

---

## Estudio de la respuesta inmune en la infección por el virus de la hepatitis C

### *Study of immune response in infection by the hepatitis C virus*

---

F. Borrás-Cuesta, P. Sarobe, J.J. Lasarte, M. García-Granero, J. Golvano, J. Prieto

---

#### INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC) ha sido reconocido como uno de los principales agentes causantes de las hepatitis crónicas y enfermedades hepáticas en todo el mundo y afecta aproximadamente al 1% de la población mundial<sup>1,3</sup>. En un estudio realizado en Navarra en 1990, cuando ya se había implantado la detección rutinaria del VHC en los bancos de sangre, sobre 90 pacientes transfundidos, se encontró una incidencia de esta enfermedad del 3,3% y se calcula que en el total de la población de Navarra, la incidencia es 0,88%<sup>4</sup>.

El VHC es un virus RNA cuyo genoma codifica para una poliproteína precursora de 3.011 aminoácidos que tras sufrir un procesamiento genera una serie de proteínas que, por analogía con los flavivirus y pestivirus se han clasificado en proteínas estructurales (core, envuelta o E1 y NS2/E2) y no estructurales (NS2, NS3, NS4 y NS5). Los péptidos sintéticos o proteínas recombinantes que representan diferentes

regiones de estas proteínas han sido utilizados en el desarrollo de sistemas de inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos anti HCV<sup>3,5</sup>. Basados en estos ensayos serológicos se ha identificado al HCV como el principal agente causante de las hepatitis noA noB.

El HCV causa infección persistente en la mayoría de los casos y conlleva el desarrollo de hepatitis crónica y cirrosis hepática en aproximadamente el 70% y 20% de los casos respectivamente. Una significativa proporción de los pacientes con cirrosis hepática desarrollará además un carcinoma hepatocelular primario<sup>6,7</sup>.

El único tratamiento eficaz de la hepatitis crónica C es el interferón alfa (IFN $\alpha$ ). La respuesta sostenida al IFN $\alpha$  se da en el 25% de los pacientes tratados, con normalización de las transaminasas y eliminación del virus de la sangre. El otro 75% de los tratados, o bien no responde al tratamiento, o bien responde transitoriamente (con reactivación de la enfermedad al sus-

---

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 21-31.

Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

#### Correspondencia:

Prof. J. Prieto  
Departamento de Medicina Interna  
Facultad de Medicina  
31080 Pamplona  
Tfno. 948 296785  
Fax 948 296785  
e-mail: jprieto@unav.es

penderlo: respuesta con recidiva)<sup>8,9</sup>. Esto, unido a las graves consecuencias de la hepatitis C crónica, hace que sea imprescindible el desarrollo de una vacuna para prevenir y tratar esta enfermedad. Una de las estrategias para el desarrollo de vacunas consiste en la inducción de una respuesta inmune antiviral que sea capaz de impedir la infección y/o de controlar su replicación.

La respuesta inmune celular es esencial en la eliminación de las células infectadas. En ella intervienen dos tipos celulares, los linfocitos T citotóxicos (LTC) y los linfocitos T ayudadores (LTA). Los LTC son capaces de lisar las células infectadas, por lo que intervienen en el control y eliminación del virus así como en el daño hepático que se produce en la hepatitis crónica. Las células infectadas presentan en la superficie, péptidos de 8 a 9 aminoácidos derivados de proteínas virales denominados determinantes T citotóxicos (DTC), unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMHI)<sup>10,11</sup>. Para la activación de los LTC es necesaria la ayuda suministrada por los linfocitos T ayudadores (LTA) que a su vez son activados por el reconocimiento en las células presentadoras de antígeno (CPA)<sup>12,13</sup> de péptidos de 13 a 16 aminoácidos derivados de las proteínas virales y denominados determinantes T ayudadores (DTA), en asociación con moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II).

Los DTC y DTA de antígenos virales pueden ser estudiados mediante bioensayos de citotoxicidad y proliferación respectivamente, utilizando células mononucleares de sangre periférica de individuos infectados por el virus. El estudio comparativo de la respuesta inmune contra el virus en individuos que se han repuesto de la infección y en los individuos portadores crónicos (incapaces de eliminar el virus), podría evidenciar el papel que juega la inmunidad celular y/o humoral en la patogénesis de la infección por el VHC así como en el desarrollo de la enfermedad. Los DTC y DTA identificados serían candidatos para la elaboración de vacunas basadas en péptidos sintéticos. En este campo, nuestro equipo ha desarrollado metodolo-

gías para la inducción de anticuerpos usando péptidos sintéticos que contienen DTA y antígenos virales<sup>14-16</sup> y demostrado que, contruidos peptídicos del tipo DTC-DTA permiten inducir "in vivo" LTC específicos para un determinado antígeno<sup>17</sup>.

Como los DTC y los DTA presentan restricción por las moléculas del CMH, creemos que uno de los puntos fundamentales es conocer la influencia que pueden tener los diferentes alelos del CMH de los diferentes individuos en la respuesta inmune contra el virus e identificar qué secuencias peptídicas son reconocidas por los diferentes tipos de moléculas del CMH. Este estudio es necesario para la elección de aquellos péptidos que son reconocidos por el mayor número posible de individuos, con vistas al diseño de posibles vacunas sintéticas contra la infección por el VHC.

Por ello, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos: (i) estudiar las interacciones de los péptidos de las proteínas del virus de la hepatitis C (VHC) con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de tipo II; (ii) identificar los determinantes T ayudadores presentes en las proteínas core, E1, E2 y NS4a del VHC mediante bioensayos de proliferación utilizando células de sangre periférica de pacientes infectados por VHC; (iii) estudiar el papel de la respuesta inmune contra las proteínas del VHC en el aclaramiento viral y la curación de la enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados por el método de fase sólida de Merrifield<sup>18</sup> usando la alternativa Fmoc<sup>19</sup>. La síntesis se realizó un sintetizador usando manual múltiple<sup>20</sup>. Al final de la síntesis los péptidos fueron cortados de la resina, desprotegidos de los grupos de las cadenas laterales y lavados 6 veces por precipitación con dietil éter.

### Ensayos de unión a moléculas DR del CMH

Para el estudio de identificación de los DTA se ha puesto a punto un ensayo de

unión de péptidos al CMH-II en la superficie de células vivas usando péptidos biotinilados y diferentes líneas celulares B humanas. Para ello se tomaron  $3,5 \times 10^7$  células de diferentes líneas de linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr (EBV-BLCL) y se incubaron con el péptido biotinilado HA306-320 ( $40 \mu\text{M}$ ) como sigue: Mezclamos  $50 \mu\text{l}$  de medio de cultivo completo que contenía las células y  $150 \mu\text{l}$  de buffer fosfato salino (PBS) que contenía el péptido biotinilado y el péptido problema. La mezcla fue incubada durante 20 horas a  $37^\circ\text{C}$  y con un  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Posteriormente se realizaron dos lavados de las células con  $2 \text{ ml}$  de PBS/ $0,1\%$  BSA, se resuspendieron en  $5 \mu\text{g/ml}$  de conjugado estreptavidina-fluoresceína (Pierce) y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Se lavaron de nuevo las células por dos veces con  $2 \text{ ml}$  de PBS/ $0,1\%$  BSA. Se resuspendieron las células en  $300 \mu\text{l}$  de PBS/ $0,1\%$  BSA y la fluorescencia de la superficie celular fue medida por citometría de flujo con un analizador FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA). Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células marcadas. Las células muertas fueron excluidas por análisis con tinción con yoduro de propidio ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). El ruido de fondo se midió como anteriormente en la ausencia de péptido biotinilado. Este valor fue restado de todas las determinaciones. Los resultados se expresaron como fluorescencia media (unidades arbitrarias)  $\pm$  SEM calculada de 2-3 experimentos independientes. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Para compensar las diferencias en la diferente expresión de HLA-DR entre las diferentes líneas celulares, se dividió la fluorescencia obtenida con el péptido biotinilado por la fluorescencia obtenida tras la tinción de la línea concreta con un exceso de anticuerpo monoclonal L243 conjugado a fluoresceína. La especificidad del ensayo se demostró por inhibición de la unión utilizando anticuerpos monoclonales anti-DR, anti-DP, anti-DQ y anti-CMH de clase I por competición con péptido HA306-320 sin biotinilar.

En los ensayos de inhibición las líneas EBV-BLCL fueron co-incubadas con el péptido biotinilado ( $40 \mu\text{M}$ ) y/o anticuerpo

monoclonal (dilución 1:500 del líquido ascítico). Los resultados se expresaron como la media aritmética del porcentaje de la señal de inhibición  $\pm$  SEM calculada de ensayos realizados por triplicado. Para los ensayos de competición, las líneas EBV-BLCL fueron co-incubadas durante 4 horas con el péptido biotinilado HA306-320 ( $10 \mu\text{M}$ ) y el péptido no biotinilado HA306-320 ( $150 \mu\text{M}$ ) o con el péptido biotinilado HA306-320 ( $10 \mu\text{M}$ ) y el péptido ensayado ( $150 \mu\text{M}$ ). La capacidad inhibitoria relativa (RI%) de los péptidos de la proteína de la nucleocápside del VHC fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{RI}\% = (\text{señal de inhibición con el péptido ensayado} / \text{señal de inhibición con el péptido HA306-320 sin biotinilar}) \times 100.$$

Las intensidades de fluorescencia de las muestras estuvieron siempre entre el  $5\%$  de la media y el  $10\%$ . Sólo se consideraron aquellas RI% en los que la señal de inhibición con el péptido ensayado fue inferior al control negativo menos 3 veces la SEM.

#### Estudio de la respuesta T ayudadora

A partir de  $30 \text{ ml}$  de sangre periférica de los pacientes se extrajeron las células mononucleares (CMSP) mediante un gradiente de Ficoll. Después de tres lavados con suero salino, las CMSP se resuspendieron en medio completo (RPMI 1640 con  $10\%$  de suero humano AB y  $1\%$  PS). Las células se contaron y se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. Se añadió  $100 \mu\text{l}$  de la suspensión de células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano ( $2 \times 10^5$  células por pocillo). Los péptidos se añadieron por triplicado a  $50 \mu\text{g/ml}$  en un volumen de  $100 \mu\text{l}$  (concentración final  $25 \mu\text{g/ml}$ ) y este ensayo se realizó por triplicado. Como control positivo se utilizó fitohemaglutinina ( $10 \mu\text{g/ml}$ ). Se añadió además a cada pocillo  $2 \mu\text{g}$  ( $10 \mu\text{g/ml}$  concentración final) de un anticuerpo monoclonal anti-receptor humano de IL-2 (BT563, Biotest Pharma) para impedir que la IL-2 producida fuese consumida por los propios linfocitos. Tras 7 días de cultivo en incubador a  $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ , se recogieron  $50 \mu\text{l}$  de sobrenadante del medio de cultivo de los pocillos y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  en placas de 96



Como puede observarse, existen tres zonas de la secuencia que presentan gran capacidad de unión a la mayoría de las moléculas DR de las líneas celulares ensayadas. Por otro lado se ha observado que el tiempo de retención de los péptidos en la columna de HPLC (una medida de su hidrofobicidad) está directamente relacionada con la capacidad de unión de los péptidos al CMH (datos no mostrados).

#### **Caracterización de los determinantes T ayudadores en la proteína del core del VHC utilizando linfocitos de sangre periférica de los pacientes infectados**

Paralelamente a la caracterización de aquellos péptidos que pueden unirse al CMH se seleccionaron diferentes grupos de pacientes en distintos momentos de la infección por VHC. Por un lado se agruparon a aquellos pacientes que tras el tratamiento con IFN habían superado la enfermedad, presentando una viremia negativa en suero determinada por PCR al menos 6 meses después de finalizado el tratamiento. Un segundo grupo contenía aquellos pacientes que durante el tratamiento habían normalizado los valores de transaminasas, pero que al finalizar el mismo presentaban de nuevo una reactivación de la enfermedad. En el tercer grupo se encontraban aquellos pacientes que nunca habían sido sometidos a tratamiento con IFN. Se estudiaron aquellos pacientes con hepatitis crónica C, que no presentaban respuesta al tratamiento y persistían en su estado de infección crónica y finalmente se estudió un grupo de donantes sanos como grupo control.

Una vez seleccionados los sujetos de estudio, se extrajeron las células de sangre periférica de cada uno de ellos y se enfrentaron al panel de 51 péptidos anteriormente descrito. A continuación se midió, mediante un bioensayo, la cantidad de Interleukina 2 (IL-2) producida en cada uno de los casos, como un valor del grado de activación de los linfocitos T. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 2A. Como puede verse existen unas diferencias graduales

en la respuesta de cada uno de los grupos frente al panel de péptidos, siendo el grupo de individuos curados aquel que presenta un mayor grado de respuesta, mientras que el grupo de pacientes que no respondieron al tratamiento apenas registraron respuesta a los péptidos. Con valores de respuesta intermedios se encuentra el grupo de pacientes que recidivaron al finalizar el tratamiento y el grupo de individuos nunca tratados. Los donantes usados como controles negativos no presentaron generalmente respuesta a los péptidos indicando la especificidad de las respuestas observadas contra las proteínas virales.

Cuando analizamos la respuesta a los diferentes péptidos observamos que algunos de ellos aparecían preferentemente en el grupo de pacientes que habían respondido al tratamiento con IFN y eliminado el virus. Se realizó un análisis estadístico y se observó que los péptidos c99-112, c132-145, c141-154, c146-159 y c160-173 aparecían asociados significativamente a la respuesta al tratamiento (Tabla 1).

#### **Caracterización de los determinantes T ayudadores en la proteínas E1 del VHC utilizando linfocitos de sangre periférica de los pacientes infectados**

Además de los estudios realizados para caracterizar las respuesta inmune frente a péptidos de la nucleoproteína del VHC, también se realizaron estudios para caracterizar esta respuesta frente a la glicoproteína de la envuelta E1. Para ello, se sintetizaron 72 péptidos de 15 aminoácidos que cubrían la totalidad de la secuencia de esta proteína, tanto de la secuencia correspondiente al genotipo la como al genotipo 1b.

Del mismo modo que en el caso anterior se seleccionaron grupos equivalentes de pacientes en diferentes fases de la infección. Los resultados obtenidos en estos grupos de pacientes se muestran en la figura 2B. Análogamente a los resultados obtenidos frente a la proteína de la nucleocápside, el grupo de pacientes que curaron tras el tratamiento con IFN es aquel que presenta una mayor res-

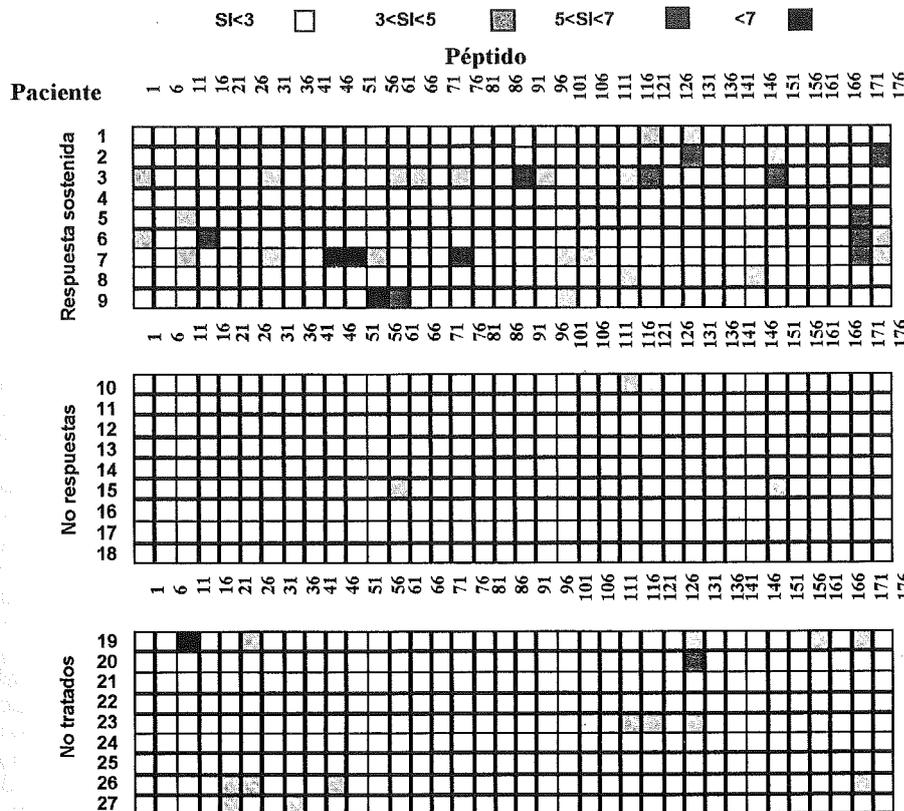


**Tabla 1.** Péptidos del core del VHC asociados a respuesta sostenida.

Grupo	Péptidos				
	c99-112	c132-145	c141-154	c146-159	c160-173
Respuesta sostenida	7/11	6/11	4/11	6/11	7/11
Respuesta con recidiva	1/12	2/12	0/12	2/12	2/12
No respuesta	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10
p (RS vs RR+NR)	<0,001	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01

puesta frente a los péptidos (88%), contrariamente a los pacientes que no habían respondido al tratamiento, que apenas reconocen a alguno de los péptidos (22%). Por otro lado, en una situación

intermedia se encuentran los pacientes que no habían recibido tratamiento, que muestran una respuesta en un 55% de los casos.



**Figura 2. (B)** Producción de IL-2, por los LT de pacientes y controles frente a péptidos de la proteína E1 de VHC.

### **Caracterización de los determinantes T ayudadores en la proteína E2 y NS4a del VHC utilizando linfocitos de sangre periférica de los pacientes infectados**

De forma similar a los casos anteriores se estudió la respuesta dirigida contra la proteína de la envuelta E2 y la proteína no estructural NS4. De la misma manera, se establecieron tres grupos. El primer grupo formado por 26 pacientes que presentaban una respuesta sostenida al tratamiento con IFN con transaminasas normales y viremia negativa durante al menos un año después de abandonar el tratamiento; otro grupo de 27 pacientes que no respondieron al tratamiento con IFN, que se mantenían con valores elevados de transaminasas y viremia positiva, y 28 pacientes que no habían recibido tratamiento. También se incluyó un grupo de 21 individuos como controles sanos.

Se sintetizaron 39 péptidos de la proteína NS4a correspondientes al genotipo 1a y se analizó la capacidad de inducir la producción de IL-2 a las células de sangre periférica de los diferentes pacientes. La respuesta frente a los péptidos en los diferentes grupos fue como sigue: Ocho de doce (66%) pacientes del primer grupo reconocieron péptidos de NS4a. Del total de péptidos ensayados, 23 fueron reconocidos por los pacientes (58%). En el segundo grupo, 9 de 14 pacientes (64%) mostraron respuestas positivas contra el panel de péptidos. Estos reconocieron 18 péptidos del panel (64%). Finalmente, en el grupo de pacientes no tratados, 9 de 14 (64%) respondieron a los péptidos. Aquí, un total de 27 péptidos del panel fueron reconocidos por los pacientes.

En la segunda parte de estos experimentos, estudiamos la respuesta celular T contra un panel de 42 péptidos pertenecientes a la proteína E2 del VHC que cubrían los primeros 220 aminoácidos de la proteína. La secuencia de aminoácidos corresponde al mismo aislado usado para los péptidos de NS4a. Ninguno de los controles sanos (seronegativos) dio una respuesta positiva contra los péptidos de E2. La respuesta contra los péptidos de E2 en los tres grupos

seleccionados fue la siguiente: diez de 14 pacientes respondedores al tratamiento con IFN (71%), mientras que solamente 2 de los 13 pacientes correspondientes al segundo grupo (16%) (no respondedores al tratamiento) presentaron respuesta frente a los péptidos. El grupo de pacientes no tratados mostró respuestas positivas en 6 de los 14 pacientes estudiados (42%).

### **DISCUSIÓN**

La caracterización de la respuesta inmune celular frente a los antígenos del virus de la hepatitis C es necesaria para la comprensión de la patogenia de la enfermedad y para el desarrollo de vacunas y terapias. En este trabajo, se han sintetizado más de 200 péptidos derivados de las proteínas core, E1, E2 y NS4a, y se ha estudiado la respuesta inmune T ayudadora presente en los diferentes grupos de pacientes. Se ha observado que la respuesta T ayudadora frente a los péptidos sintéticos de las proteínas core, E1 y E2 se asocia con la curación de la enfermedad y con el aclaramiento del virus, mientras que la respuesta frente a la proteína NS4a no parece ser tan importante.

Este trabajo ha permitido poner en evidencia qué zonas de las proteínas del virus podrían ser incluidas en el desarrollo de vacunas sintéticas capaces de inducir una respuesta inmune celular antiviral que fuera capaz de controlar la infección. Además, podrían plantearse terapias alternativas al IFN para el tratamiento de la enfermedad crónica, pues como se ha observado, el tratamiento con IFN parece mejorar la respuesta inmune frente a estos péptidos. Así, podrían desarrollarse tratamientos alternativos basados en la inmunización de los pacientes mediante un grupo de péptidos sintéticos seleccionados en base a su capacidad para ser reconocidos por el mayor número posible de individuos o que pertenezcan a secuencias conservadas dentro del virus. Así, en el caso de la proteína del core, los péptidos c99-112, c132-145, c141-154, c146-159 y c160-173 se encuentran asociados a la respuesta sostenida. Esto, unido a su alto grado de

conservación, los hace candidatos a formar parte de una posible vacuna sintética contra el VHC.

La estrategia de desarrollo de vacunas con más éxito empleada hasta ahora se basa en la imitación más exacta posible de la infección natural, por eso se emplean sobre todo vacunas vivas atenuadas. Sin embargo, esta estrategia se basa en la premisa de que la infección natural lleva al desarrollo de inmunidad protectora de larga duración. Muchas de las infecciones para las que no se ha desarrollado una vacuna eficaz son aquellas en las que esa premisa no se cumple, como es el caso de las infecciones parasitarias o virales en las que las infecciones recurrentes no son impedidas por una infección anterior, como es el caso de la malaria, la hepatitis C, o la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, en el que la infección lleva casi invariablemente al desarrollo de SIDA y la muerte del individuo. Otro problema a tener en cuenta en el desarrollo de vacunas, es la identificación y eliminación de zonas de las proteínas virales que contribuyen a la producción de respuestas inmunes no deseadas, como las observadas en el virus respiratorio sincitial<sup>26</sup> y en el virus del sarampión<sup>27</sup>, en los que la vacunación puede causar una exacerbación de la enfermedad al infectarse con el virus en vez de protección contra la infección. Por todo ello, el diseño de vacunas óptimas contra este tipo de infecciones debe ser tal que se induzcan sólo respuestas inmunes protectoras y se eviten las no deseadas. La ventaja de la vacunación con péptidos sintéticos deriva de la alta especificidad de la respuesta inmune que se induce.

Se ha demostrado que la inmunización con un péptido es capaz de inducir una respuesta T que confiere protección contra infecciones virales<sup>28</sup>. Si se demuestra que la respuesta inmune inducida por algunos de estos determinantes es protectora en vez de destructiva, se podría desarrollar una vacuna basada en péptidos sintéticos para la prevención y/o tratamiento de la hepatitis crónica C. Nuestro departamento sigue desde hace años una línea de investigación dedicada a la inducción de

respuesta humoral y citotóxica mediante la coimmunización de un DB o un DTc con un DTa adecuado<sup>14-17,29,30</sup>.

Una vacuna peptídica potencialmente efectiva debería comprender DT-ayudador y DT-citotóxicos conservados. Estos DTa y DTc deberían presentarse combinados, y con varias copias de cada uno de ellos, de modo que resultaran más inmunogénicos que la proteína natural del virus.

En este trabajo se ha caracterizado la respuesta inmune contra las proteínas del VHC implicada en la eliminación del virus y en la curación de la enfermedad. Además se han identificado varios péptidos de la proteína del core del VHC asociados al aclaramiento viral después del tratamiento con IFN. Estos resultados deberían ser considerados en el diseño de futuras vacunas o tratamientos de inmunoterapia contra la infección por el VHC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
2. HOUGHTON MH, WEINER AJ, HAN J, KUO G, CHOO QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1990; 14: 381-388.
3. KUO G, CHOO QL, ALTER HJ, GITNICK GL, REDEKER AG, PURCELL RH et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
4. HUARTE MP. Infección por el virus de la hepatitis C en receptores de transfusión de sangre en Navarra. Tesis Doctoral, 1992.
5. BERASAIN C, GARCIA-GRANERO M, RIEZU-BOJ JI, CIVEIRA MP, PRIETO J, BORRAS-CUESTA F. Detection of anti-hepatitis C virus antibodies by ELISA using synthetic peptides. *J Hepatol* 1993; 18: 80-84.
6. GENESCA J, ESTEBAN JI, ALTER HJ. Blood-borne non-A, non-B hepatitis: Hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 147-164.
7. RUIZ J, SANGRO B, CUENDE JI, BELOQUI O, RIEZU-BOJ JI, HERRERO JI et al. Hepatitis B and C viral

- infections in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992; 16: 637-641.
8. DI BISCEGLIE AM, HOOFNAGLE JH. Therapy in chronic hepatitis C with alfa-interferon: The answer? Or more questions?. *Hepatology* 1991; 13: 601-603.
  9. CAMPS J, CASTILLA A, RUIZ J, CIVEIRA MP, PRIETO J. Randomised trial of limphoblastoid alpha-IFN in chronic hepatitis C. *J Hepatology* 1993; 17: 390-396.
  10. MATSUMURA M, FREMONT DH, PETERSON PA, WILSON IA. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 1992; 257: 927-930.
  11. RÖTZSCHKE O, FALK K, DERES K *et al*. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognised by cytotoxic T cells. *Nature* 1990; 348: 252-254.
  12. KEENE JA, FORMAN J. Helper activity is required for the *in vivo* generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1982; 155: 768-782.
  13. LEIST TP, COBBOLD SP, WALDMANN H, AGUET M, ZINKERNAGEL RM. Functional analysis of T lymphocyte subsets. *J Immunol* 1987; 138: 2278-2281.
  14. GOLVANO JJ, LASARTE JJ, SAROBE P, GULLÓN A, PRIETO J, BORRÁS-CUESTA F. Polarity of immunogens: implications for vaccine design. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2363-2366.
  15. SAROBE P, LASARTE JJ, GOLVANO JJ, GULLÓN A, CIVEIRA MP, PRIETO J, BORRÁS-CUESTA F. Induction of antibodies against a peptide hapten does not require covalent linkage between the hapten and a class II presentable peptide. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1555-1558.
  16. PRIETO I, HERVÁS S, GARCÍA-GRANERO M, BERASAIN C, RIEZU-BOJ JI, LASARTE JJ *et al*. Simple strategy to induce antibodies of distinct specificity. Application to the mapping of gp120 and inhibition of HIV-1 infectivity. *Eur J Immunol* 1995; 25:877-883.
  17. LASARTE JJ, SAROBE P, GULLÓN A, PRIETO J, BORRÁS-CUESTA F. Induction of cytotoxic T lymphocytes against the principal neutralising domain of HIV-1 using an engineered (T-cytotoxic)-(T-helper) synthetic peptide construct. *Cell Immunol* 1992; 141: 211-218.
  18. MERRIFIELD RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963; 18: 80-84.
  19. ATHERTON E, LOGAN JC, SHEPPARD RC. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid phase synthesis using N-fluorenyl metoxycarbonil aminoacids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J Chem Soc Perkin Trans* 1981; 1: 538-546.
  20. BORRÁS-CUESTA F, GOLVANO JJ, SAROBE P, LASARTE JJ, PRIETO I, SZABO A *et al*. Insights on the amino acid side-chain interactions of a synthetic T-cell determinant. *Biologicals* 1991; 19: 187-190.
  21. SAROBE P, JAUREGUI JI, LASARTE JJ, GARCÍA N, CIVEIRA MP, BORRÁS-CUESTA F *et al*. Production of interleukin-2 in response to synthetic peptides from hepatitis C virus E1 protein in patients with chronic hepatitis C: Relationship with the response to interferon treatment. *J Hepatol* 1996; 25: 1-9.
  22. LASARTE JJ, GARCÍA-GRANERO M, CASARES N, LOPEZ-DÍAZ DE CERIO A, GARCÍA N, CIVEIRA MP *et al*. - Cellular immunity to HCV core protein, HLA-DR genes and the response to interferon in patients with chronic hepatitis C. 1998. *Hepatology* 1998. En prensa.
  23. GAVIER B, MARTÍNEZ-GONZALEZ MA, RIEZU-BOJ JI, LASARTE JJ, GARCÍA N, CIVEIRA MP *et al*. Viremia after one month of interferon therapy predicts treatment outcome, in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 113: 1647-1653.
  24. SIMMONDS P, ALBERTI A, ALTER HJ, BONINO F, BRADLEY DW, BRECHOT CE *et al*. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324.
  25. VIAZOV S, ZIBERT A, RAMAKRISHNAN K, WIDELL A, CAVICCHINI A, SCHREIER E *et al*. Typing of hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay. *J Virol Methods* 1994; 48: 81-92.
  26. KAPIKIAN AZ, MITCHELL RH, CHANOCK RM, SHVEDOFF RA, STEWART. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* 1969; 89: 405-421.
  27. FULGINITI VA, ELLER JJ, DOWNIE AW, KEMPE CH. Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines. *JAMA* 1967; 202: 1075-1080.
  28. KLAVINSKIS LS, WHITTON JL, OLDSTONE MBA. Molecularly engineered vaccine which expresses an immunodominant T-cell epitope induces cytotoxic T lymphocytes that confers protection from lethal virus infection. *J Virol* 1989; 63: 4311-4316.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR...

29. SAROBE P, LASARTE JJ, GOLVANO J, PRIETO I, GULLÓN A, SOTO MJ et al. Induction of neutralizing antibodies against HIV-1 using synthetic peptide constructs containing an immunodominant T helper cell determinant from vpr. *J Acquir Immune Defic Syndrome* 1994; 7: 635-640.

30. HERVÁS-STUBBS S, BERASAIN C, GOLVANO JJ, LASARTE JJ, PRIETO I, SAROBE P et al. Overcoming class II-linked non-responsiveness to hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1994; 12: 867-871.