

Mecanismos de evasión inmunitaria del Virus de Hepatitis C. Revisión.

Leticia Porto-Espinoza, César Cuadra-Sánchez, Reyna Moronta, Francisca Monsalve-Castillo y Diana Callejas-Valero.

Laboratorio Regional de Referencia Viroológica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: letiporto@yahoo.com

Palabras clave: Virus de Hepatitis C, evasión inmunitaria, variación genética, inmunosupresión viral.

Resumen. El virus de Hepatitis C (VHC) constituye un problema de salud pública mundial. La mayoría de las infecciones se tornan crónicas, ocasionando con frecuencia cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular a largo plazo, precisándose no pocas veces de trasplantes hepáticos para prolongar la vida del individuo. El mantenimiento de una infección crónica implica la evasión al sistema inmunitario del hospedero. Los mecanismos virales involucrados en dicha evasión están siendo estudiados arduamente con el fin de desarrollar nuevas terapias preventivas y curativas efectivas contra el virus. Una característica importante, la extrema variabilidad genética del virus, se cree que contribuya al escape inmunitario al cambiar continuamente los epítomos expuestos a la detección; sin embargo, algunos trabajos sugieren que no es necesaria para el establecimiento de la cronicidad de la infección. Por otra parte, el estudio comparativo de la respuesta inmunitaria de los pacientes que se recuperan espontáneamente con la de aquellos infectados de manera crónica, señala que algunas proteínas virales podrían inducir cierta inmunosupresión indispensable para la persistencia en el hospedero. Concretamente, se cree que las proteínas NS5A, E2 y core modulan ciertos mecanismos de las respuestas innata y específica. El análisis de los hallazgos relacionados con el tópico permite sugerir la existencia de una sinergia entre la variación genética y la inmunosupresión para evadir de manera continua la detección y destrucción por parte del sistema de defensas del individuo.

Immune evasion mechanisms of Hepatitis C virus. Review.
Invest Clín 2006; 47(1): 71 - 82

Key words: Hepatitis C virus, immune evasion, antigenic variation, viral immunosuppression.

Abstract. Hepatitis Virus C (HCV) is a major worldwide health care problem. HCV infection usually tends to become chronic and can generate long term hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. These affections frequently require a liver transplant to prolong the patients life. Maintenance of the chronic infection implies evasion of the host immune responses. Viral mechanisms involved in this evasion are being profusely studied in order to develop new and effective therapies and vaccines against HCV. An important HCV characteristic, its high genetic variability, has been proposed to contribute to immune evasion by means of antigenic change and variation. On the other hand, some studies suggest that genetic variability is not necessary to establish a chronic infection. Other studies related to immune responses in patients with spontaneous virus clearance and patients with chronic infection show a possible immunosuppression caused by some viral proteins, that may be essential to persist in the host. Specifically, it is believed that viral proteins NS5A, E2 and Core modulate some innate and specific immune mechanisms. The analysis of all data related to this topic suggests the existence of synergistic cooperation between viral variation and immunosuppression to overcome the immune defenses of the host.

Recibido: 13-02-2004. Aceptado: 26-05-2005.

INTRODUCCIÓN

El Virus de Hepatitis C (VHC) es un flavivirus que tiene una distribución mundial (1). Su hospedero natural es el hombre en el que causa, cuando la infección se cronifica, una enfermedad hepática progresiva que puede hacer necesario un trasplante de hígado (2). Los pacientes afectados crónicamente por este virus necesitan cuidados permanentes y tienen un mayor riesgo que las personas sanas de sufrir cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (3-5).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado al VHC como un problema de salud pública (6). Actualmente se encuentra infectando aproximadamente al 3% de la población mundial, es decir 170

millones de personas, de las cuales mueren 476.000 al año por complicaciones en la fase final de la enfermedad hepática crónica (7).

Específicamente en Venezuela, se ha señalado una prevalencia del 1% para la población general (8); sin embargo, en otros grupos de personas se puede conseguir al VHC con mayor frecuencia (8, 9).

El VHC es el causante del 20% de todas las hepatitis agudas y gran cantidad de los infectados (>85%) desarrolla una infección crónica (10, 11); la cual implica evasión continua del sistema inmunitario del hospedero, sin embargo, al analizar las características del ciclo de vida del VHC, se encuentran detalles atípicos en relación a otros virus generadores de infección cróni-

ca, como la ausencia de un periodo de latencia (12), por el contrario en todo momento de la infección por VHC hay producción de nuevos viriones en mayor o menor grado. Así pues, a pesar de encontrarse expuesto a la detección por el sistema inmunitario, este virus logra la mayoría de las veces perpetuarse en su hospedero (13).

Para conseguir esto, el VHC ha desarrollado todo un sistema de evasión y supresión del sistema inmunitario, que consta de sofisticados recursos, muchos de ellos no estudiados del todo (14). Sin embargo, la variabilidad genética del virus y la alteración de los patrones de respuesta inmunitaria parecen ser los dos factores que contribuyen en mayor cuantía a la generación de la cronicidad (15).

El conocimiento en detalle del ciclo biológico del VHC, especialmente de estos mecanismos de persistencia, es sumamente importante para desarrollar nuevas terapias y vacunas que puedan prevenir y controlar esta afección (16). De hecho, parte del tratamiento disponible actualmente, se basa en la potenciación del sistema inmunitario del individuo afectado mediante la administración de Interferón (17).

CARACTERÍSTICAS DEL VHC

Como en todos los virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, el genoma del VHC está compuesto por una única cadena lineal de ARN con sentido positivo (18). Ésta tiene una longitud cercana a los 9,7

Kbp (19). El ARN viral se comporta como ARN mensajero y su traducción produce un precursor poliproteico de 3000 aminoácidos aproximadamente, a partir del cual, se generan las distintas proteínas funcionales, estructurales y no estructurales, por modificación cotraduccional (12, 20).

Los genes estructurales: core (C) y envoltura (E1 y E2), están localizados en la zona próxima al extremo 5' del genoma, mientras que los genes no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) son adyacentes al extremo 3' (20). Los extremos 5' y 3' son secuencias no codificantes (UTR, *unstranlated region*) de secuencias muy conservadas entre diferentes cepas del virus (Fig. 1) (19, 21).

EL VHC se caracteriza por una gran variabilidad genética (21). Se han descrito 6 genotipos diferentes de VHC (4). Las zonas con mas variación están ubicadas en la porción aminoterminal de la proteína E2, en las zonas designadas como región hipervariable 1 y 2 (HVR1 y HVR2) (19, 20). En cada genotipo se han conseguido un número variable de subtipos, que se denominan 1a, 1b, 2a, 2b, etc. (20).

En un paciente infectado, coexisten varias formas genómicas del VHC denominadas cuasiespecies, las cuales se encuentran relacionadas entre sí pero son ligeramente diferentes en la secuencia de sus bases nitrogenadas (22). La aparición de cuasiespecies se debe a una característica de la ARN polimerasa viral, su incapacidad de corregir errores en la incorporación de nucleótidos

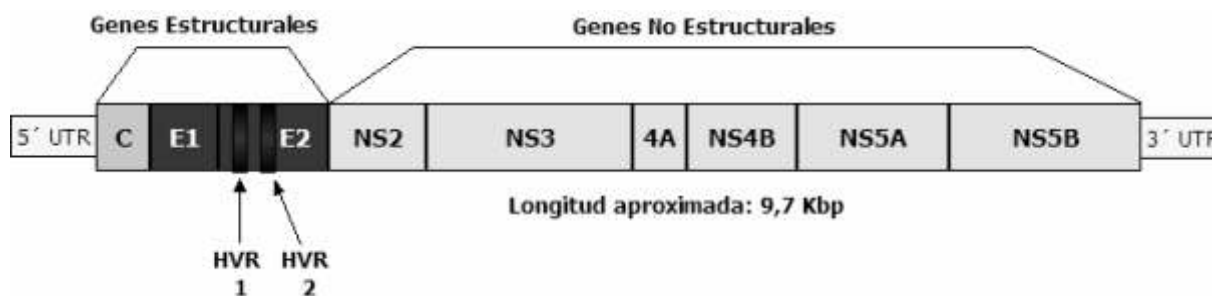


Fig. 1. Genoma del VHC.

durante el proceso de replicación, lo que facilita la aparición de mutaciones puntuales (19, 23).

MARCADORES DEL CICLO DE VIDA DEL VHC

Uno de los aspectos más relevantes del ciclo biológico del VHC es su propensión a generar una infección crónica (17). Usualmente, durante la etapa aguda de la infección, se presentan pocos síntomas y los niveles de transaminasas suben (hasta 10 veces los valores normales) (23).

En el suero de los pacientes infectados es posible detectar ARN del VHC mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de siete días posteriores a la infección (3). Los anticuerpos anti-VHC se presentan semanas después conjuntamente con el inicio de los síntomas (en caso de que aparezcan) (24). El ARN viral permanece en niveles séricos detectables mientras exista replicación, es decir, durante unas semanas en los casos de hepatitis autolimitada y de manera indefinida en los casos crónicos (25). Los títulos de anti-VHC decrecen progresivamente en los pacientes con hepatitis autolimitada y serán indetectables después de unos años. En los pacientes con hepatitis crónica perdurarán indefinidamente (21).

DIVERSIDAD GENÉTICA COMO MECANISMO DE PERSISTENCIA

Aunque los mecanismos por los cuales el VHC permanece en el hospedero causando una infección crónica no se comprenden totalmente, se ha sugerido que la variabilidad genética del virus puede jugar un papel importante en la persistencia (23, 26). Según esta hipótesis, la evolución genética del virus facilitaría que éste escape a la vigilancia del sistema inmunitario (26). En este sentido, algunos autores han demostrado

que los cambios genéticos que se van generando en el virus aparecen de manera compatible con la evasión a la respuesta inmunitaria (21).

Lógicamente, por ser la HVR1 la región con una mayor variabilidad genética, la mayoría de los estudios la han involucrado en el escape del sistema inmunitario (19, 26). Así pues, se ha comprobado que después de la aparición de anticuerpos contra la secuencia predominante de la HVR1 surge una nueva variante del VHC con una secuencia HVR1 que no es reconocida por los anticuerpos previos (21). También se conoce que los anticuerpos generados contra la secuencia dominante de la región HVR1 de un aislado del virus pueden neutralizar a la cepa mayoritaria de VHC *in vitro*, pero no a otras cepas menores con secuencias levemente diferentes presentes en el mismo aislado (23).

El escape a la respuesta inmunitaria por variación genética, no se produce solamente como consecuencia de la presión inmunitaria ejercida por anticuerpos específicos (22). Existe información sobre la aparición de mutantes de escape a la respuesta inmunitaria celular ejercida por linfocitos T citotóxicos (CTL) frente a epítomos localizados en regiones conservadas como la proteína NS3 (23).

No obstante toda esta información, la evolución genética del virus aparentemente no es el único mecanismo causante de la persistencia (19). Dos grupos de investigadores lograron construir clones infecciosos del VHC e inocularlos a chimpancés, único animal de experimentación en que el VHC es capaz de replicarse. La mayoría de los animales infectados con este virus resultaron con una infección crónica, a pesar de que el inóculo contenía una secuencia viral única sin variación (22). Además, el estudio de las secuencias nucleotídicas realizado en distintos puntos de la evolución de la infección confirmó que el VHC puede persistir

sin que aparezcan mutaciones en las regiones estructurales del genoma viral (22).

Muy sugerentes fueron los resultados que se obtuvieron tras diseñar un clon infeccioso del VHC al que se había eliminado la región hipervariable (HVR1) (22); no obstante de la gran variabilidad de esta región y de estar habitualmente involucrada en la producción de mutantes de escape, uno de los dos animales inoculados con este virus "defectuoso" desarrolló una infección permanente (23). Esto demuestra que la HVR1 no es indispensable para establecer una infección crónica (22).

RESPUESTA INMUNITARIA INSUFICIENTE

Se ha propuesto la existencia de una respuesta inmunitaria débil o insuficiente en los pacientes infectados como una de las causas principales por la cual el VHC puede permanecer en el organismo (4). Un estudio que apoya esta afirmación encontró que algunos pacientes inmunosuprimidos (Receptores de transplantes), que se infectaron con el VHC, pudieron erradicar la infección de manera espontánea independientemente de la progresión histológica, al cesar la terapia inmunosupresora (27).

Se conoce poco acerca de la respuesta innata inespecífica contra el VHC, debido a que no se cuenta con un modelo animal adecuado y a la dificultad para monitorear, los pacientes inmediatamente después de la inoculación con el virus. No obstante, existen evidencias que indican que la interacción de las proteínas virales con elementos del sistema inespecífico de defensa, juega un papel decisivo en la resolución de la enfermedad (28).

Al parecer, los niveles de una quimiocina, la Proteína inducible por Interferón γ (IP-10) producida por los hepatocitos en respuesta a la infección, son esenciales para el reclutamiento de linfocitos en el hígado y

sirven como medida predictiva del curso de la enfermedad, por lo que no es de extrañar que éste pueda ser un primer blanco de ataque o supresión por parte del VHC (29).

Además se conoce que algunas regiones virales bloquean *in vitro* las vías de inmunidad antiviral dependientes de interferón, al parecer, ciertos dominios de las proteínas codificadas por los genes NS5A (30) y E2 (23) se asocian con la proteína quinasa R (PKR), sintetizada durante la respuesta antiviral interferón dependiente. La PKR funciona interrumpiendo la síntesis celular de proteínas y por ende, la síntesis de proteínas virales (22). La unión de las proteínas derivadas de NS5A y E2 con la PKR aparentemente inhibe el efecto antiviral de dicha proteína (31-33). La NS5A además es capaz de interactuar con elementos del sistema de la quimiocinas (34).

Más recientemente, se ha descubierto que la proteína E2 puede inhibir a las células NK (28, 35) y que la proteína del core puede interactuar y modular, *in vitro*, varias vías de transducción de señal relacionadas con la respuesta innata como la Jak-Stat, la Óxido nítrico Sintetasa inducible (iNOS) (36, 37) y con el receptor para la porción Clq del complemento (38, 39), por lo que se piensa que esta proteína también pudiese ser clave para establecer una infección persistente.

En términos generales, se sabe que el VHC induce una respuesta celular policlonal de baja a moderada intensidad (40), que al parecer está relacionada con el establecimiento de la cronicidad, ya que se ha encontrado que sólo se logra eliminar la infección en aquellos pocos individuos donde las respuestas proliferativas de linfocitos CD4⁺ contra el virus son más vigorosas (2, 41).

En concordancia con lo anterior, se han encontrado algunas alteraciones funcionales en los linfocitos CD8⁺ provenientes de individuos infectados por el VHC

como: respuesta deficientemente a las citocinas antivirales y producción limitada de Interferón γ y Factor de Necrosis Tumoral (TNF) en comparación con los linfocitos activados como respuesta a otros virus (42). Esto sugiere que la acción inmunosupresora del VHC, puede ser aprovechada por otros patógenos. Existen otras evidencias que apoyan esta idea; recientemente se demostró que los linfocitos T CD8⁺ específicos contra Citomegalovirus (CMV) de los pacientes coinfectados con VHC, pierden fácilmente sus marcadores de madurez celular y expresan menos cantidad de moléculas de Fas y perforinas que los de individuos sanos (43).

Sin embargo, hay datos que señalan que la alteración de los patrones de respuesta de los linfocitos CD8⁺ es un evento posterior a la activación, ya que se ha encontrado que la respuesta inicial citotóxica es fuerte en fases muy tempranas y se va suprimiendo con el tiempo (44, 45).

En cuanto a los mediadores, parece predominar, en los individuos con infección autolimitada, un perfil de citocinas tipo T helper 1 (Th1) con producción preponderante de IL-2 e Interferón γ (4, 14, 18, 46); adicionalmente, otros trabajos, reafirman la importancia de este tipo de respuesta Th1 en el control y eliminación del VHC. Concretamente, se ha logrado la detección de linfocitos T citotóxicos reactivos contra antígenos virales en individuos o animales de experimentación que han resuelto la infección (4).

En cambio, se ha reportado la presencia de citocinas del perfil T helper 2 (Th2) como IL-4 e IL-10 en niveles moderados en el suero de pacientes afectados de manera persistente (47). Esto sugiere que al igual que muchos patógenos intracelulares el VHC podría desviar la respuesta celular hacia el patrón de citocinas Th2 en detrimento del Th1, como una estrategia que permite la subsistencia dentro del hospedero

(23). En este sentido, algunos trabajos realizados con el Virus de hepatitis B (VHB), el cual es otro virus hepatotrofo con tendencia a causar una infección crónica, señalan que es posible controlar este tipo de infección cuando la respuesta celular se dirige hacia el patrón de citocinas Th1 (48, 49).

En resumen, los datos aportados por la mayoría de las investigaciones, señalan que los pacientes con infecciones autocontroladas presentan respuestas inmunitarias contra el virus mucho más intensas que las de aquellos en los que el virus persiste (41). Desafortunadamente, no se sabe si esta diferencia es la causante de la cronicidad o una consecuencia de ella, aunque recientemente se ha publicado información que demuestra que el VHC puede infectar células del sistema inmunitario como Macrófagos, Linfocitos B y T, alterando los patrones de respuesta de dichas células, permitiendo así la persistencia del virus (50).

En este sentido, un factor importante en la aparición de una respuesta celular débil podría ser la activación anormal de linfocitos T CD4⁺. Se ha demostrado que la expresión de antígenos estructurales del VHC en células dendríticas, alteran el proceso de presentación antigénica, generando una activación incompleta de linfocitos T CD4⁺ específicos contra el VHC (51).

Otros trabajos sugieren una causa genética como la responsable de la baja respuesta celular (52, 53), ya que existe un grupo de pacientes que tiene una alta tasa de eliminación espontánea de la infección, aquellos con genes de HLA específicos (DRB1*1101 y/o DQ1*0301). Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (CMH I) que exhiben dichos pacientes pueden alojar a los péptidos virales claves para una efectiva activación celular (46). Por otra parte, no existen evidencias que demuestren que el VHC interfiera con la expresión de las moléculas de CMH I en las células (54).

Novedosos estudios en chimpancés complican más el panorama. En dichos ensayos, no fue necesaria una respuesta inmunitaria celular vigorosa contra el VHC para lograr la resolución de la viremia, por lo que los autores sugieren que otros mecanismos inmunitarios son los responsables del control de la infección (55).

En lo que respecta a la inmunidad humoral, la aparición precoz de anticuerpos neutralizantes contra el VHC pareciese desempeñar un rol valioso en la resolución de la infección, tal y como ocurre en gran cantidad de infecciones virales (14). En una investigación utilizando anticuerpos aislados a partir de plasma de donantes anti-VHC positivos, se trataron varios chimpancés a los cuales se les había inoculado previamente el virus y se pudo verificar que ninguno de los chimpancés tratados mostró síntomas de hepatitis aguda y el ARN viral desapareció de circulación rápidamente (22).

Así mismo, recientemente se encontró que la proteína E2 de la envoltura viral es capaz de unirse a varios receptores presentes en la superficie del hepatocito como el CD 81, el receptor humano para detritos clase B tipo 1 y el heparan sulfato, de una manera no competitiva, utilizando diferentes dominios de su estructura para asegurar la interacción con la célula. Así pues, la neutralización de uno o incluso varios dominios de la E2, no impediría que ésta logre unirse a otro receptor en el hepatocito e iniciar la infección (56).

Algunos trabajos en pacientes normales y con agammaglobulinemia, infectados por el VHC, han demostrado que no es necesaria la aparición de una respuesta de anticuerpos específica para eliminar el virus. El desarrollo de una inmunidad celular vigorosa y precoz contra el virus basta por sí sola para erradicar la infección (21, 57). Incluso se ha demostrado que la erradicación de la viremia puede ocurrir en indivi-

duos normales sin que éstos se vuelvan seropositivos (57).

En conclusión, el papel de los anticuerpos en la evolución de la enfermedad no está claro.

OTROS MECANISMOS QUE PUEDEN CONTRIBUIR A LA PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN

Hay una investigación que indica que la región HVR1 pudiera servir de "señuelo", captando la atención del sistema inmunitario en menoscabo de otras regiones antigénicas que podrían ser más importantes (22).

En un trabajo llevado a cabo en la etapa aguda de la infección, se encontró, en los individuos con infección crónica, una gran cantidad de mutaciones no sinónimas (que generan un cambio de aminoácido) en la HVR1 pero no en la región que codifica la proteína de envoltura E1 (22). Mientras que en pacientes en los que la infección se autolimitó, las mutaciones no sinónimas se concentraban en la proteína E1 y no en la HVR1. Tomando la aparición de mutaciones no sinónimas como una determinación indirecta de la presión inmunitaria que se realiza sobre una región específica (22), es plausible pensar que la presión del sistema inmunitario sobre la HVR1 no fuera relevante y sólo se tratase de un mecanismo viral para apartar la presión sobre otras regiones (14).

Se ha descrito otro mecanismo de evasión de la acción del interferón por parte del genotipo 1a y 1b del VHC. Existe una enzima celular, la ARNasa L, cuya acción está regulada por el interferón, que corta el ARNm del VHC en los puntos AU-UU, impidiendo la traducción de las proteínas virales. Para evadir esta amenaza, los genotipos 1a y 1b han acumulado mutaciones silentes (que no afectan el producto proteico) eliminando muchos puntos AU y UU de sus se-

cuencias en relación a otros genotipos como el 2 y 3. Esta podría ser la razón principal de porqué estos genotipos (1a y 1b) son generalmente refractarios a la terapia con interferón y de mal pronóstico (58).

Últimamente, se han enfocado muchas investigaciones a develar el papel biológico de la proteína del core, que constituye la primera proteína del virus en expresarse y circular en el torrente sanguíneo de los pacientes infectados (20). En este sentido se han encontrado *in vitro* muchos hechos interesantes como: Esta proteína inhibe la respuesta proliferativa de Linfocitos T a través de la interacción con el receptor de complemento que éstos presentan, alterando la señalización que activa la producción de IL-2 (39).

La proteína del core, evitaría la muerte por apoptosis mediada por TNF- α de células hepáticas infectadas por el VHC, interrumpiendo la señalización interna de este evento (59). La proteína NS2 también parece estar implicada en este proceso uniéndose e inhibiendo al CIDE-B, un factor mediador de apoptosis descubierto recientemente (60).

Esta proteína del puede escapar al sistema inmunitario por mimetismo molecular, ya que muestra cierta homología en su secuencia con el citocromo p450 humano, contribuyendo a la persistencia de la infección y/o generando efectos patológicos (Hepatitis autoinmune) por autorreactividad inducida por el virus (61). El mimetismo molecular de la proteína corrobora algunos estudios en modelos murinos donde esta proteína parece estar implicada en la supresión de la respuesta inmunitaria contra un virus quimérico (Vaccinia/VHC) recombinante (62).

Sin embargo, otros estudios arrojan resultados contradictorios. Ratones transgénicos que expresaban proteína del core y de la envoltura del VHC en células hepáticas, respondieron y resolvieron la infección de

Adenovirus hepatotropos de manera muy similar. Los niveles de IgG, IL-2 y TNF- α en estos animales fueron semejantes, por los que los autores sugieren que los mecanismos de persistencia del VHC, no están relacionados con una profunda inmunosupresión generada por proteínas estructurales (63).

CONCLUSIÓN

A pesar de todas las investigaciones realizadas sobre los mecanismos de evasión inmunitaria por parte del VHC, todavía no está claro cuál es el mecanismo principal que permite la cronicidad de la infección. Al respecto, se han descrito muchos procesos y prácticamente a todas las proteínas virales se le atribuye, por lo menos *in vitro*, alguna función evasiva.

Es un hecho que la variabilidad genética en muchos patógenos, es un mecanismo importante de escape al reconocimiento y destrucción por parte del hospedero. El VHC presenta zonas altamente variables en su superficie, que teóricamente, deben contribuir a permanecer en el organismo; sin embargo, también se ha señalado cierta inmunosupresión causada por el virus. Lógicamente, estos dos mecanismos podrían actuar sinérgicamente. Un sistema tan complejo y adaptable como el sistema inmunitario humano, no puede ser confundido mediante un solo proceso o por la inhibición de un mecanismo de reconocimiento/efector; se necesita toda una batería de sofisticados recursos para evadirlo por un tiempo indefinido como lo hace el VHC.

Hasta que no se descifre el enigma que representa el escape de la respuesta inmunitaria por parte del VHC, no se podrán crear mejores inmunoterapias y/o una vacuna efectiva, mientras la salud de muchas personas a nivel nacional y mundial, infectadas por este virus, seguirá perjudicada severamente.

REFERENCIAS

1. Uriz J, Briz R. Natural history of hepatitis C virus infection. *An Sist Sanit Navar* 2004; 27(2):51-58.
2. Yao F, Terrault N. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2(6):473-483.
3. Ramos-Gómez M. Historia natural de la hepatitis crónica C. *Rev Gastroenter* 2002; 67(2):S17-S20.
4. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345(1):41-52.
5. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 34(4 Pt 1):809-816.
6. Kenny-Walsh E. The natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001; 5(4):969-77.
7. Polyak SJ. Hepatitis C virus-cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin Liver Dis* 2003; 7(1):67-88.
8. Aguilar MS, Cosson C, Loureiro CL, Devesa M, Martinez J, Villegas L, Flores J, Ludert JE, Alarcon- Noya B, Noya O, Liprandi F, Pujol FH. Prevalence of infection with hepatitis C virus in Venezuela, as assessed with an immuno-assay based on synthetic peptides. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95(2):187-195.
9. Arteaga-Vizcaino M, Blitz-Dorfman L, Echeverria JM, Leon P, Weir-Medina J, Diez-Ewald M, Vizcaino G, Torres E, Porto-Espinoza L. Hepatitis C in hemophiliac patients in Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin* 1993; 34(3):113-118.
10. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. 7th ed. [CD-ROM]. Philadelphia: Saunders; 2002.
11. Dore GJ, Freeman AJ, Law M, Kaldor JM. Is severe liver disease a common outcome for people with chronic hepatitis C? *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(4):423-430.
12. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. [CD-ROM]. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.
13. Valiante NM, D'Andrea A, Crotta S, Lechner F, Klenerman P, Nuti S, Wack A, Abrignani S. Life, activation and death of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C. *Immunol Rev* 2000; 174:77-89.
14. Alvarado-Esquivel C, Leroux-Roels G. *Inmunología de la hepatitis C*. *Rev Invest Clin* 1999; 51(5):315-322.
15. Dore GJ, Freeman AJ, Kaldor JM. Immunity against hepatitis C virus infection. *Lancet* 2002; 360(9338):1019-20; author reply 1020-1021.
16. Weiner AJ, Paliard X, Selby MJ, Medina-Selby A, Coit D, Nguyen S, Kansopon J, Arian CL, Ng P, Tucker J, Lee CT, Polakos NK, Han J, Wong S, Lu HH, Rosenberg S, Brasky KM, Chien D, Kuo G, Houghton M. Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers cross-protective immunity. *J Virol* 2001; 75(15):7142-7148.
17. Lara-Ceniceros M, Godínez-Hernández F, Aillaud-González L, Mejía A. Hepatitis C. *Med Int Mex* 2003; 19(5):311-318.
18. Bonkovsky HL, Mehta S. Hepatitis C: a review and update. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44(2):159-182.
19. Rivas-Estilla A, Panduro A. Mecanismos moleculares del virus de la hepatitis C, potenciales blancos terapéuticos. *Rev Invest Clin* 2003; 55(1):51-64.
20. Álvarez M, Gómez I. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. *Rev Biomed* 2003; 14(4):253-268.
21. Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000; 6(4):396-406.
22. Forns X. Molecular biology of hepatitis C virus: implications for the development of new therapies and prophylactic vaccine. *Med Clin (Barc)* 2001; 116(5):191-197.
23. Freeman AJ, Marinos G, Ffrench RA, Lloyd AR. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001; 79(6):515-536.

24. Montaña-Loza A, Meza-Junco J, Remes-Troche J. Patogénesis de la infección por virus de hepatitis C. *Rev Invest Clin* 2001; 53(6):561-568.
25. Terrés-Speziale AM. Hepatitis C. Historia natural y estado actual de su manejo. *Rev Mex Patol Clin* 2003; 50(4):179-189.
26. Hahn YS. Subversion of immune responses by hepatitis C virus: immunomodulatory strategies beyond evasion? *Curr Opin Immunol* 2003; 15(4):443-449.
27. Somsouk M, Lauer GM, Casson D, Terella A, Day CL, Walker BD, Chung RT. Spontaneous resolution of chronic hepatitis C virus disease after withdrawal of immunosuppression. *Gastroenterology* 2003; 124(7):1946-1949.
28. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003; 7(1):89-105.
29. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74(3):360-369.
30. Gale M, Jr., Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999; 73(8):6506-6516.
31. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):778-809.
32. Polyak SJ, Paschal DM, McArdle S, Gale MJ, Jr., Moradpour D, Gretch DR. Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* 1999; 29(4):1262-1271.
33. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Katze MG. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 1998; 10(2-3):157-162.
34. Khabar KS, Polyak SJ. Hepatitis C virus-host interactions: the NS5A protein and the interferon/chemokine systems. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22(10):1005-1012.
35. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002; 195(1):35-41.
36. Miller K, McArdle S, Gale MJ, Jr., Geller DA, Tenover B, Hiscott J, Gretch DR, Polyak SJ. Effects of the hepatitis C virus core protein on innate cellular defense pathways. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24(7):391-402.
37. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 202(2):149-156.
38. Yao ZQ, Ray S, Eisen-Vandervelde A, Waggoner S, Hahn YS. Hepatitis C virus: immunosuppression by complement regulatory pathway. *Viral Immunol* 2001; 14(4):277-295.
39. Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001; 167(9):5264-5272.
40. Barnes E, Lauer G, Walker B, Klenerman P. T cell failure in hepatitis C virus infection. *Viral Immunol* 2002; 15(2):285-293.
41. 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(9):1499-1512.
42. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001; 75(12):5550-5558.
43. Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, Klenerman P. Pervasive in-

- fluence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2004; 172(3):1744-1753.
44. Lechner F, Sullivan J, Spiegel H, Nixon DF, Ferrari B, Davis A, Borkowsky B, Pollack H, Barnes E, Dusheiko G, Klenerman P. Why do cytotoxic T lymphocytes fail to eliminate hepatitis C virus? Lessons from studies using major histocompatibility complex class I peptide tetramers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000; 355(1400):1085-1092.
 45. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. CD8⁺ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 2000; 30(9):2479-2487.
 46. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol* 2002; 128(2): 195-203.
 47. Reiser M, Marousis CG, Nelson DR, Lauer G, Gonzalez-Peralta RP, Davis GL, Lau JY. Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1997; 26(3): 471-478.
 48. Monsalve-De Castillo F, Romero TA, Estevez J, Costa LL, Atencio R, Porto-Espinoza L, Callejas D. Concentrations of cytokines, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD30 in sera of patients with hepatitis B virus infection during acute and convalescent phases. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(6):1372-1375.
 49. Monsalve F, Romero AT, Estevez J, Costa L, Callejas D. Serum levels of soluble CD30 molecule in hepatitis B virus infection. *Rev Med Chil* 2001; 129(11):1248-1252.
 50. Soguero C, Joo M, Chianese-Bullock KA, Nguyen DT, Tung K, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein leads to immune suppression and liver damage in a transgenic murine model. *J Virol* 2002; 76(18):9345-9354.
 51. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 2002; 76(10):5062-5070.
 52. Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, Nguyen TN, Day CL, Purkis DR, Reiser M, Kim AY, Lucas M, Klenerman P, Walker BD. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 2002; 76(12):6104-6113.
 53. Nelson DR. The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001; 5(4):931-953.
 54. Moradpour D, Grabscheid B, Kammer AR, Schmidtke G, Groettrup M, Blum HE, Cerny A. Expression of hepatitis C virus proteins does not interfere with major histocompatibility complex class I processing and presentation in vitro. *Hepatology* 2001; 33(5):1282-1287.
 55. Thomson M, Nascimbeni M, Havert MB, Major M, Gonzales S, Alter H, Feinstone SM, Murthy KK, Rehmann B, Liang TJ. The clearance of hepatitis C virus infection in chimpanzees may not necessarily correlate with the appearance of acquired immunity. *J Virol* 2003; 77(2):862-870.
 56. Heo TH, Chang JH, Lee JW, Fong SK, Dubuisson J, Kang CY. Incomplete humoral immunity against hepatitis C virus is linked with distinct recognition of putative multiple receptors by E2 envelope glycoprotein. *J Immunol* 2004; 173(1): 446-455.
 57. Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, Haber PS, Marinos G, Levy MH, Kaldor JM, Dolan KA, Ffrench RA, Lloyd AR, Rawlinson WD. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis* 2004; 189(10): 1846-1855.
 58. Han JQ, Barton DJ. Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate

- synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. 2002; 8(4):512-525.
59. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998; 273(4):2256-2259.
 60. Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, Hibner U, Guguen-Guillouzo C. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278(20):18256-18264.
 61. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, Cerny A. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *J Exp Med* 1999; 190(2):169-176.
 62. Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 1999; 162(2):931-938.
 63. Sun J, Bodola F, Fan X, Irshad H, Soong L, Lemon SM, Chan TS. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001; 75(24):11992-11998.