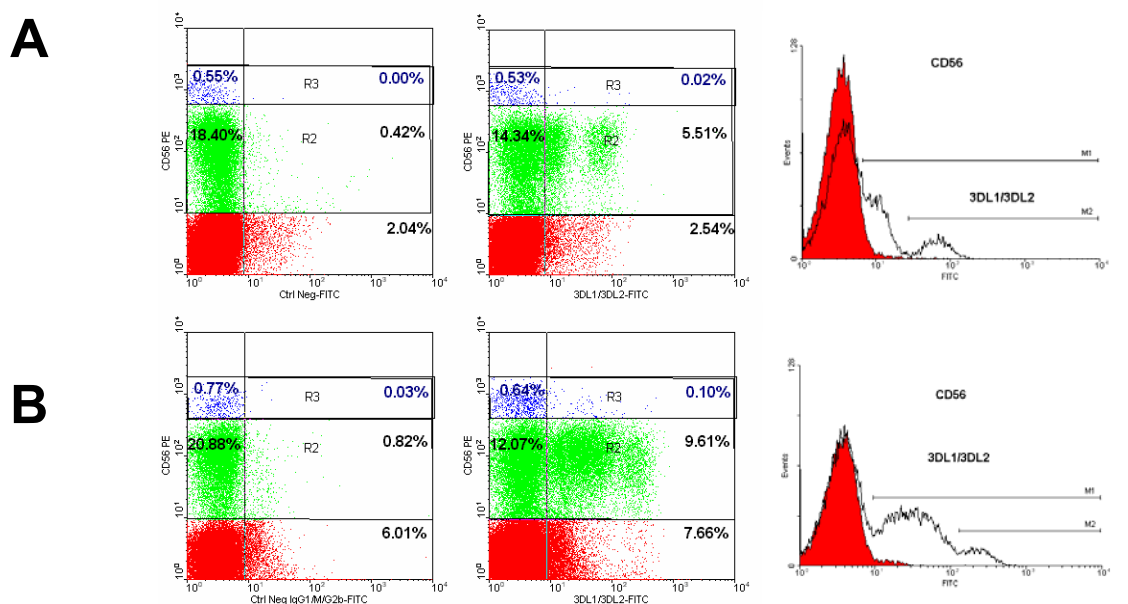


Figura 9: Dot plot e histogramas representativos de un control (A) y un paciente HCV (B) donde se ejemplifican los picos considerados en el análisis. El individuo A presenta el plato o el pico 1, mientras que el individuo B muestra los picos 1 y 2. El eje Y de los dot plot muestra la inmunomarcación con anti-CD56-PE y el eje X la marcación con anti-3DL1/3DL2-FITC. La región representada en verde corresponde a las células NK^{dim}, y la azul a las NK^{bright}. Los histogramas fueron realizados considerando la población CD56+ y muestran en rojo el control de isotipo y en línea negra el anti-3DL1/3DL2.

Análisis de los perfiles de inmunomarcación de los receptores KIR 2DL1/2DS1/2DS3 y 2DL2/2DL3/2DS2 en pacientes con HCV

Cuando se analizó el porcentaje de células NK^{dim} positivas para los anticuerpos que reconocen a los receptores **KIR 2DL1/2DS1/2DS3, 2DL1/2DS1 y 2DL2/2DL3/2DS2** se observó un incremento muy significativo de la expresión 2DL1/2DS1 ($p=0.0009$, figura 7) en los pacientes. Este mismo incremento se detectó en las células **NK^{bright}** de los pacientes cuando se utilizó anti-2DL1/2DS1/2DS3 ($p=0.033$) y, anti-2DL1/2DS1 ($p=0.0008$, figura 7). Un ejemplo representativo para el anticuerpo anti-2DL1/2DS1/2DS3 se muestra en la figura 10 (A: control sano; B: pacientes HCV). En este punto es importante destacar que la expresión de KIR en las células NK de individuos sanos, se encuentra restringida a las células NK^{dim}, habiéndose sugerido que dicha expresión acompaña a la maduración de la célula “CD56^{bright} precursora” hacia una célula CD56^{dim} efectora (Romagnani C. y col., 2007).

Este incremento en el porcentaje de células **NK^{bright}** KIR positivas se observa por un corrimiento de la nube de células NK^{bright} desde cuadrante de células negativas (donde aparece en los controles) hacia valores de IMF considerados positivos (ejemplificado en la figura 10A, B, E y F). Posteriormente se comparó por tablas de contingencia la frecuencia de aparición de dicha nube en pacientes y controles. En la inmunomarcación con el anti-2DL1/2DS1 esta nube aparece en el 71 % de los pacientes (10/14) pero sólo en el 6% de los controles (1/18), diferencia que resultó altamente significativa ($p<0.0001$, test de Chi cuadrado). Para los anticuerpos anti-2DL1/2DS1/2DS3 y anti-2DL2/2DL3/2DS2 las frecuencias no resultaron

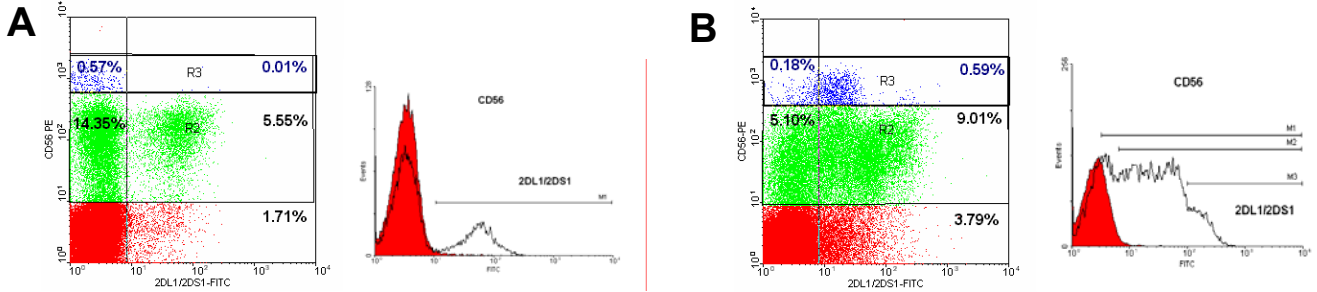
significativamente diferentes entre pacientes y controles (2DL1/2DS1/2DS3: 57% en HCV vs. 33% en CS; 2DL2/2DL3/2DS2: 47% en HCV vs. 42% en CS).

En el análisis de las células **NK^{dim}** encontramos que en la población control, el total de los 19 individuos analizados presenta un solo pico de células positivas para los tres anticuerpos mencionados. Contrariamente, en los pacientes con HCV aparece más de un pico en el 23% (4/17) de los individuos para el anticuerpo que reconoce a 2DL2/2DL3/2DS2 (CS vs. HCV: $p=0.045$), en el 36% (5/14) de los pacientes para el anti-2DL1/2DS1/2DS3 (CS vs. HCV: $p=0.01$), y en el 46% (6/13) de los pacientes para el anti-2DL1/2DS1 (CS vs. HCV: $p=0.002$). Estos datos fueron analizados por tablas de contingencia de 2x2 mediante el test de Fisher. En la figura 10 se muestra un individuo control y un paciente HCV representativos para cada uno de los anticuerpos mencionados.

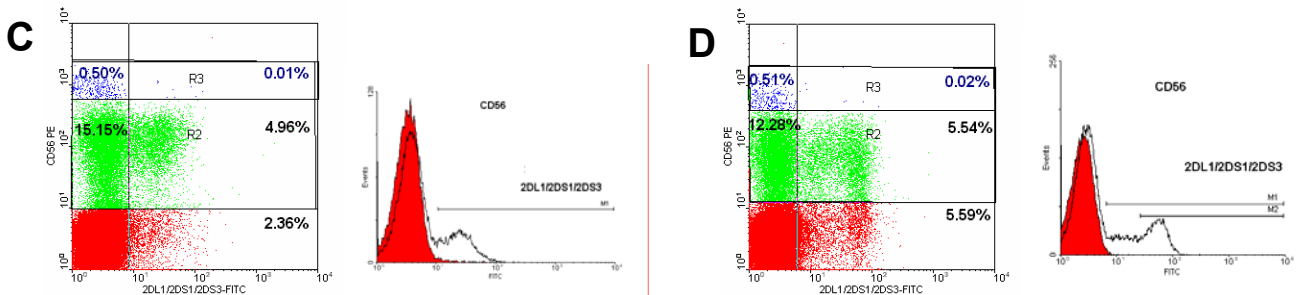
Controles sanos

Pacientes HCV

2DL1/2DS1



2DL1/2DS1/2DS3



2DL2/2DL3/2DS2

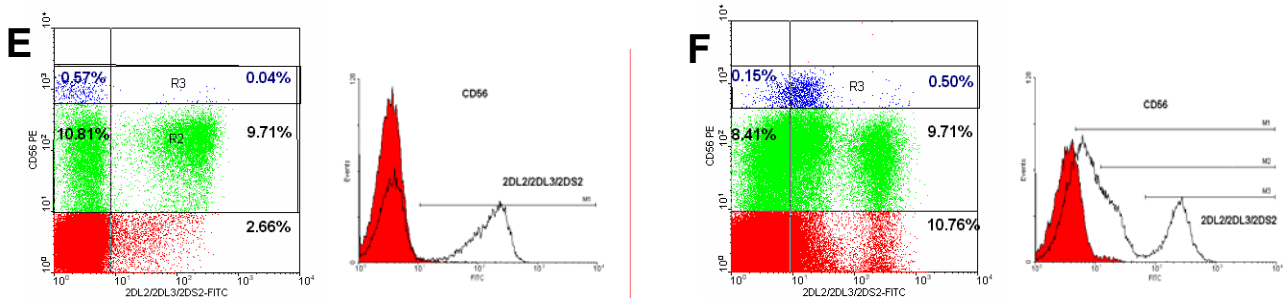


Figura 10: Dot plot e histogramas obtenidos por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-2DL1/2DS1 (A-B), anti-2DL1/2DS1/2DS3 (C-D) y anti-2DL2/2DL3/2DS2 (E-F) de PBMC de controles sanos (A, C y E) y de pacientes con HCV (B, D y F) representativos donde se ejemplifican los picos considerados en el análisis. El eje Y de los dot plot muestra la marcación con anti-CD56-PE y el eje X la marcación con anti-KIR-FITC. La región representada en verde corresponde a las células NK^{dim} , mientras que la azul corresponde a las NK^{bright} . Los histogramas fueron realizados considerando la población CD56+ y muestran en rojo el control de isotipo y en línea negra el anti-KIR.

Fenotipo de los receptores KIR 2DL1/2DS1/2DS3 y 2DL2/2DL3/2DS2 teniendo en cuenta la presencia de sus ligandos HLA clase I

Los ligandos de los receptores **KIR 2DL1** y **2DS1** son los alelos del locus HLA-C que se agrupan dentro del denominado grupo 2 (ver introducción). En cambio, los receptores **KIR 2DL2**, **2DL3** y **2DS2** median su función a través de los alelos HLA-C del grupo 1. Como se describe anteriormente (Figura 7C), uno de los hallazgos más llamativos observado en los pacientes con HCV, es el incremento en el porcentaje de células **NK^{bright}** para los anticuerpos anti-KIR 2DL1/2DS1/2DS3, 2DL1/2DS1 y 2DL2/2DL3/2DS2. Como se explicó anteriormente, este incremento se observa por un corrimiento de la nube de células **NK^{bright}** desde cuadrante de células negativas hacia valores de IMF considerados positivos (ejemplificado en la figura 10A, B, E y F). A raíz de que este patrón aparecía aleatoriamente en uno u otro anticuerpo en cada uno de los pacientes, analizamos si su aparición se relacionaba con la presencia del ligando específico para los receptores en cuestión. Para ello se comparó por tablas de contingencia la frecuencia de aparición de dicha nube en pacientes y controles separando a los individuos en aquellos que expresan o no expresan el ligando correspondiente (presencia de HLA-C1 para el anti-KIR 2DL2/2DL3/2DS2 y presencia de HLA-C2 para anti-KIR 2DL1/2DS1/2DS3 y anti-KIR 2DL1/2DS1). Este análisis reveló que no hay diferencias significativas en las frecuencias de aparición de las nubes de células **NK^{bright}** en relación con la presencia del ligando.

Posteriormente se evaluó la IMF de las células **NK^{dim}** obtenida para cada uno de dichos anticuerpos en función de la presencia o ausencia de los ligandos específicos. Como se observa en la figura 11, para el anticuerpo que

reconoce a **2DL1** y **2DS1** se observó una disminución en este parámetro en los pacientes HCV en los individuos que carecen del **ligando HLA-C2**. A pesar de contener sólo 3 individuos, esta IMF resultó significativamente menor que la de los pacientes portadores del HLA-C2 ($p=0.04$) y que la de los controles que también carecen de esta molécula ($p=0.009$). Este resultado podría estar indicando que los individuos que carecen del ligando específico para los receptores 2DL1/2DS1 no puedan evitar la disminución en su expresión, a diferencia de los individuos que si llevan el HLA-C2. Probablemente, la presencia del ligando HLA-C2 posibilite de alguna forma que el receptor KIR siga siendo expresado.

Cuando se realizó el mismo análisis para los receptores **2DL2/2DL3/2DS2**, se observó en primer lugar que no hay diferencias entre las medias de ninguno de los pares “portadores/no portadores” del ligando **HLA-C1**. Sin embargo, se observa una tendencia hacia una menor expresión de los receptores cuando los individuos llevan el ligando. Adicionalmente, se observa que la IMF de los pacientes siempre es inferior a la de los controles, aunque esto sólo resulta significativo para el anti-2DL2/2DL3/2DS2 en los individuos portadores del HLA-C1 ($p=0.0077$, $n=16$ en CS y $n=11$ en HCV). Nuevamente, esto puede ser un artefacto del pequeño número de muestras en los grupos restantes (2DL2/2DL3/2DS2 no portadores: $n=3$ en CS y $n=3$ en HCV; 2DL3 no portadores: $n=1$ en CS y $n=2$ en HCV; 2DL3 portadores: $n=6$ en CS y $n=5$ en HCV).

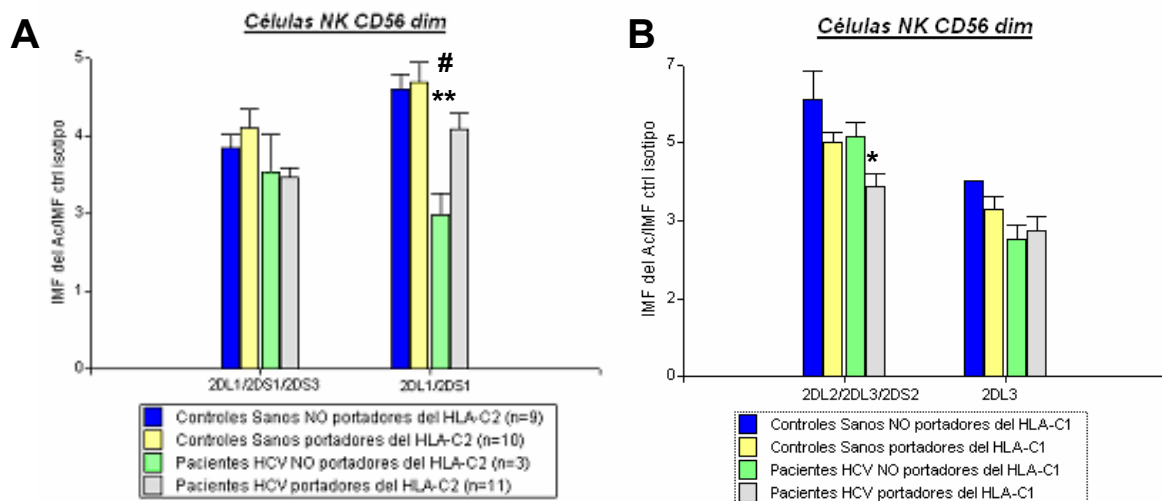


Figura 11: Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las células positivas para los anticuerpos anti-KIR 2DL1/2DS1/2DS3 y 2DL1/2DS1 en función de la presencia del HLC-C2 (A) y 2DL2/2DL3/2DS2 y 2DL3 en función de la presencia del HLA-C1 (B) dentro de la población de células NK CD56^{dim} (baja IMF para el anti-CD56). El valor graficado corresponde a la tasa entre la IMF obtenida para el anticuerpo anti-KIR y la IMF del control de isotipo correspondiente. * p<0.05, ** p<0.01 de pacientes HCV vs. los CS pertenecientes al mismo grupo de HLA-C; # p<0.05 comparando pacientes HCV portadores y no portadores de HLA-C2; test U de Mann Whitney.

Función del receptor KIR 2DS3 en la inmunomarcación con el anticuerpo anti-2DL1/2DS1/2DS3 en pacientes con HCV

Como se recordará, la frecuencia del gen del receptor **KIR 2DS3** resulto incrementada en los pacientes con HCV. Se intentó correlacionar este hallazgo con la determinación de su expresión, utilizando el anticuerpo 2DL1/2DS1/2DS3. El gen KIR 2DS3 mostró una frecuencia levemente incrementada en los pacientes (CS: 0.37; HCV: 0.42).

Como se describió previamente, cuando se utilizó el anticuerpo **2DL1/2DS1/2DS3**, los pacientes con HCV muestran un incremento en el porcentaje de células NK positivas en la subpoblación de células **NK^{dim}**. En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos separando a los individuos que tienen en su genoma al gen KIR 2DS3 de aquellos que no lo tienen. Como se observa, no hay diferencias entre ambos grupos de individuos, ni en pacientes ni en controles.

Además, del receptor KIR 2DS3, este anticuerpo reconoce a los receptores KIR 2DL1 y 2DS1. En este contexto resulta importante destacar que tampoco se observan diferencias en las IMF para este anticuerpo en función de la presencia o ausencia del gen 2DS1. Nada se sabe acerca de la expresión de los genes KIR 2DS3, sin embargo, los resultados obtenidos podrían sugerir que este gen no se expresa en la mayoría de los individuos que los portan, o si lo hace, sea en un pequeño número de células y con una intensidad similar a la del 2DL1, gen que se encuentra en el 95% de los individuos en ambas poblaciones.

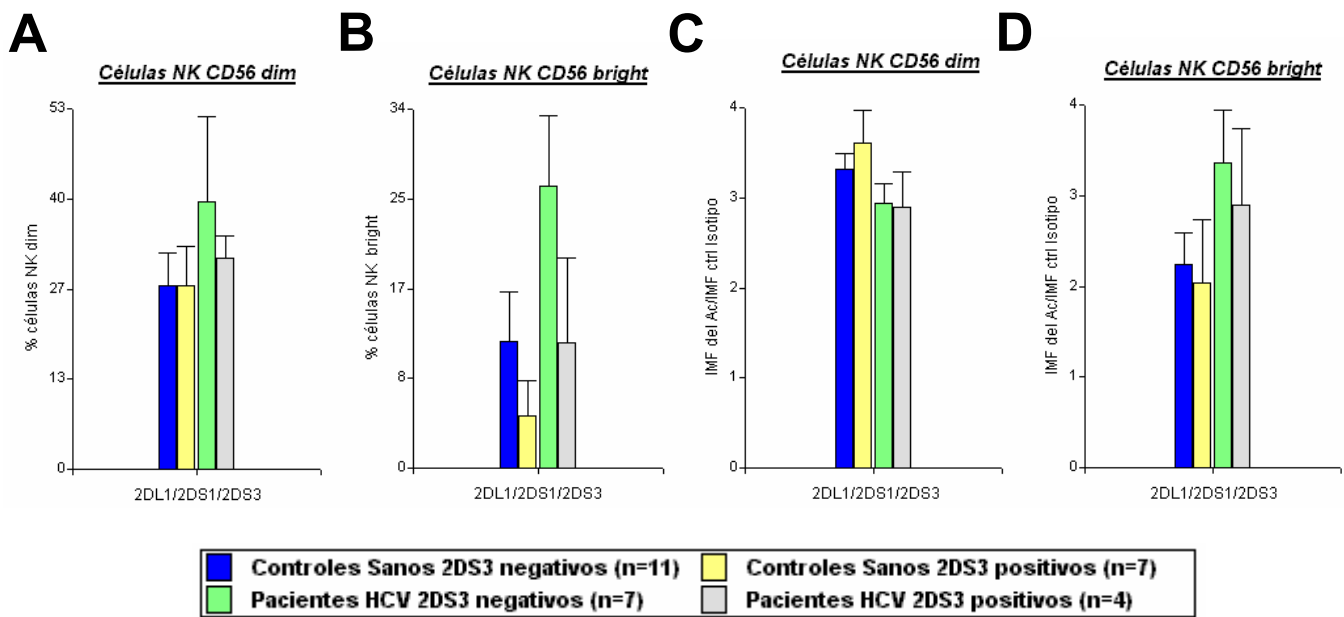


Figura 12: Porcentaje de células positivas (A-B) e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las mismas (C-D) para el anticuerpo anti-KIR 2DL1/2DS1/2DS3 en función de la presencia del gen KIR 2DS3 dentro de la población de células NK CD56^{dim} (A,C) y NK^{bright} (B,D). Las células NK son detectadas con un anticuerpo anti-CD56; las células NK CD56^{dim} son aquellas con baja IMF y las NK^{bright} con alta IMF para dicho marcador. El valor graficado en C y D corresponde a la tasa entre la IMF obtenida para el anticuerpo anti-KIR y la IMF obtenida para el control de isotipo correspondiente.

Análisis de la inmunomarcación con el anticuerpo anti-2DL1/2DS1 en función de la presencia del gen KIR 2DS1

La figura 13 muestra los resultados obtenidos con el anticuerpo que reconoce a los receptores **KIR 2DL1** y **2DS1** teniendo en cuenta la presencia o ausencia del gen 2DS1. El análisis inverso no se realizó debido a que el 95% de los individuos presenta el gen 2DL1 en su genoma.

En el grupo de **controles sanos**, se encontró un incremento en el porcentaje de células **NK^{dim}** positivas en aquellos individuos que llevan el gen KIR 2DS1 en su genoma (en comparación con los controles que no lo poseen;

p=0.0057). En las células **NK^{bright}** se observa la misma tendencia aunque con valores menores (sin alcanzar la significación estadística).

En los **pacientes con HCV** (en comparación con los CS), el incremento en el porcentaje de células se observó en los individuos 2DS1 negativos (NK^{dim} p=0.0007, NK^{bright} p=0.0012). Aunque también puede observarse en los individuos 2DS1 positivos (NK^{dim} p=0.019, NK^{bright} ns). Este resultado sugiere que en los pacientes con HCV se induce una expresión preferencial del receptor KIR 2DL1 en relación al KIR 2DS1, en clones de células NK que antes eran negativos.

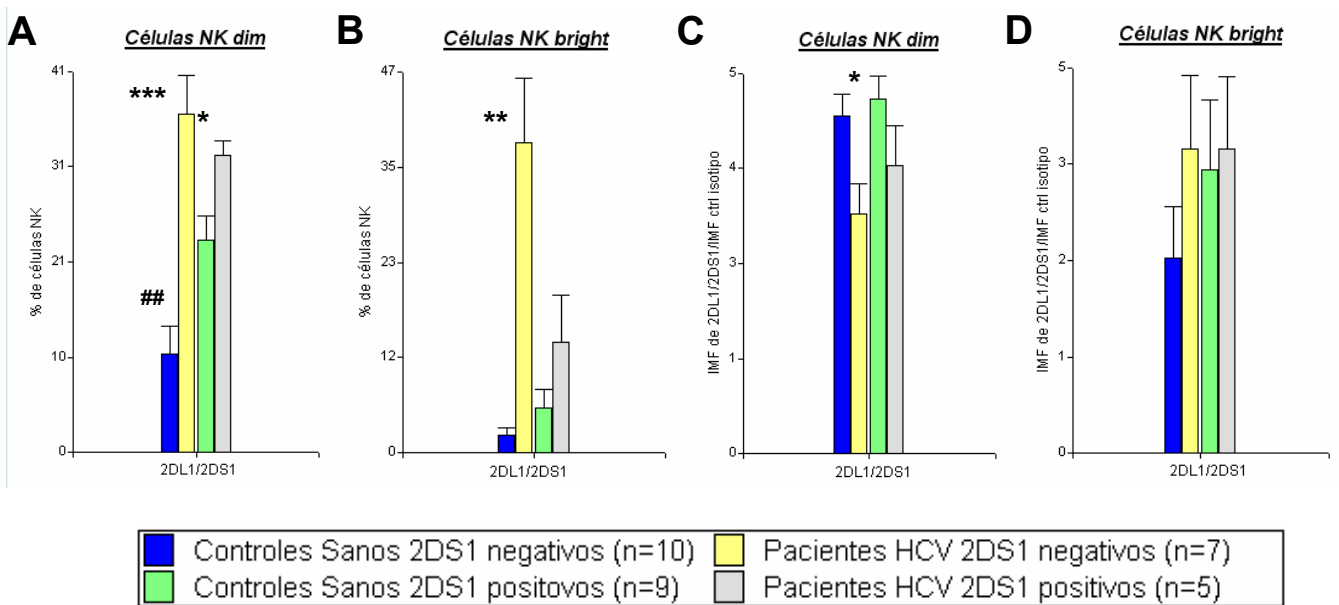


Figura 13: Porcentaje de células positivas (A-B) e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las mismas (C-D) para el anticuerpo anti-KIR 2DL1/2DS1 en función de la presencia del gen KIR 2DS1 dentro de la población de células NK CD56^{dim} (A,C) y de NK^{bright} (B,D). El valor graficado en C y D corresponde a la tasa entre la IMF obtenida para el anticuerpo anti-KIR y la IMF del control de isotipo correspondiente. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001 de pacientes HCV en comparación con los CS pertenecientes al mismo grupo; # p<0.05 comparando controles sanos portadores y no portadores de KIR 2DS1; test U de Mann Whitney.

Análisis por citometría de flujo del receptor dimérico CD94-NKG2A en pacientes con HCV

Las moléculas **CD94** y **NKG2A** forman un dímero en la superficie celular, que constituye un receptor inhibidor de citotoxicidad perteneciente a una familia diferente a los receptores KIR. Aparentemente, cada clon de células NK expresa sólo uno de estos sistemas (familias) de receptores, los KIR o los dímeros CD94-NKG2.

En la población normal, la molécula CD94 se encuentra presente en casi todas las células NK, tanto NK^{dim} como NK^{bright}. Por el contrario, NKG2A se encuentra presente aproximadamente en el 50% de las NK^{dim}, y en todas las células NK^{bright} (figuras 14 y 15). La presencia del dímero funcional depende de la presencia de NKG2A. En el caso de las células NK^{bright}, esta observación es coherente si consideramos que este subtipo celular no expresa receptores KIR en la población control.

Como se observa en la figura 14, el porcentaje de células **NK^{dim}** positivas para **CD94** se encuentran disminuidos en los pacientes con HCV (porcentaje: p=0.0067, IMF: p=0.0045). En los gráficos de dot plot para esta inmunomarcación (figura 15A y C) se diferencian claramente 2 nubes o picos, uno de menor IMF (pico 1) y otro de IMF elevada (pico 2). La disminución en la IMF se observa en ambos picos (pico 1: p=0.0011, pico 2: p=0.0019).

Cuando se analizó la expresión en la membrana plasmática de **NKG2A**, se observó que todos los individuos control expresan una única población de células **NK^{dim}** positivas (pico 2), mientras que en 11 de los 15 pacientes estudiados se observan células con menor intensidad de fluorescencia (pico 1, figura 15B y D). Por lo tanto, cuando se compara el

porcentaje celular y la IMF para el pico 1, ambos resultan significativamente aumentados en los pacientes en comparación con los controles (porcentaje: $p=0.0011$, IMF: $p=0.011$, figura 14). Adicionalmente, los pacientes presentan una disminución de ambos parámetros en el pico 2 (porcentaje: $p=0.0038$, IMF: $p=0.015$). Como resultado de la aparición de células con menor intensidad para este marcador, detectamos una disminución en la IMF las células NK^{dim} tomadas en su conjunto ($p=0.0006$).

Cuando se analizaron estos marcadores en las células NK^{bright} , no se detectaron diferencias entre los pacientes y los controles.

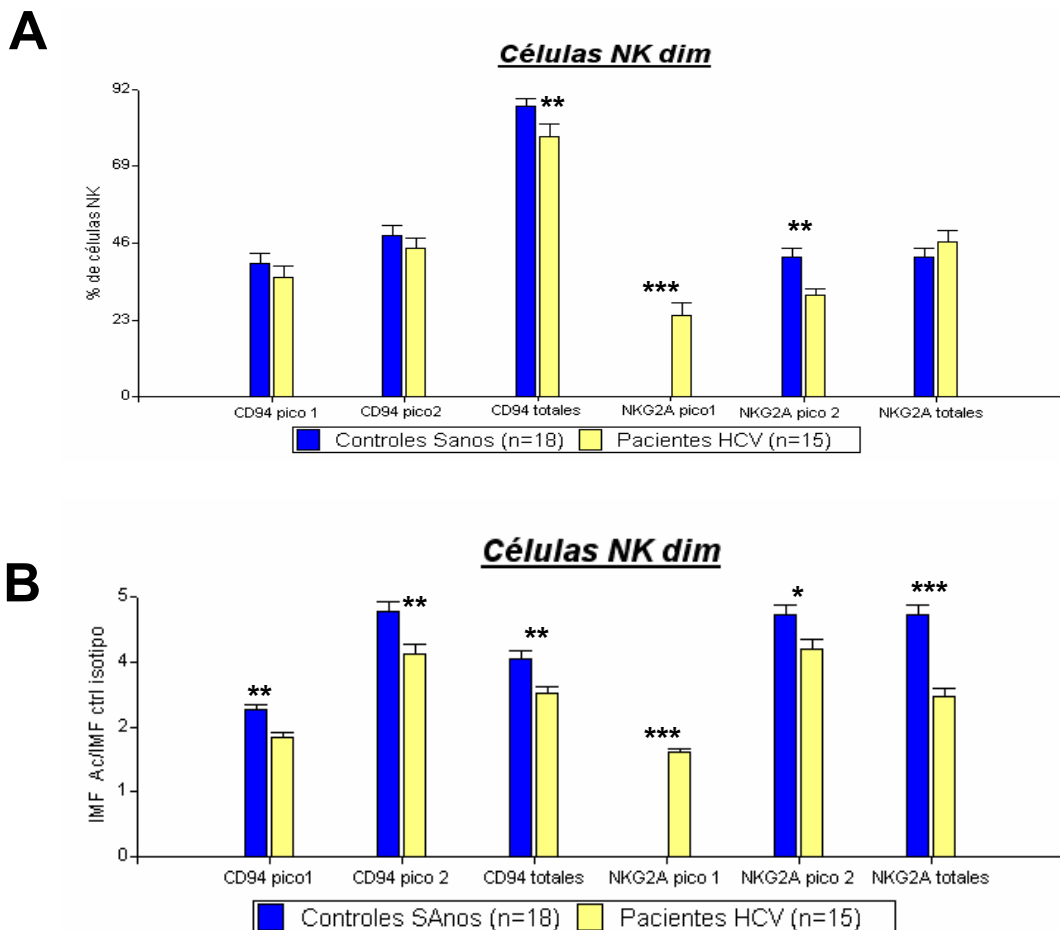
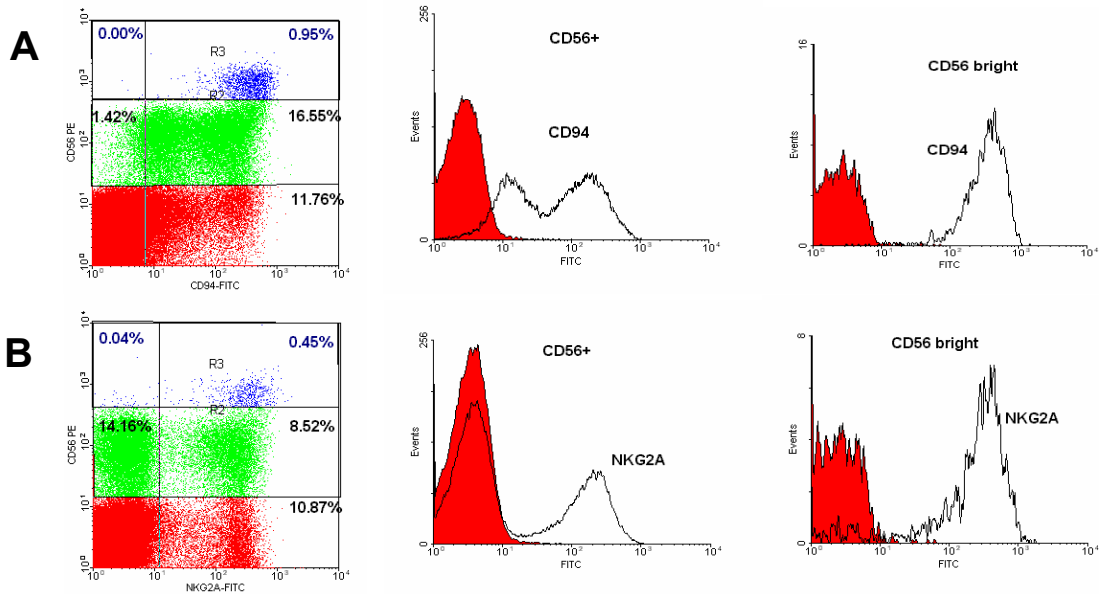


Figura 14: Porcentaje de células positivas (A) e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) (B) para los anticuerpos anti-CD94 y anti-NKG2A en células NK^{dim} (baja IMF para el anti-CD56). El valor graficado corresponde a la tasa entre la IMF del anticuerpo y la IMF del control de isotipo correspondiente. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.0001$ de pacientes HCV en comparación con los CS; test U de Mann Whitney.

Controles Sanos



Pacientes HCV

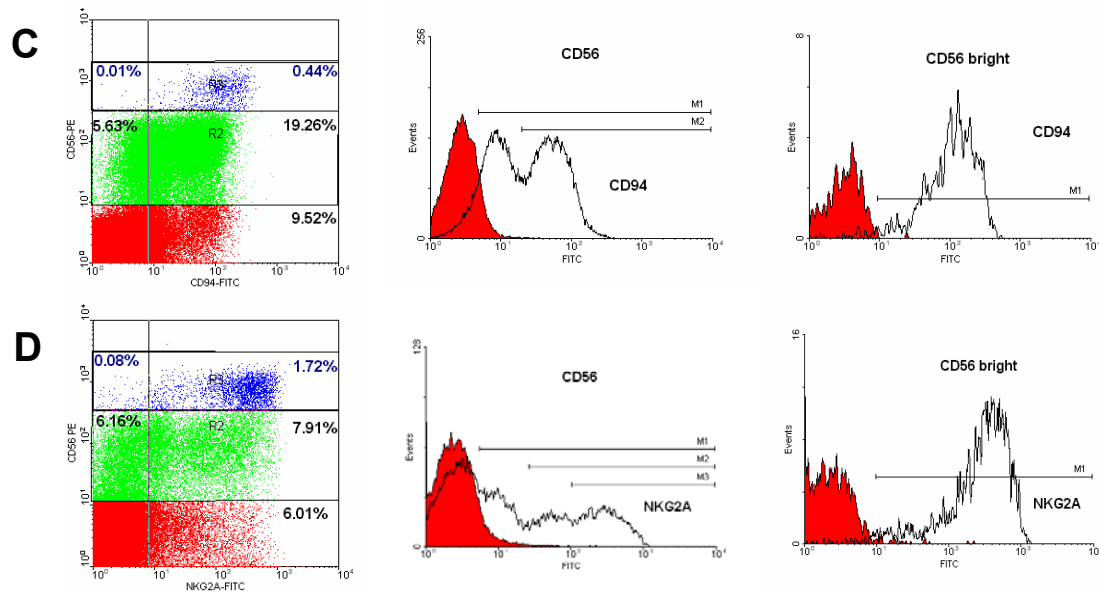


Figura 15: Dot plot e histogramas utilizando anticuerpos anti-CD94 (A,C), y anti-NKG2A (B,D) de controles sanos (A, B) y pacientes con HCV (C, D) representativos donde se ejemplifican los picos considerados en el análisis. Eje Y: marcación con anti-CD56-PE; eje X: marcación con anti-CD94 o NKG2A-FITC. Región verde: células NK^{dim} , región azul: células NK^{bright} . Los histogramas fueron realizados considerando la población CD56+ o la NK^{bright} según se indica y muestran en rojo el control de isotipo y en línea negra el anticuerpo correspondiente.

Hepatitis Autoimmune tipo I

1) Patrón de citocinas en HAI

Expresión de IFN- γ e IL-4 en HAI

La tabla 19 describe las características clínicas, serológicas e histológicas de los pacientes con Hepatitis Autoinmune tipo I pediátricos (HAIp) y adultos (HAAla) de los cuales se obtuvo tejido hepático para los experimentos de RT-PCR-Southern blot y Western blot que se describen a continuación.

La expresión del IFN- γ se halló indetectable en las biopsias controles, pero muy elevada en los pacientes pediátricos (figura 16, HAIp: 29.9 ± 9.8 , CS: 0; $p < 0.0001$). La IL-4 se detectó tanto en los pacientes pediátricos como en los controles, sin embargo, la expresión en los pacientes fue significativamente mayor (HAIp: 41.08 ± 12.3 ; CS: 4.62 ± 1.16 , $P < 0,0001$; figura 16).

El mismo análisis se realizó en un pequeño grupo seleccionado de pacientes adultos. El número menor de pacientes analizados se debió, no solamente a la baja frecuencia de la patología en nuestra población, sino a la presencia de alteraciones en la coagulación sanguínea. Esto limita la indicación de una biopsia hepática, sumado al hecho de que el uso previo de glucocorticoides invalidaría cualquier eventual resultado obtenido.

El análisis de este pequeño grupo mostró también un incremento en la expresión de IFN- γ (HAAla: 8.16 ± 21.7 , CS: 0; $p = 0.0091$; figura 17), aunque de menor intensidad a la detectada en pacientes pediátricos. En cambio, los niveles de expresión de la IL-4 no difieren de los presentes en el tejido control pero son significativamente menores que los hallados en los pacientes pediátricos (HAAla: 2.5 ± 1.7 , HAIp: 41.08 ± 12.3 ; $p = 0,011$; figura 16).

Paciente	EDAD	SEXO	AST/ GOT	ALT/ GPT	FAL	γ -GT	Auto- anticuerpos	IAH	E	HLA-DR
HAIp-1	11a 3m	F	128	149	514	100	SMA/FAN	17	4	1301
HAIp-2	14a	M	1027	990	409	nd	SMA/FAN	15	4	1301
HAIp-3	8a 4m	M	734	875	788	156	SMA	16	4	nd
HAIp-4	9a	F	869	831	298	64	SMA	16	5	nd
HAIp-5	10a 3m	F	380	526	1043	199	SMA	15	5	13
HAIp-6	10a 7m	M	622	523	742	132	SMA/FAN	13	4	1301
HAIp-7	7a 4m	F	618	490	946	125	SMA/FAN	14	4	nd
HAIp-8	10a 8m	M	910	1062	425	94	SMA	9	3	nd
HAIp-9	10a	M	652	401	1437	334	SMA	11	3	nd
HAIp-10	6a 2m	F	413	405	620	253	SMA	12	4	nd
HAIp-11	10a	F	405	335	778	128	SMA/FAN	14	6	1301
HAIp-12	12a 9m	M	1117	984	1067	105	SMA/FAN	15	4	17/11
HAIp-13	9a 7m	F	1217	860	801	89	SMA	13	4	13
HAIp-14	13a 5m	F	464	432	698	398	SMA			1301
HAIp-15	7a 8m	F	1165	446	571	113	SMA/FAN	10	3	nd
HAIp-16	11a	F	150	120	672	300	SMA/FAN	13	3	13
HAIp-17	9a	F	437	425	558	161	SMA/FAN	11	5	15/04
HAIp-18	7a 4m	F	452	510	377	nd	SMA	10	3	1301
HAIp-19	7a 10m	M	192	178	300	55	SMA	17	3	1301
HAIp-20	11a	F	866	600	1073	66	SMA/FAN	11	3	10/03A
HAIp-21	10a 4m	F	99	96	647	130	SMA	13	5	13
HAIp-22	13a 7m	M	79	122	417	39	SMA/FAN	9	5	01/03A
HAIp-23	14a 9m	M	120	256	859	136	SMA	13	3	07/07
HAIp-24	13a 10m	M	389	614	678	80	SMA	10	3	13
HAIp-25	9a	F	647	324	1064	120	SMA/FAN	13	4	13
Media	10a 4m	15:10								52%
HAAla-1	46	F	nd	356	333	nd	SMA/FAN	9	4	nd
HAAla-2	42	F	950	883	279	6.05	SMA/FAN	12	4	nd
HAAla-3	30	F	675	1091	nd	11.9	SMA	nd	nd	nd
HAAla-4	51	F	70	116	740	nd	SMA	9	1	nd

Tabla 19: Parámetros clínicos, serológicos e histológicos de los pacientes con Hepatitis Autoinmune tipo I pediátricos (HAIp) y adultos (HAAla) incluidos en los ensayos de RT-PCR-southern blot de citocinas. AST: aspartato amino transferasa; ALT: alanina amino transferasa; FAL: fosfatasa alcalina; γ -GT: γ -glutamil transferasa; SMA: anti-músculo liso; FAN: anti-núcleo; IAH, índice de actividad histológica (menor a 9, hepatitis leve; entre 9 y 12, moderada; entre 12 y 18, severa); E, estadio (E1 a E6). AST, ALT, FAL y γ -GT se miden en UI/L y su valor normal es 50 UI/L. nd: no determinado.

La expresión aumentada del IFN- γ en adultos y niños sugiere en ambos casos la presencia de un perfil de tipo Th1. Sin embargo, el incremento de la IL-4 en los HAIp, indicaría para estos una respuesta inmune más compleja.

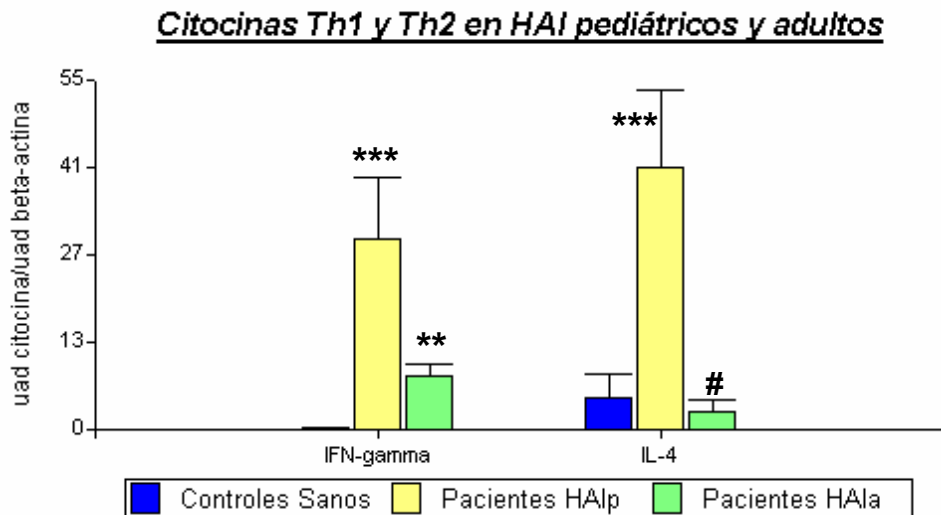


Figura 16: Expresión de IFN- γ e IL-4 en HAIp y HAIA. Media \pm SEM para cada grupo de individuos obtenidos a partir de los valores de unidades arbitrarias de densitometría (uad) normalizados y expresados como la relación entre el mRNA de la citocina y el mRNA de β -actina. Sólo se incluyen los datos comprendidos entre: $M \pm 3$ SEM. HAIp: Hepatitis autoinmune en pacientes pediátricos. HAIA: Hepatitis Autoinmune en pacientes adultos. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ en comparación con los controles sanos; # $p < 0.05$ en comparación con los HAIp (test U de Mann-Witney). Parte de estos resultados fueron incluidos en la tesina de licenciatura. Resultados publicados en *Human Immunol*, 2004.

Otras citocinas involucradas en la respuesta inmune tipo I en HAIP

Expresión de IL-12_{p40}

La subunidad p40 de la IL-12, involucrada en la unión de esta citocina con su receptor fue analizada por estudios de RT-PCR-Southern blot y Western blot. Se confirmó la expresión de IL-12 tanto a nivel del transcripto (HAIP: 7.9 ± 3.9 ; CS: 0, $p=0.0053$) como de la proteína, en ambos casos restringida al tejido patológico, no pudiendo ser detectada en ninguno de los hígados utilizados como control (figura 17A y B). Este experimento incluyó 5 pacientes y 5 extractos provenientes de hígados normales. Se observaron monómeros de IL12_{p40} en los 5 pacientes (calles 2 a 6) pero no en los controles (calles 7 a 11).

En las calles correspondientes a los pacientes se detectó una banda de 80 KDa que pudo ser minimizada en un segundo ensayo, al duplicar la concentración de β -mercaptoetanol en el buffer de siembra. Este tratamiento mejoró la detección de la banda de 40 KDa a través de la reducción de dímeros de IL-12_{p40} unidos por puentes disulfuro.

Expresión de IL-18

Al igual que IL-12_{p40}, la expresión de IL-18 fue evaluada a nivel de mRNA y proteína. El mRNA de esta citocina fue detectado en todos los pacientes analizados y en cuatro de los controles, aunque la expresión en estos últimos fue casi indetectable (HAIP: $147,5 \pm 50.1$, CS: $0,37 \pm 0,16$, $P=0,0062$, figura 17A).

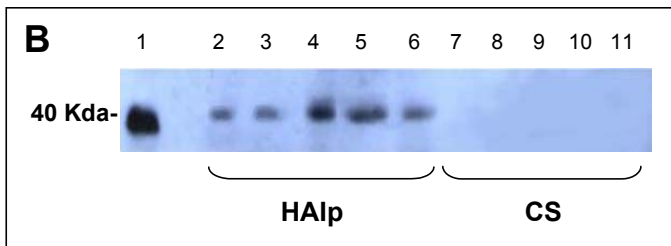
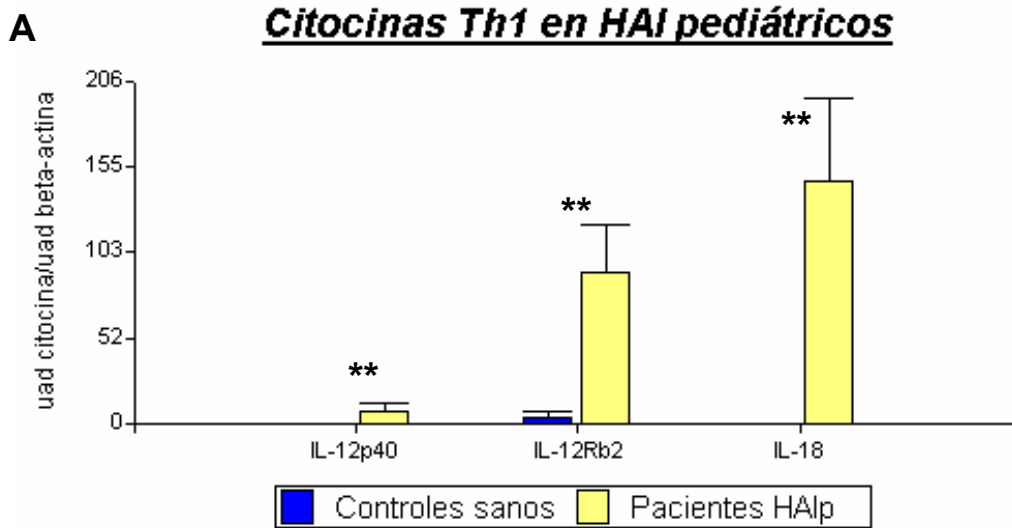


Figura 17: Expresión de IL-12_{p40}, IL12Rβ2 e IL-18 en HAIp. A) RT-PCR y Southern blot. Media ± SEM para cada grupo de individuos obtenidos a partir de los valores individuales de unidades arbitrarias de densitometría (uad) normalizados y expresados como la relación entre el mRNA de citocina y el mRNA de β-actina. Sólo se incluyen los datos comprendidos en el rango: M ± 3 SEM. B) Western blot de IL-12_{p40}. C) Western blot de IL-18. Calle 1: proteína recombinante humana. HAIp: Hepatitis autoinmune en pacientes pediátricos. CS: controles sanos. ** p>0.01, test U de Mann-Witney. Parte de estos resultados se incluyeron en mi tesina de licenciatura. Resultados publicados en *Human Immunol*, 2004.

El gen de la IL-18 codifica para un precursor de 24 KDa que luego es clivado por la enzima convertidora de IL-1β (ICE–caspasa 1) para dar el polipéptido biológicamente activo de 18,3 KDa (Gu Y. y col., 1997; Monteleone G. y col., 1999). En el ensayo por western blot, la IL-18 fue detectada mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce el extremo carboxilo terminal

de la molécula que se encuentra tanto en el precursor como en la forma madura de esta citocina. Como puede observarse en la figura 17C, el precursor de 24 KDa se detecta tanto en los pacientes (calles 2 a 6) como en los normales (calles 7 a 11), mientras que la proteína biológicamente activa, no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas. La presencia del polipéptido precursor de IL-18 se debe a que esta citocina se sintetiza constitutivamente en el hígado normal. Por otro lado, la ausencia de la forma madura en el tejido patológico puede deberse a diferentes factores como el tiempo de vida media de este polipéptido o a una mayor sensibilidad a ser degradado.

En conclusión, los mayores niveles de mRNA detectados en los pacientes no se correlacionaron con la presencia de la proteína biológicamente activa, lo que nos impide concluir cuál es el probable papel de IL-18 en esta patología.

Expresión de IL-12R β 2

El análisis del receptor para la IL-12 se llevo a cabo por RT-PCR y Southern blot de la subunidad β 2 en 7 hígados control y 9 patológicos.

Los niveles de expresión de este mensajero fueron significativamente mayores en todos los pacientes, respecto de los individuos control (HAIp: 91.27 ± 28.9 , CS: 4.12 ± 2.94 , $P=0,0054$, figura 17A).

Tomados juntos, el incremento de IFN- γ , IL-12_{p40}, IL-12R β 2 e IL-18, sugieren que la respuesta inmune tipo I participa de la inmunopatogénesis de la HAIp.

Expresión de IL-10 en HAIp

El análisis de esta citocina Th2, también se evaluó por RT-PCR-Southern blot en biopsias hepáticas de pacientes pediátricos con HAI. Como se observa en la figura 18, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión del mRNA de esta citocina cuando se comparó pacientes HAIp con hígados normales (HAIp: 18 ± 7.2 , n=5; CS: 5.9 ± 3.7 , n=5). Estos niveles podrían reflejar la expresión constitutiva de esta citocina en las células sinusoidales del hígado.

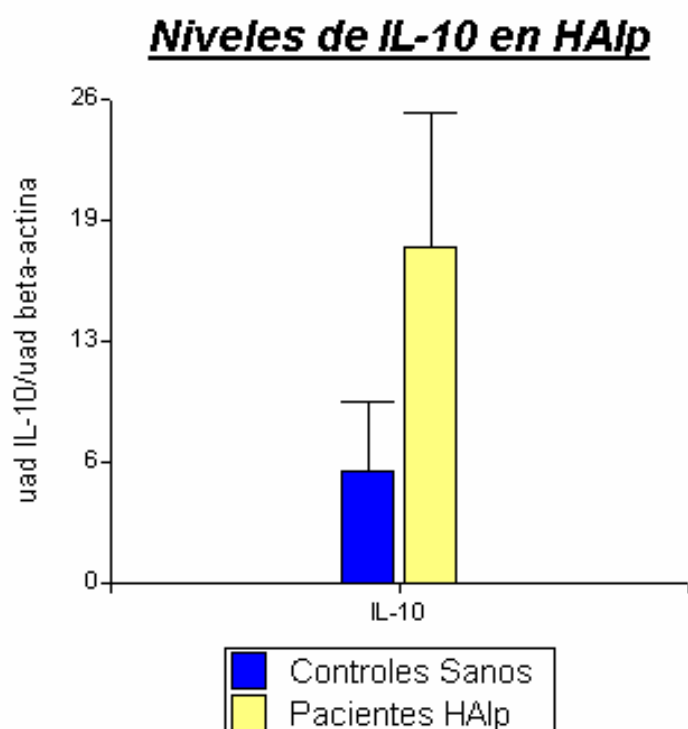


Figura 18: Expresión de IL-10 en HAIp. Media \pm SEM para cada grupo de individuos obtenidos a partir de los valores individuales de unidades arbitrarias de densitometría (uad) normalizados y expresados como la relación entre el mRNA de IL-10 y el mRNA de β -actina. Sólo se incluyen los datos comprendidos en el rango: $M \pm 3$ SEM. Parte de estos resultados se incluyeron en mi tesina de licenciatura. Resultados publicados en *Human Immunol*, 2004.

Polimorfismos en el promotor de IL-10 en HAI

Con el objeto de confirmar el papel de IL-10 en la inmunopatogénesis de la HAI, se analizaron las frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de esta citocina el cual afecta los niveles de expresión de la misma.

En los pacientes con HAI, tanto pediátricos (HAIp) como adultos (HAAla), las frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de IL-10 resultaron similares a las obtenidas en la población control (tabla 20). Adicionalmente, se realizó la comparación de las frecuencias haplotípicas y genotípicas en función del género, sin encontrar diferencias significativas con la población control.

En el caso de los pacientes pediátricos, este resultado confirma a nivel genético los resultados descritos previamente en los cuales mediante la técnica de RT-PCR no encontramos diferencias significativas en los niveles de RNA mensajero de IL-10.

Polimorfismos del promotor de IL-10	Frecuencia haplotípica			Frecuencia genotípica			
	n	GCC	ACC	ATA	G/G	G/A	A/A
Controles Sanos	209	0.35	0.40	0.26	0.10	0.48	0.42
Pacientes HAIp	117	0.32	0.32	0.35	0.13	0.39	0.48
Pacientes HAAla	80	0.32	0.37	0.31	0.11	0.41	0.48

Tabla 20: Frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de IL-10 en pacientes con HAIp, HAAla y en controles sanos.

Expresión de TGF-β1 en HAI

Debido a la mencionada relación de TGF-β1 en la generación de fibrosis hepática, y en particular a su asociación con la hepatitis autoinmune, se analizaron por RT-PCR-Southern blot los niveles de mRNA de esta citocina en el hígado de pacientes pediátricos con HAI en comparación con los controles sanos. Como muestra la figura 19, la expresión de esta citocina resultó incrementada en los pacientes pediátricos (HAIp: 728.94 ± 172.2 , n=11; CS: 119.4 ± 48.95 , n=7; p=0.013), Esto sugiere claramente que TGF-β1 participa en la inmunopatogenia de la HAIp.

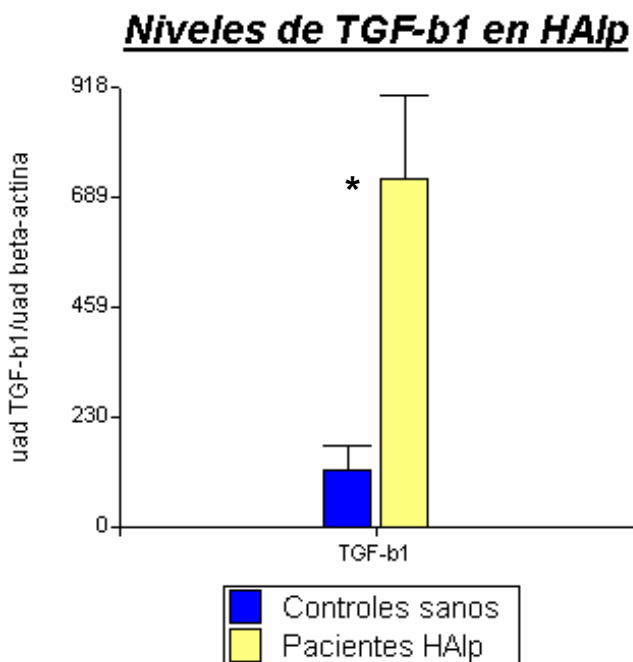


Figura 19: Expresión de TGF-β1 en HAIp y HAIa. Media \pm SEM para cada grupo de individuos obtenidos a partir de los valores individuales normalizados y expresados como la relación entre el mRNA de TGF-β y el mRNA de β-actina. Solo se incluyen los datos comprendidos en el rango: $M \pm 3$ SEM. Parte de estos resultados se incluyeron en mi tesina de licenciatura.

Análisis de los polimorfismos en el gen de TGF-β1 en HAI

Con el objeto de investigar más profundamente el rol de esta citocina en la hepatitis autoinmune, se analizó el polimorfismo del gen de **TGF-β1** correspondientes al codón 25, tal como fue previamente descrito en el estudio de pacientes infectados con HCV.

La frecuencia de individuos portadores del alelo **Pro** en el codón 25 del gen de TGF-β1 resultó disminuida cuando los pacientes con HAIp fueron comparados con la población control ($p=0.0011$, $OR=0.2$, $IC=0.07-0.54$) o con pacientes que padecen la forma adulta de HAI ($p=0.0006$, $OR=0.16$, $IC=0.05-0.48$; tabla 21). La disminución de este alelo de baja expresión, implicaría para estos pacientes una presencia de niveles mayores de esta citocina profibrótica.

Estos resultados confirman a nivel genético que la capacidad de producir mayores niveles de TGF-β1 podría ser responsable de la mayor agresividad observada en los pacientes con HAIp.

Cuando analizamos en conjunto las frecuencias del codón 25 de TGF-β1 y del promotor de IL-10, encontramos una marcada disminución de la frecuencia **Pro+/no-GG** ($p=0.0076$, $OR=0.11$, $IC=0.1-0.8$; tabla 21). Esto implicaría que el efecto de los elevados niveles de TGF-β1 (por ausencia del alelo Pro de baja expresión) es más evidente en los individuos que generan mayores niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (por presencia del genotipo GG). Sin embargo, este resultado podría ser un mero efecto de la disminución del alelo Pro ya que nada podemos decir de la frecuencia del genotipo **Pro+/GG**.

Polimorfismos en codón	Frecuencia genotípica							
	25 de TGF-β1 y pIL-10	TGF-β1		TGF-β1 + pIL-10				
		n	Pro+	Pro-	Pro+		Pro-	
					GG	No-GG	GG	No-GG
Controles sanos	183	0.17	0.83	0.01	0.16	0.10	0.73	
Pacientes HAIP	101	0.04**	0.96	0.00	0.02**	0.13	0.85	
Pacientes HAIA	69	0.21###	0.79	0.00	0.19	0.08	0.73	

Tabla 21: Polimorfismo en el codón 25 del gen de TGF-β1 solo y en combinación con el polimorfismo del promotor de IL-10 (pIL-10) en pacientes pediátricos y adultos con HAI en comparación con individuos sanos. ** p<0.01 HAIP vs CS, ### p<0.001 HAIA vs. HAIP.

Análisis de los receptores KIR en HAI

Como se describe anteriormente, la IL-4 se encuentra aumentada en pacientes pediátricos pero no en adultos con HAI. Esta citocina resultó asociada a la presencia de células NKT Vα24 (Cherňavsky AC. y col., 2004). Debido a que estas células expresan receptores KIR al igual de las NK, se estudiaron las frecuencias de estos genes en los pacientes pediátricos y adultos con HAI.

Cuando analizamos los diferentes genes KIR en los pacientes pediátricos y adultos con HAI encontramos que no hay diferencias significativas en las frecuencias de ninguno de los genes KIR (tabla 22). Sin embargo, algunas diferencias que no alcanzan significancia estadística, probablemente por el pequeño número de muestras analizadas, pueden observarse para los

genes 2DL5, 2DS3 en los HAIp y los 2DL2, 2DS2 y 3DS1 en los pacientes HAIIa.

Genes KIR	n	Genes KIR inhibidores					Genes KIR activadores						2DP1
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	3DL1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	
Controles sanos*	367	0.95	0.54	0.86	0.55	0.95	0.46	0.54	0.29	0.95	0.35	0.41	0.96
Pacientes HAIp	71	0.97	0.51	0.87	0.45	0.94	0.40	0.49	0.18	0.92	0.31	0.38	0.97
Pacientes HAIIa	48	0.88	0.44	0.87	0.56	0.90	0.50	0.46	0.31	0.92	0.42	0.50	0.87

Tabla 22: Frecuencia de los genes KIR en controles sanos y en pacientes con HAIp y HAIIa. Los genes KIR 2DL4, 3DL2, 3DL3 y 3DP1 están prestantes en todos los individuos. *Los controles sanos fueron evaluados por la Lic. en Biotecnología Ana Claudia Flores, becaria doctoral de la CONICET.

Frecuencias de los alelos de KIR 2DS4 en HAI

La frecuencia del gen KIR 2DS4 no resultó significativamente diferente entre los pacientes pediátricos y adultos con HAI y los controles sanos. Sin embargo, cuando se analizaron las frecuencias de los diferentes alelos de este gen se observó que la forma funcional no deletada y en particular el alelo 101 se encuentran fuertemente aumentados en los pacientes con HAIp en comparación con la población sana (no deletado: $p < 0.0001$, $OR = 3.32$; alelo 101: $p = 0.0002$, $OR = 3.08$, tabla 23). Acompañando a este incremento, se observó una disminución de las formas deletadas de este gen, que corresponde a los alelos 11 y 12 (deletado: $p = 0.048$, $OR = 0.48$; alelo 11: $p = 0.026$, $OR = 0.47$, alelo 12: $p = 0.04$, $OR = 0.27$). Este resultado indica que las células NK de los pacientes con HAIp tienen una incrementada capacidad

citotóxica, sugiriendo que la misma sería perjudicial en la progresión de la enfermedad. Debido a que no se observaron diferencias en la frecuencia génica de KIR 2DS4, sólo se muestran las frecuencias obtenidas teniendo en cuenta únicamente los individuos portadores del gen. Las frecuencias de cada alelo en la población total son proporcionalmente iguales a las mostradas en la tabla.

En cuanto a los pacientes adultos con HAI, se observaron menos diferencias con la población control que con los pacientes pediátricos en las frecuencias alélicas del gen KIR 2DS4 (tabla 23). En cuanto a las formas no deletadas de este gen, se observó un leve incremento en la frecuencia del alelo 101 que no alcanza la significancia estadística cuando se la compara con la población control, pero que resultó significativamente menor que la observada en los pacientes pediátricos ($p=0.04$). Por otro lado, se observó que la frecuencia de alelos deletados es muy similar a la observada en los pacientes pediátricos, inclusive, la frecuencia de los alelos 11 y 12 es aún menor que la observada en HAIp. Sin embargo, sólo se reportaron diferencias significativas en el alelo 11 cuando se comparó a los pacientes HAIa con los controles sanos ($p=0.0071$, $OR=0.30$). La falta de significación estadística en los alelos deletados en su conjunto y en el alelo 12 debe estar relacionada con el menor número de pacientes analizados.

Frecuencia de alelos de KIR 2DS4	n	NO DELETADOS (Estimulador de citotoxicidad)				DELETADOS (Receptor soluble)			
		No deletado	101	102	2	Deletado	3	11	12
Controles Sanos	420	0.40	0.38	0.02	0.00	0.81	0.53	0.32	0.11
Pacientes HAIP	73	0.68***	0.68***	0.00	0.00	0.70*	0.48	0.22*	0.04*
Pacientes HAIA	51	0.53	0.53[#]	0.00	0.00	0.69	0.59	0.14**	0.02

Tabla 23: Frecuencia de los alelos del gene KIR 2DS4 en controles sanos y en pacientes con HAIP y HAIA. Las frecuencias fueron calculadas dividiendo el número de individuos positivos para cada alelo o grupo de alelos (deletado y no deletado) sobre los individuos 2DS4 positivos. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 en comparación con los controles sanos, [#] p<0.05 comparando HAIP vs. HAIA.

Discusión

Este trabajo de tesis se concentró en dos actores de la inmunidad; citocinas, en particular la IL-10 y el TGF- β 1 y un componente central de la inmunidad innata, las células NK, y su papel en la evolución de dos patologías: una infecciosa, como es la respuesta del organismo a la infección por el virus de la hepatitis C (HCV) y una patología autoinmune representada por la hepatitis autoinmune de tipo I (HAI).

Papel de estos actores en la infección por el HCV

Papel de IL-10 en la hepatitis crónica por infección con HCV

Dentro de las citocinas, un hallazgo inesperado consistió en revelar un papel importante para la IL-10 en la evolución de la infección por el HCV.

Una fuerte respuesta por parte de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con un perfil predominante tipo Th1, parece ser el responsable de la recuperación de la infección por el virus de HCV (Diepolder HM. y col, 1995; Koziel MJ. y col, 2005). En contraste, pacientes que desarrollan la infección crónica muestran una respuesta predominante de tipo Th2 que inhibe la respuesta Th1 y favorece la persistencia de la infección (Gonzalez-Peralta RP, 1994; Rehermann B. y col, 2005). En este contexto podríamos pensar que aquellos individuos que porten el genotipo alto productor de IL-10 (-1082GG) tendrán mayores niveles circulantes de esta citocina inhibiendo así la respuesta Th1, lo cual puede resultar en una falla en el proceso de eliminación viral.

Los resultados a nivel genético hallados en este estudio permitirían explicar tanto los elevados niveles séricos de esta citocina observados en

pacientes crónicos con HCV, como la elevada producción *in vitro* por PBMC de dichos pacientes (Boyer N, 2000; Lechmann M, 1999; Woitas RP, 1997).

La incrementada producción de IL-10 inducida en forma inespecífica, y evidenciada en nuestros experimentos de estimulación de PBMC con LPS, confirmaría los datos publicados que muestran que estos pacientes producen mayores niveles de esta citocina que la población normal.

En concordancia con el papel de la IL-10 en la infección por HCV, se debe mencionar otro estudio donde el bloqueo del receptor de IL-10 con un anticuerpo específico, revierte el efecto inhibitorio de esta citocina sobre la proliferación de los linfocitos T que reconocen específicamente antígenos virales (Rigopoulou EI. y col, 2005). Además, la evidencia clínica sugiere que individuos con disfunción de la respuesta inmune celular, tal como aquellos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), muestran una progresión más rápida a la cirrosis (Koziel MJ. y col, 2005).

Adicionalmente, en este estudio se demuestra a nivel genético que las mujeres cuya infección es más susceptible de evolucionar hacia el daño hepático (ALATE) se asocian con un incremento en la frecuencia del genotipo alto productor de IL-10 (-1082GG). Este incremento se acompaña de una disminución del genotipo -1082GA (bajo productor) del promotor de IL-10. Por el contrario, encontramos un incremento en la frecuencia del genotipo GA en los pacientes auto-limitados.

Este y otros estudios han demostrado un incremento sérico de los niveles de IL-10 en pacientes que evolucionan hacia la hepatopatía crónica. Nuestra demostración de un efecto de género en este factor de riesgo fue un hallazgo inesperado y sugestivo, ya que el aumento de nivel sérico de la IL-10

se observa en la mayoría de los pacientes que padecen esta enfermedad. Sin embargo, este incremento no ha sido relacionado con el género. En este contexto, nuestros resultados podrían sugerir dos explicaciones posibles. La primera, que los niveles elevados de IL-10 en los hombres este relacionado con una respuesta al virus independiente del polimorfismo en el gen de la IL-10 o considerar una segunda posibilidad donde se requeriría revisar los experimentos donde se miden los niveles séricos de IL-10 y evaluarlos en función del género.

A pesar de las diferencias étnicas, nuestros resultados del polimorfismo del promotor de la IL-10 coinciden con reportes de la Clínica Mayo (Vidigal PG. y col, 2002) y con un extensivo estudio realizado en Inglaterra (Knapp S. y col, 2003). Estos estudios también encontraron que el genotipo GG se asocia a la infección crónica. Así mismo, ha sido reportado que el haplotipo ATA (Vidigal PG. y col, 2002) y los genotipos ATA/ATA y -1082AG se asocian con la infección auto-limitada (Knapp S. y col, 2003).

Contrariamente, otros reportes muestran resultados contradictorios. Sin embargo, en estos trabajos previos, no se analizó el efecto de género en la asociación entre el polimorfismo en el promotor de IL-10 y la infección con HCV. Nosotros entendemos que este efecto puede explicar muchos resultados contradictorios, donde no se identificó la asociación de GG con la evolución clínica de pacientes infectados por el HCV (Edwards-Smith CJ. y col, 1999; Lio D. y col, 2003; Mangia A. y col, 2004; Minton EJ. y col, 2005; Powel EE. y col, 2000).

Inversamente, varios reportes indican que citocinas Th1 median el daño tisular hepático y la evolución crónica de la infección. En este sentido ha

sido reportado que los niveles de mRNA de IFN- γ e IL-18 están significativamente elevados en el hígado de pacientes crónicos (McGuinness PH. y col, 2000). Un estudio de Rico y colaboradores (2002) mostró que la secreción de IFN- γ por parte de los linfocitos intrahepáticos era casi ausente en pacientes con niveles normales de transaminasas hepáticas (ALAT) en comparación con individuos con ALAT elevadas. Estas evidencias sugieren que una respuesta inmune tipo Th1 que inicialmente resulta ineficiente para controlar la infección, sería la responsable de generar los mediadores inflamatorios responsables del daño tisular observado en los pacientes crónicos.

Rol anti-fibrogénico de la IL-10 en mujeres infectadas con HCV

Datos clínicos y experimentales sugieren que esta citocina puede inhibir o detener el proceso de fibrosis hepática (Nelson DR. y col, 2000; Rigopoulou EI. y col 2005). En concordancia con estos datos, nosotros encontramos que el aumento en la frecuencia del genotipo GG fue sólo observado en las mujeres que no desarrollaron cirrosis, principalmente en aquellas pacientes con estadios 1 y 2 de fibrosis hepática (datos no mostrados). Resultados semejantes se observaron en Japón, donde en individuos infectados con HCV se observó que el haplotipo GCC estaba asociado con una disminución en la fibrosis hepática (Hamada H. y col, 2003).

Pacientes crónicos con HCV que recibieron un tratamiento corto con IL-10 recombinante mostraron una disminución de la inflamación y fibrosis hepática (Nelson DR. y col, 2000). Sin embargo, y en concordancia con nuestros hallazgos, el tratamiento prolongado por 12 meses conduce además a

un incremento en la carga viral (Nelson DR, 2003). Este efecto podría ser conseguido tras la disminución de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ secretores de IFN- γ y polarizando la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th2.

Influencia de TGF- β 1 en la generación de la fibrosis hepática

El análisis de los polimorfismos que afectan los niveles de expresión o secreción al medio extracelular de esta citocina también fue realizado en pacientes infectados con HCV. En este análisis, se halló una disminución en la frecuencia del alelo Pro del codón 25 de este gen en pacientes con fibrosis. Debido a que éste es un alelo de baja producción, nuestros resultados implican un aumento en la frecuencia de individuos capaces de producir mayores niveles de TGF- β 1. En concordancia con estos resultados, en pacientes con infección por HCV recurrente luego de trasplante hepático, el desarrollo de fibrosis resultó asociado con la presencia de alelos de alta producción de esta citocina (Ben-Ari Z. y col, 2004).

La expresión de TGF- β 1 tiene numerosos puntos de regulación, tanto a nivel de la traducción como pos-traduccionales. A pesar de esta salvedad, nuestros resultados aportarían una base genética que podría explicar, al menos en parte, los elevados niveles de esta citocina en pacientes con HCV asociados a la presencia de fibrosis (Marek B. y col, 2005).

El análisis conjunto del polimorfismo de TGF- β 1 e IL-10 reveló un incremento en la frecuencia de individuos 25Pro⁺ IL-10GG (bajo TGF- β 1, alto IL-10) en los pacientes que no desarrollan fibrosis. La combinación de bajos niveles de una citocina profibrótica (TGF- β 1) y elevados niveles de una citocina

antifibrótica (IL-10), sería clave para evitar el proceso fibrogénico. En este caso no encontramos ninguna diferencia en cuanto al sexo de los pacientes.

En los pacientes HCV con infección crónica y daño hepático (RNA+ ALATE) se observó una disminución de la frecuencia 25Pro+ IL-10 no-GG (baja expresión ambas citocinas). La disminución de una determinada frecuencia es sinónimo de protección, indicando que la disminución de TGF- β 1 e IL-10 evitaría la generación de la patología crónica.

A pesar de que las diferencias observadas radican fundamentalmente en relación con la fibrosis, no debemos olvidar que TGF- β 1 es una citocina inmunomoduladora, y por lo tanto, sus elevados niveles pueden perjudicar la generación de una respuesta inmune capaz de eliminar al virus. En este sentido ha sido reportado que tanto la IL-10 como el TGF- β secretados por las células Treg anti-HCV, son capaces de inhibir la secreción de INF- γ por PBMC de pacientes con HCV (Alatrakchi N. y col, 2007)

En conclusión, la capacidad genética de producir elevados niveles de TGF- β 1 sería un factor de riesgo para la evolución a cirrosis. Por el contrario, como explicamos anteriormente elevados niveles de IL-10 contribuyen a prevenir el desarrollo de fibrosis en pacientes infectados con HCV, aunque generan un incremento del riesgo de desarrollar hepatitis crónica.

Los receptores KIR y el aumento de la actividad citotóxica de las células NK en HCV

Las frecuencias de los genes KIR 2DS2 y 2DL2 se encuentran disminuidos en los pacientes con patología HCV auto-limitada. Estos genes se

encuentran juntos en la mayoría de los haplotipos, indicando que alguno de estos haplotipos podría estar asociado a la eliminación viral. Adicionalmente, el gen activador KIR 2DS5 se encuentra aumentado en estos pacientes sugiriendo que el aumento de la actividad citotóxica favorecería la eliminación viral. El pequeño número de pacientes incluidos en este grupo no nos permitió confirmar los resultados publicados recientemente en el único trabajo que estudió, hasta el momento, las frecuencias los genes KIR en pacientes con HCV. Dicho trabajo, a partir de un elevado número de pacientes, demostró que la combinación KIR 2DL3-HLA-C1, ambos en homocigosis, favorecen la eliminación viral (Khakoo Sl. y col, 2004). La carencia de HLA-C2 impide la inhibición de la citotoxicidad mediada por KIR 2DL1, en tanto que la ausencia de KIR 2DL2 (la contraparte alélica de 2DL3) posiciona a la combinación HLA-C1/KIR 2DL3 como único par funcional de este sistema. Como se describió en la introducción, dicho par receptor/ligando posee menor afinidad que las restantes combinaciones, y por lo tanto una menor capacidad inhibitoria. La consecuencia de esta menor actividad inhibitoria, se corresponde, en estos individuos, con un aumento en la capacidad citotóxica de sus células NK (Khakoo Sl. y col, 2004).

Inversamente, la frecuencia del gen KIR 2DS3 resultó elevada en aquellos pacientes con infección persistente (RNA+), que se acompaña de daño hepático con enzimas elevadas (ALATE). Adicionalmente, la frecuencia del gen KIR 3DS1 en homocigosis resultó incrementada en los pacientes que desarrollan cirrosis, particularmente cuando los individuos son positivos u homocigotos para HLA-Bw4, supuesto ligando de estos genes. Por último, la frecuencia de los alelos deletados (supuestos alelos no estimuladores de

actividad citotóxica) del gen KIR 2DS4 se encuentra disminuida en los pacientes cirróticos. Estos resultados indicarían que la actividad citotóxica mediada por los genes KIR 2DS3, 3DS1 y 2DS4 estaría implicada en la patogénesis de esta enfermedad y colocaría a estos genes en la lista de los factores de riesgo para un mal pronóstico luego de contraer la infección.

Partiendo del hecho de que el daño tisular hepático es provocado por diferentes componentes del propio sistema inmune, podríamos pensar que, de no poder resolverse la infección en la fase aguda, la persistencia de una respuesta inflamatoria con una elevada capacidad citotóxica provoca un mayor riesgo de daño tisular hepático.

Cuando se analizaron los receptores KIR en la membrana de las células NK de sangre periférica de los pacientes con HCV se observó un incremento en el porcentaje de células positivas para varios de los marcadores utilizados (3DL1, 2DL1/2DS1/2DS3, 2DL1/2DS1, 2DL4 y 2DS4). En la mayoría de los casos, este incremento se registró fundamentalmente en las células NK^{bright}. Sin embargo, no pudimos relacionar los cambios en el fenotipo de los diferentes anticuerpos utilizados con los resultados obtenidos en los análisis genéticos. Una posible explicación para este efecto paradójico podría encontrarse en las características fenotípicas que adquieren las células NK durante su maduración. Como se describió en el trabajo de Romagnani C. y colaboradores (2007), la subpoblación NK^{bright} representaría una población precursora que luego de su activación/diferenciación hacia la NK^{dim} comienza a expresar los genes KIR. En este sentido, la expresión de genes KIR en las células NK^{bright} podría tener implicancias funcionales. Debe recordarse que estas células son las principales secretoras del IFN- γ . Por lo tanto, podríamos

especular con que estos cambios fenotípicos podrían estar acompañando cambios funcionales en pacientes crónicamente infectados con HCV.

Son escasos los trabajos que han evaluado hasta el momento la expresión de los receptores KIR en la superficie de las células NK, sin embargo, se presentaron contradicciones. Por un lado, se reportó que el porcentaje de células NK KIR positivas es similar entre los pacientes con HCV e individuos control (Jinushi M. y col, 2004). Sin, embargo, este trabajo, no discriminó entre células NK^{dim} y NK^{bright}, este último grupo es el que presentó mayores diferencias en nuestro trabajo.

Golden-Mason y colaboradores realizaron un estudio prospectivo sobre pacientes con infección aguda que evolucionan o no a la hepatitis crónica. En línea con nuestros resultados, este trabajo muestra que el porcentaje de células NKT KIR 2DL1 (CD158a) positivas se encuentra incrementada en los pacientes que evolucionan hacia la enfermedad crónica, en tanto que los individuos que resuelven la infección mantienen niveles similares a los controles (Golden-Mason L. y col, 2007).

Ha sido reportado que tanto pacientes crónicos como aquellos que auto-limitan la infección, muestran un incremento en el porcentaje de células positivas para los receptores CD94 y NKG2A (Jinushi M. y col, 2004; Golden-Mason L. y col, 2007). A pesar de que uno de estos trabajos analiza específicamente las células NKT, el otro lo hace sobre células CD56⁺. Nosotros no pudimos observar este fenotipo en nuestra población de pacientes con HCV. En cambio, encontramos fundamentalmente una disminución de la intensidad de fluorescencia, o sea de la cantidad de receptor en la membrana plasmática.

Las citocinas y las células NK en la Hepatitis Autoinmune tipo I

La hepatitis crónica autoinmune en pacientes pediátricos (HAIp) es una enfermedad sumamente agresiva que difiere en muchos aspectos de la patogénesis de los adultos (HAAla). En este estudio hemos demostrado en pacientes pediátricos, en forma semejante a lo descrito en pacientes adultos (Schlaak JF. y col, 1993; Napoli J. y col, 1996), un aumento en los niveles de expresión de citocinas Th1. Este incremento resultó acompañado de IL-4 y de células NKT V α 24+ en el hígado de los mismos pacientes. Adicionalmente, encontramos niveles elevados de TGF- β 1. El aumento de esta citocina profibrótica contrastó con niveles normales de la citocina antifibrótica IL-10 (Bijlsma FJ y col, 2002; Cherňavsky AC y col, 2004).

Como ya se describió en la introducción, las formas pediátricas parecen constituir una entidad clínica diferente de las formas adultas. Además de poseer una diferente susceptibilidad genética, representada por una diferente asociación con genes HLA, las formas pediátricas presentan entre otras diferencias una mayor agresividad en su curso clínico que las hacen pasibles de requerir altas dosis de inmunosupresión para lograr su remisión clínica (Pando M. y col, 1999) y requerir con mucha mayor frecuencia un trasplante hepático. El TGF- β 1 se reconoce como un agente profibrótico y como tal, una participación diferencial de esta citocina podría al menos parcialmente explicar la mayor agresividad de las HAIp. En efecto, durante el curso de este trabajo, investigamos el polimorfismo del gen TGF- β 1 en pacientes pediátricos y adultos y hallamos, solamente en las HAIp, una disminución significativa del alelo bajo productor de esta citocina. Debido a que

este alelo es de baja expresión, estos pacientes tendrían niveles mayores de esta citocina profibrótica. Estos resultados concuerdan con otros reportes bibliográficos que indican que TGF- β 1 se encuentra sobreexpresada en el hígado de pacientes adultos con HAI (Bayer EM. y col., 1998). A pesar de que la expresión de TGF- β 1 tiene numerosos puntos de regulación a nivel traduccional y pos-traduccionales, nuestros resultados aportarían una base genética que podría explicar, al menos en parte, los elevados niveles de esta citocina en pacientes con HAIp.

Por otro lado, las frecuencias haplotípicas y genotípicas del promotor de IL-10 resultaron similares a las obtenidas en la población control, confirmando así que esta citocina no estaría implicada en la patogénesis de la HAIp.

Receptores KIR de células NK en HAIp

En un previo análisis demostramos que el número de células NKT V α 24 positivas se encuentran incrementadas en el hígado de pacientes pediátricos con HAI, pero nada se sabe en cuanto a la actividad de las células NK o NKT en esta patología. En este sentido resultó interesante estudiar la genética de los receptores KIR en estos pacientes.

Cuando analizamos la frecuencia de cada uno de los genes KIR no encontramos diferencias significativas con respecto a los controles en ninguno de ellos. Sin embargo, algunas diferencias que no alcanzan significación estadística, probablemente por el pequeño número de muestras analizadas, pueden observarse para los genes 2DL5, 2DS3 en los HAIp y los 2DL2, 2DS2 y 3DS1 en los pacientes HAIa.

Posteriormente analizamos la frecuencia de los diferentes alelos deletados y no deletados de 2DS4. Este análisis reveló un incremento en la frecuencia del alelo no deletado (funcional) 101, lo que implica que la actividad citotóxica mediada por este gen podría estar implicada en la patogénesis de esta enfermedad y de este modo comportarse como un factor de riesgo.

Conclusiones generales

En líneas generales, el presente trabajo demuestra que el perfil genético de un individuo juega un papel fundamental en la progresión de diferentes enfermedades. En el caso de la Hepatitis C, no es la probabilidad de infectarse sino la de enfermarse una vez infectado la que está en juego, y es en este punto donde los factores genéticos cobran importancia. Del mismo modo, el grado de avance de la enfermedad estaría influenciado por el perfil específico de la respuesta inmune en su conjunto, esta respuesta depende de la acción coordinada de numerosos factores, y es aquí donde la menor o mayor capacidad de producir una molécula determinada en un momento dado, o la menor o mayor actividad de un determinado tipo celular se vuelven relevantes. Esta patología es evidentemente multifactorial, y numerosos genes que participan en la respuesta inmune, así como otros genes, pueden participar en la generación del daño tisular. El conocimiento de cada uno de ellos sería importante tanto desde el punto de vista del diagnóstico, como para la generación de nuevas estrategias de tratamiento.

En cuanto a la Hepatitis Autoinmune Tipo I, se sabe que un factor sumamente importante para el desarrollo del proceso autoinmune en los niños

es la presencia del alelo HLA DRB1*1301. Las enfermedades autoinmunes tienen una base poligénica. Por lo tanto, la identificación de diferentes sistemas genéticos asociados con la susceptibilidad a contraer la enfermedad constituye un aporte a su mejor comprensión. En este sentido, en la HAIp hemos podido identificar, además de los genes HLA asociados con un mayor riesgo de contraer la enfermedad, a polimorfismos asociados con mediadores de la respuesta inmune. Por ejemplo, resulta ilustrativa la presencia de un polimorfismo del gen TGF- β 1 en las formas pediátricas de HAI que no se observó en las formas adultas. Este dato es de sumo interés por la reconocida mayor agresividad de la forma pediátrica, que al menos parcialmente, podría estar justificado por el papel de esta citocina en el curso clínico diferente de ambas formas de HAI. Por lo tanto, conocer la genética asociada a la patología puede colaborar tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de estas enfermedades.

Lic. Natalia Paladino

Doctorando

Prof. Dr. Leonardo Fainboim

Director de tesis doctoral

Parte de los resultados mostrados en la presente tesis han sido publicados en los siguientes manuscritos:

Simultaneous expression of Th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. AC Cherrñavsky*, N Paladino*, AE Rubio, MB De Biasio, N Periolo, M Cuarterolo, J Goñi, C Galoppo, MC Cañero-Velasco, AE Muñoz, H Fainboim and L Fainboim. *AC Cherrñavsky y N Paladino contribuyeron igualmente en este trabajo y deben ser consideradas co-primeras autoras. Human Immunology 2004;65:683-691.

Gender and the Susceptibility to Chronic Hepatitis C Associated with the Interleukin-10 Promoter Polymorphism. Paladino N, Fainboim H, Theiler G, Schroder T, Muñoz AE, Flores AC, Galdame O, Fainboim L. Journal of Virology 2006;80(18):9144-50.

Increased frequencies of activating NK receptors are associated with liver injury in individuals who did not eliminate hepatitis C virus. Paladino N, Flores A C, Marcos Y, Fainboim H, Theiler G, Arruvito L, Williams F, Middleton D, Fainboim L. Tissue Antigens 2007;69 (suppl 1):109-111.

Los manuscritos conteniendo los restantes resultados están en preparación.

Referencias bibliográficas

- Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004;113:963-72.
- Alatrakchi N, Graham CS, Van der Vliet HJ, Sherman KE, Exley MA, Koziel MJ. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. *J Virol* 2007;81:5881-5892.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31(5):929-938.
- Amaraa R, Mareckova H, Urbanek P, Fucikova T. Production of interleukins 10 and 12 by activated peripheral blood monocytes/macrophages in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection with respect to the response to interferon and ribavirin treatment. *Immunol Lett* 2002;83:209-14.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
- Bayer EM, Herr W, Kanzler S, Waldmann C, Meyer Zum Buschenfelde KH, Dienes HP, Lohse AW. Transforming Growth factor- β 1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity. *J Hepatol* 1998;28(5):803-811.
- Becker C, Fantini MC, Neurath MF. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:97-106
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;24:288-293
- Ben-Ari Z, Pappo O, Druzd T, Sulkes J, Klein T, Samra Z, Gadba R, Tambur AR, Tur-Kaspa R, Mor E. Role of cytokine gene polymorphism and hepatic transforming growth factor beta1 expression in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Cytokine* 2004;27:7-14.

- Bertolino P, Klimpel G, Lemon SM. Hepatic Inflammation and Immunity: A Summary of a Conference on the Function of the Immune System Within the Liver. *Hepatology* 2000;31(6):1374-1378.
- Bijlsma FJ, van der Horst AA, Tilanus MG, Rozemuller E, de Jonge N, Gmelig-Meyling FH, de Weger RA. No association between transforming growth factor beta gene polymorphism and acute allograft rejection after cardiac transplantation. *Trans Immunol* 2002;10:43-47.
- Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, Palacios SA, Chiarella JM, Abrantes-Lemos CP, Baggio VL, Laudana AA, Kalil J. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1906-1913.
- Boyer N, and Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32 (suppl. 1):98-112
- Boyington JC, and Sun PD. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 2002;38:1007-1021.
- Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-71.
- Cereb N, Maye P, Lee S, Kong Y, Yang SY. Locus-specific amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus-specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B, and -C alleles *Tissue Antigens* 1995;45:1-11.
- Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, Carrington M, Trowsdale J, Lutz CT. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 2003; 20;197(2):245-55.
- Chang JT, Segal BM, Shevach EM. Role of Costimulation in the Induction of the IL-12/IL-12 Receptor Pathway and the Development of Autoimmunity. *J Immunol* 2000;164:100-106.
- Cherňavsky AC, Paladino N, Rubio AE, De Biasio MB, Periolo N, Cuarterolo M, Goñi J, Galoppo C, Cañero-Velasco MC, Muñoz AE, Fainboim H, Fainboim L. Simultaneous expression of Th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. *Hum Immunol* 2004;

65:683-691.

- Colona M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(24):12000-4.
- Cuarterolo M, Dávila M, Roig A, Mondiglio C, Sassone A, Ciocca M. Hepatitis autoinmune 8 años de experiencia. *Medicina Infantil* 1995;2:237-241.
- Czaja AJ, Manns MP, McFarlane IG y Hoofnagle JH. Autoimmune hepatitis: The investigational and clinical challenges. *Hepatology* 2000;31:1194-1200
- Diepolder HM, Zchoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-1007.
- Dinarello Ch., Novick D, Puren A, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, Yoon D, Reznikov L, Kim S, Rubinstein M. Overview of interleukin-18: more than an interferon- γ inducing factor. *J leuk Biol* 1998;63:658-664.
- Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. The Human Liver Contains Multiple Populations of NK Cells, T Cells, and CD3+CD56+ Natural T Cells with Distinct Cytotoxic Activities and Th1, Th2, and Th0 Cytokine Secretion Patterns. *J Immunol* 1999;163:2314-2321.
- Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-530.
- Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS. Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem* 2004;279:43479-86.
- Fainboim L, Cherňavsky AC, Paladino N, Flores AC and Arruvito L. Cytokines and chronic liver disease. *Citokine Growth Factor Rev* 2007;18:143-157.
- Fainboim L, Marcos Y, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, Badía I, Remondino G, Ciocca M, Ramonet M, et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children: Strong association with a particular HLA-DR6 (HLA-DRB1*1301) haplotype. *Hum Immunol* 1994; 41:146-150.

- Feldmann G. Liver apoptosis. *J Hepatol* 1997;26(2):1-11.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease:etiology and pathogenesis. *Gastroenterol* 1998;115:182-189.
- Flores AC, Marcos CY, Paladino N, Capucchio M, Theiler G, Arruvito L, Pardo R, Habegger A, Williams F, Middleton D, Fainboim L. KIR genes polymorphism in argentinean caucasoids and Amerindians. *Tissue Antigens* 2007;69 (6):568-76.
- Folgori A, Spada E, Pezzanera M, Ruggeri L, Mele A, Garbuglia AR, Perrone MP, Del Porto P, Piccolella E, Cortese R, Nicosia A, Vitelli A; Acute Hepatitis C Italian Study Group. Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance. *Gut* 2006;55:1012-9.
- Fukuda R, Satoh S, Nguyen TX., Uchida Y, Kohge N, Akagi S, Ikeda S, Watanabe M, Fukumoto S. Expression rate of cytokine mRNA in the liver of chronic hepatitis C: comparison with chronic B. *J Gastroenterol* 1995;30(1):41-47.
- Galle PR. Apoptosis in liver disease. *J Hepatol* 1997;27:405-412.
- Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Layrisse Z, Parham P. High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. *Immunogenetics*. 2006;58(5-6):474-80.
- Golden-Mason L, Castelblanco N, O'Farrelly C, Rosen HR. Phenotypic and functional changes of cytotoxic CD56pos natural T cells determine outcome of acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;81:9292-9298.
- Gonzalez-Peralta RP, Davis GL, and Lau JY. Pathogenetic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1994;21:255-259.
- Gorham JD, Lin JT, Sung JL, Rudner LA, French MA. Genetic Regulation of Autoimmune Disease: BALB/c Background TGF- β 1-Deficient Mice Develop Necroinflammatory IFN- γ -Dependent Hepatitis. *J. Immunol.* 2001; 166: 6413-6422.
- Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003;302:659-62.

- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
- Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS. Activation of Interferon gamma inducing factor mediated by interleukin-1-beta converting enzyme. *Science* 1997;275:206-209.
- Guillot C, Coathalem H, Chetritt J, David A, Lowenstein P, Gilbert E, Tesson L, Van Rooijen N, Cuturi MC, Souillou JP, Anegon I. Lethal hepatitis after gene transfer of IL-4 in liver is independent of immune responses and dependent on apoptosis of hepatocytes: a rodent model of IL-4-induced hepatitis. *J Immunol* 2001;166:5225-5235.
- Hamada H, Yatsunami H, Yano K, Arisawa K, Nakao K, and Yano M. Interleukin-10 promoter polymorphisms and liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Hepatol* 2003;39:457-458.
- Harada K, Van de Water J, Leung PS, Coppel RL, Ansari A, Nakanuma Y, Gershwin ME. In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology* 1997;25(4):791-6.
- He XS, Rehmann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, Berenguer M, Wright TL, Davis MM, Greenberg HB. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5692-7.
- Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2005;4:315-321.
- Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Takahashi R, Kuwahara H, Fujita N, Kita A, Oshima K, Sakamaki H, Uotani S, Kamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. *Hum Immunol* 2002;63:690-695.
- Jankovic D, Liu Z, And Gauze WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol*

2001;22(8):450:457.

- Jin Y, Fuller L, Carreno M, Esquenazi V, Tzakis AG, Miller J. The regulation of phenotype and function of human liver CD3+CD56+, and cells that also co-express CD8 by IL-2, IL-12 and anti-CD3 monoclonal antibody Human Immunol. 1998;59:352.
- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. 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 2004;173:6072-81.
- Kaneco Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, Nakayama T, Taniguchi M. Augmentation of V α 14 NKT Cell-mediated Cytotoxicity by Interleukin 4 in an Autocrine Mechanism Resulting in the Development of Concanavalin A-induced Hepatitis. J Exp Med 2000;191(1):105-114.
- Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W, Wysocki J, Adamek A, Spachacz R, Surdyk-Zasada J. Expression of cytokines (TNF-alpha, IL-1alpha, and IL-2) in chronic hepatitis C: comparative hybridocytochemical and immunocytochemical study in children and adult patients. J Histochem Cytochem 2004;52:29-38.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. Science 2004;305:872-4.
- Kirk AD, Bollinger RR, Finn OJ. Rapid, comprehensive analysis of human cytokine mRNA and its application to the study of acute renal allograft rejection. Hum Immunol. 1995;43(2):113-28.
- Knapp S, Hennig BJW, Frodsham AJ., Zhang L, Hellier S, Wright M, Goldin R, Hill AVS, Thomas HC, Thursz MR. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. Immunogenetics 2003;55:362-369.
- Koziel MJ. Cellular immune responses against hepatitis C virus. Clin Infect Dis 2005;41 (suppl 1):25-31.
- Lamonaca V, Missale G, Urbani S, Pilli M, Boni C, Mori C, Sette A, Massari M,

Southwood S, Bertoni R, Valli A, Fiaccadori F, Ferrari C. Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4(+) T cells: implications for vaccine development. *Hepatology* 1999;30:1088-98.

- Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, Kaiser R, Ihlenfeldt HG, Jung G, Sauerbruch T, Spengler U. Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31:971-978.
- Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-512.
- Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998;352:113
- Limmer A, Sacher T, Alferink J, Kretschar M, Schonrich G, Nichterlein T, Arnold B and Hammerling G Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol* 1998;28:2395-2406.
- Lio D, Caruso C, Di Stefano R, Colonna-Romano G, Ferraro D, Scola L, Crivello A, Licata A, Valenza LM, Candore G, Craxi A, Almasio PL. IL-10 and TNF- α polymorphisms and the recovery from HCV infection. *Hum Immunol* 2003;64:674-680.
- Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM. Cutting Edge: Molecular Portrait of Human Autoimmune Disease. *J Immunol* 2002, 169:5-9.
- Mc Guinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut* 2000;46:260-9.
- Mc Iness I, Gracie JA, Leung BP, Wei XQ, Liew FY. Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today*, 2000;21(7):312-5.
- Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Paziienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV

infection. *Cytokine* 2004;25(3):103-109.

- Marcos Y, Fainboim HA, Capucchio M, Findor J, Daruich J, Reyes B, Pando M, Theiler GC, Méndez N, Satz ML, et al. Two-locus involvement in the association of human leukocyte antigen with the extrahepatic manifestations of autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* 1994;19:1371-1374.
- Marek B, Kajdaniuk D, Mazurek U, Janczewska-Kazek E, Kos-Kudla B, Strzalka B, Fila A, Niedziolka D, Beniowski M, Ostrowska Z, Borgiel-Marek H, Kajdaniuk J, Sieminska L, Nowak M, Wilczok T, Pakula D, Filipczyk P. TGF-beta1 mRNA expression in liver biopsy specimens and TGF-beta1 serum levels in patients with chronic hepatitis C before and after antiviral therapy. *J Clin Pharm Ther* 2005;30:271-7.
- Marrack P, Kappler J and Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nature Medicine* 2001;7(8):899-9045.
- Maxwell LD, Williams F, Gilmore P, Meenagh A, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: II. KIR2DS4. *Hum Immunol* 2004; 65: 613-21.
- Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM. Studies on the expression of the deleted KIR2DS4*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and nondeleted versions in different populations. *Hum Immunol* 2007;68(2):128-34.
- Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. KIR genes *Transpl Immunol* 2005;14:135-42.
- Mieli-vergani G, and Vergani MD, Immunological liver diseases in children. *Seminars in liver disease* 1998; 18:271-279.
- Mieli-Vergani G, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, McFarlane IG, Mowat AP, Vergani D. Different Immune Mechanism Leading to Autoimmunity in Primary Sclerosing Cholangitis and Autoimmune Chronic Active Hepatitis of Childhood. *Hepatology* 1989;9(2):198-203.
- Minton EJ, Smillie D, Smith P, Shipley S, McKendrick MW, Gleeson DC, Underwood JC, Cannings C, Wilson AG, and Trent Hepatitis C Study Group. Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. *Hum Immunol* 2005;66(2):127-32.
- Monteleone G, Trapasso F, Parello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Lizza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's

disease. *J of Immunol* 1999;163:143-147.

- Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, Moraes JR, Sampaio EP, Sarno EN, and Huizinga TW. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics* 2003;54:896-899.
- Myhr KM, Vagnes KS, Maroy TH, Aarseth JH, Nyland HI, and Vedeler CA. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 2003;139:81-83.
- Napoli J, Bishop GA, H MP, Painter DM, McCaughan GW. Progressive Liver Injury in Chronic Hepatitis C Infection Correlates with Increased Intrahepatic Expression of Th1-Associated Cytokines. *Hepatology* 1996;24:759-765.
- Nelson DR, Gonzalez-Peralta RP, Qian K, Xu Y, Marousis CG, Davis GL, Lau JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 1997;4:29-35.
- Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, and Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterol* 2000;118:655.
- Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, Cabrera R, Liu C, and Davis GL. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003;38:859-868.
- Norris S., Doherty DG, Collins C, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogeneous and include $V\alpha 24$ - $J\alpha Q$ and $\gamma\delta$ T cell receptor bearing cells *Human Immunol*, 1999;60:20
- Obermayer-Straub P, Strannburg CP, and Manns MP. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000;32(1):181-197.
- O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM. Functional Polymorphism of the KIR3DL1/S1 Receptor on Human NK Cells. *J Immunol* 2007;178: 235-241.
- Pando M, Larriba J, Fernandez G, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, Badia I, Daruich J, Findor J, Tanno H, Cañero-Velasco C, Fainboim L. Pediatric and

adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999;30:1374-80.

- Parham P. MHC class I molecules and KIR in human history, health and survival. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5:201-214.
- Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, Monteleone I, Sebkova L, Doldo P, Luzzza F, Pallone F. Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol* 2000;165:7234-7239.
- Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol* 1998;6:193-7.
- Pizarro T, Michie M, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith M, Foley E, Moskaluk C, Bickston S, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's Disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;162:6829-6835.
- Plathow A et al. *Trans Proc* 2003; 35:2908.
- Powell E. E., C. J. Edwards-Smith, J. L. Hay, A. D. Clouston, D. H. Cawford, C. Shorthouse, D. M. Purdie, and J. R. Jonsson. 2000. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 31:828-833.
- Racanelli V and Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43:S54-62.
- Rajagopalan S and Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease *J Exp Med* 2005;201:1025-1029.
- Rehermann B. and M. Nascimbeni. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature. Rev. Immunol.* 5:215-229.
- Rico MA, Quiroga JA, Subira D, Garcia E, Castanon S, Sallberg M, et al. Features of the CD4+ T-cell response in liver and peripheral blood of hepatitis C virus-infected patients with persistently normal and abnormal alanine aminotransferase levels. *J Hepatol* 2002;36:408-16.
- Rigopoulou E. I., W. G. Abbott, P. Haigh, and N. V. Naoumov. 2005. Blocking of interleukin-10 receptor-a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus. *Clin. Immunol.* 117(1):57-64.
- Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U,

Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997;185:825-831.

- Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, Conte R, Strowig T, Moretta A, Münz C, Thiel A, Moretta L, Ferlazzo G. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 2007;178(8):4947-55.
- Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, Uhrberg M. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* 2002;169:4253-4261.
- Schlaak J. F, Lohr H, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. Analysis of the in vitro cytokine production by liver-infiltrating T cells of patients with autoimmune hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 94: 168-173.
- Schweyer S, Mihm S, Radzun HJ, Hartmann H, Fayyazi A. Liver infiltrating T lymphocytes express interferon gamma and inducible nitric oxide synthase in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 2000;46:255-9
- Shindo M, Mullin GE, Braun-Elwert L, Bergasa NV, Jones EA, James SP. Cytokine mRNA Expression in the Liver of Patients with Primary Biliary Cirrhosis (PBC) and Chronic Hepatitis B (CHB). *Clin Exp Immunol* 1996;105:254-259.
- Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003;197:1645-55.
- Simpson KJ, Lukacs NW, Colletti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. *J Hepatol* 1997;27(6):1120-32.
- Smyth MJ, Street SE, Trapani JA. Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection. *J Immunol* 2003; 171(2):515-8.
- Somoza N, Vargas F, Roura Mir C, Vives-Pi M, Fernández-Figueras MT, Ariza A, R G, et al. Pancreas in recent onset insulin-dependent Diabetes Mellitus. *The J. Immunol.* 1994;153:1360-1376.
- Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL) - 12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817-824.

- Tai S. L., Y. F. Liaw, M. H. Chen, C. Y. Huang, and G. C. Kuo. 1997. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 25:449-458
- Tanaka A, Iwabuchi Sh, Takatori M, Ohno A, Yamada H, Hashimoto N, Ikeda Y, Kato T, Nishioka K, Iino Sh, Yamamoto K. Clonotypic analysis of T cells in patients with autoimmune and viral hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:1070-1076.
- Toyabe S., Seki S, Imai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, Hiraide H, Uchiyama M, Abo T. Requirement of IL-4 and Liver NK1+ T Cells for Concanavalin A-Induced Hepatic Injury in Mice. *J. Immunol.* 1997;159:1537-1542.
- Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 1996;272:1947-50.
- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:317-43.
- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376.
- Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994;84:4006-4027.
- Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43-9.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997;7:752-763.
- Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996;156(11):4274-9.
- Vidigal P. G., J. J. Germer, and N. N. Zein. 2002. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β 1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J. Hepatol.* 36:271-277.
- Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle

JH, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-58.

- Wilson S. B., Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA. Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998;391:177-181.
- Woitas R. P., M. Lechmann, G. Jung, R. Kaiser, T. Sauerbruch, and U. Spengler. 1997. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 159:1012-1018.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Role of HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006;203:633-645.
- Yokohama WM. Recognition structures on natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 67-73.
- Zhang M, Gong J, Presky DH, Xue W, Barnes PF. Expression of the IL-12 receptor b1 and b2 subunits in human tuberculosis. *Journal of Immunology* 1999;162:2441-2447.