

Expresión de los receptores para el Fc de la IgG en leucocitos de sangre periférica de pacientes con hepatitis C crónica.

María Peinado, Ángela Conesa, Luisana Dávila, Juan Bautista De Sanctis, Leopoldo Deibis y Félix Toro.

Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Correo electrónico: torof@ucv.ve

Palabras clave: VHC, leucocitos, receptores.

Resumen. La respuesta inmunitaria representa un elemento fundamental en el control de la infección por el Virus de Hepatitis C (VHC). Factores de origen viral y del hospedero modulan dicha respuesta. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar complejos inmunitarios, bajo la forma de crioglobulinas, de pacientes infectados con el VHC y evaluar la expresión de superficie de los receptores para el Fc de la IgG (Fc R) en subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica de estos pacientes. Se seleccionaron 12 individuos VHC (+) y 12 sujetos sanos. De ambos grupos se tomaron muestras de suero para aislar crioglobulinas y sangre venosa con EDTA para evaluar la expresión de los Fc R CD64 (Fc RI), CD32 (Fc RII) y CD16 (Fc RIII) mediante citometría de flujo. La presencia de ARN del VHC en suero y crioglobulinas fue analizada mediante RT-PCR. Los resultados muestran que el 50% de los pacientes VHC (+) presentaron niveles elevados de crioglobulinas constituidas fundamentalmente por IgG. En 3 de 5 pacientes con crioglobulinas elevadas se identificó ARN del VHC. La expresión de CD64 se observó principalmente en monocitos (80%), CD32 en monocitos, linfocitos B y neutrófilos (> 90%) y CD16 en células NK y neutrófilos (85% y 95% respectivamente) no encontrándose diferencias significativas entre pacientes y controles. La densidad de expresión de CD32 resultó significativamente menor en poblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes en comparación con controles ($p < 0,05$). Se concluye que esta disminución en la densidad del receptor Fc RII podría tener implicaciones en la fisiopatología de la infección por el VHC.

Expression of Fc receptors for IgG in peripheral blood leucocytes from hepatitis C virus infected individuals.

Invest Clín 2007; 48(2): 175 - 185

Key words: HCV, leucocytes, receptors.

Abstract. The immune response represents a fundamental element in the control of Hepatitis C virus (HCV) infection. Viral and cellular host factors may modulate this response. In the present study, we characterized immune complexes (cryoprecipitates) isolated from HCV-infected patients and evaluated the expression of Fc receptors for IgG (Fc R) in peripheral blood leucocytes of these patients. Twelve HCV (+) patients and 12 healthy control individuals were selected for this study. For each group, sera samples were collected for cryoglobulins isolation and characterization and EDTA-anticoagulated venous blood samples were collected for flow cytometry analysis of Fc R, CD64 (Fc RI), CD32 (Fc RII) and CD16 (Fc RIII) expression. Presence of HCV RNA in serum and cryoprecipitates was analysed by RT-PCR. Results show that 50% of HCV-infected patients present high levels of cryoglobulins mainly constituted by IgG. Three out of 5 cryoglobulins analyzed by RT-PCR were positive for HCV-RNA. Expression of CD64 was observed mainly in monocytes (80%), CD32 in monocytes, B lymphocytes and neutrophils (> 90%) and CD16 in NK cells and neutrophils (85% and 95% respectively). No differences were observed in the percentage of Fc R expression when comparing HCV-infected patients with healthy controls. On the contrary, density of expression of CD32 in monocytes and neutrophils cell populations of HCV patients was significantly lower than that observed in healthy controls ($p < 0.05$). We concluded that low density expression of Fc RII in HCV-infected patients may have implications in the physiopathology of HCV infection.

Recibido: 08-02-2006. Aceptado: 07-09-2006.

INTRODUCCIÓN

El Virus de Hepatitis C (VHC) representa el principal agente etiológico de la hepatitis crónica a nivel mundial (1,2). Mas de 170 millones de personas están infectadas con el virus y alrededor de un 80% de estos individuos desarrollan una enfermedad crónica que puede conducir a manifestaciones mas severas como son cirrosis y cáncer primario hepático (1). Los altos índices de cronicidad que caracterizan a esta infección viral plantean una serie de inte-

rrogantes en torno a los posibles mecanismos moleculares e inmunológicos que contribuyen al establecimiento de una condición de persistencia viral. Tales mecanismos están representados por la capacidad del virus de infectar órganos extrahepáticos, la generación de diversidad o variabilidad genética en la población viral y la alteración de la respuesta inmunológica como consecuencia del proceso de infección. Las investigaciones realizadas hasta la fecha han aportado claras evidencias de que algunos de estos mecanismos operan en el modelo de infección por

el VHC (3-6) destacando entre ellos la capacidad del virus de infectar células leucocitarias humanas (7-12).

La infección por el VHC frecuentemente está asociada a fenómenos de autoinmunidad y enfermedades de complejos inmunitarios, representando la crioglobulinemia mixta una de sus principales manifestaciones. Esta patología se caracteriza por la presencia de altos dinteles de complejos inmunitarios, bajo la forma de crioprecipitados, los cuales pudieran ser el producto de ciertos desordenes linfoproliferativos (13). El papel del VHC como agente etiológico de la crioglobulinemia se fundamenta en la interacción entre el virus y las células linfocitarias que directamente modula la función del linfocito B lo cual resulta en la expansión policlonal de esta célula (14).

Los leucocitos de sangre periférica expresan una serie de receptores de superficie que les permiten interactuar con complejos inmunitarios formados por virus-anticuerpos o bacterias-anticuerpos. La fagocitosis de microorganismos opsonizados por anticuerpos, mediada por leucocitos, está regulada por receptores para la región constante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG). En el humano existen 3 clases de receptores para el Fc de la IgG (Fc R): CD64 (Fc RI), CD32 (Fc RII), CD16 (Fc RIII), los cuales difieren en su estructura, afinidad de unión por la IgG y propiedades de señalización en la célula. Estos receptores, una vez que interactúan con los complejos inmunitarios, son capaces de disparar funciones efectoras tales como fagocitosis en monocitos/macrófagos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en células NK, activación de neutrófilos e inhibición de la activación de células B mediada por complejos inmunitarios (15). Adicionalmente, la interacción de complejos inmunitarios con la célula vía Fc R puede mediar la entrada de ciertos virus a su célula blanco a través de un mecanismo denominado infección fa-

cilitada dependiente de anticuerpos ("Antibody-dependent enhancement", ADE). Este proceso, que involucra la participación de complejos virus-anticuerpos, ha sido documentado para los flavivirus (16) y retrovirus (17). Mas recientemente, nuestro grupo de investigación reportó la capacidad que tenían complejos VHC-inmunoglobulinas de interactuar con líneas celulares humanas que expresan Fc R representando este un posible mecanismo de infección viral (18).

Debido a que los complejos inmunitarios pueden aumentar o suprimir la respuesta inmunitaria efectora dependiendo del tipo del Fc R comprometido y al tipo de célula involucrada, en el presente trabajo nos planteamos caracterizar los complejos inmunitarios (crioglobulinas) de pacientes infectados con el VHC y estudiar la expresión de superficie de los Fc R en las distintas subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica de estos pacientes en comparación con la expresión en células de sujetos sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población de estudio

Doce pacientes (5 femeninos y 7 masculinos), provenientes de la consulta externa del Instituto de Inmunología de la UCV, con diagnóstico de infección crónica por el VHC fueron incluidos en el estudio. Los pacientes, con edades comprendidas entre 17 y 58 años, presentaron marcadores serológicos positivos para el VHC (anticuerpos anti-VHC y ARN viral), y negativos para la infección por los Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Virus de Hepatitis B (VHB). El diagnóstico de enfermedad hepática crónica fue realizado de acuerdo a criterios histológicos característicos para esta patología viral. Ninguno de los pacientes presentó evidencia de otras enfermedades hepáticas crónicas o autoinmunes y tampoco se encontraban bajo tratamiento anti-viral para el momento del estudio.

Paralelamente se estudiaron 12 sujetos sanos (6 femeninos y 6 masculinos), seronegativos para VHC, VIH, y VHB, con edades comprendidas entre 22 y 45 años.

El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Inmunología de la UCV.

2. Crioprecipitados

Los complejos inmunitarios bajo la forma de crioglobulinas se obtuvieron a partir de muestras de suero siguiendo el protocolo previamente establecido por Contreras y col. (19). Brevemente, se tomaron 20 mL de sangre del paciente y se dejaron coagular por 1h a 37°C, seguidamente se centrifugó por 30 min a 2.000 rpm, y se extrajo la muestra de suero colocándola en tubos estériles. La muestra se almacenó a 4°C por 7 días y posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm por 30 min (4°C). El precipitado obtenido fue resuspendido en 1 mL de PBS pH 7.4 e incubado a 4°C por 1 h. La muestra se centrifugó de nuevo a 3.000 rpm por 30 min (4°C) y el precipitado fue lavado con H₂O cuatro veces, centrifugando a 3.000 rpm (4°C). Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 1 mL de PBS manteniéndolo por 1h a 37°C. La cuantificación del crioprecipitado (concentración de inmunoglobulinas) fue realizada mediante espectrofotometría de UV, midiendo la densidad óptica de la muestra a 280 nm y multiplicando el valor obtenido por el coeficiente de extinción molar para la IgG (1,44 g/mL). La determinación de IgG fue estimada mediante la técnica de turbidimetría empleando el Turbitimer Dade Berihng (Dade Behring, Marburg, Germany).

La presencia de ARN del VHC tanto en muestras de suero como de crioglobulinas de los pacientes fue determinada por el método de transcripción reversa combinada con doble PCR (RT-PCR). Brevemente, las muestras de crioglobulinas fueron pro-

cesadas con el reactivo comercial TRIZOL™ (Invitrogen) con la finalidad de aislar el ARN total. Seguidamente, las muestras de ARN fueron resuspendidas en agua libre de nucleasas (Promega) y analizadas mediante el ensayo de RT-PCR de acuerdo al protocolo descrito por Chan y colaboradores (20).

3. Evaluación de la expresión de receptores para la región constante (Fc) de la inmunoglobulina G (CD16, CD32 y CD64)

La evaluación de la expresión de superficie de los Fc R en leucocitos de sangre periférica, específicamente linfocitos B, células NK, monocitos y polimorfonucleares neutrófilos, se realizó por inmunofluorescencia directa, mediante doble marcaje con los anticuerpos monoclonales específicos para cada receptor y para la subpoblación celular a estudiar. Los anticuerpos monoclonales utilizados: anti-CD64 (Fc RI, receptor Fc de alta afinidad para IgG, clon 10.1), anti-CD32 (Fc RII, receptor Fc de baja afinidad para IgG, clon 7.3), anti-CD16 (Fc RIII, receptor Fc de baja afinidad para IgG y marcador de neutrófilos, clon 3G8) fueron obtenidos de Ancell (Ansell Corporation, Bayport, MN, USA). Para definir las subpoblaciones leucocitarias de linfocitos B, monocitos y células NK se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD19 (clon HD37), anti-CD14 (clon TUK4) y anti-CD56 (clon 65.9) respectivamente, obtenidos de DakoCytomation (DakoCytomation, Inc. Carpintería, CA, USA).

El análisis citométrico fue realizado en 25.000 células utilizando un citómetro de flujo XL Elite (Bekman Coulter). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células positivas e intensidad media de fluorescencia, basado en cursores previamente establecidos con controles de isotipo: IgG1-FITC e IgG1-PE.

4. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm$ DE) de los datos obtenidos en cada grupo de experimentos y para su análisis se emplearon las pruebas de *t* de Student para muestras no pareadas y análisis de varianza (ANOVA) para más de tres grupos de datos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Características clínicas y de las crioglobulinas aisladas de pacientes seropositivos para el VHC

La Tabla 1 muestra las características clínicas del grupo de 12 pacientes evaluados en el presente estudio así como de sus crioprecipitados obtenidos a partir de muestras de suero. Para el momento del es-

tudio todos los pacientes presentaban infección crónica por el VHC con positividad para el ARN viral y prevalencia del genotipo viral 1b (67%). Los niveles de alanina aminotransferasas (ALT) y aspartato aminotransferasas (AST) resultaron elevados registrando valores entre 90 ± 42 y 74 ± 30 UI/mL (promedio \pm desviación estándar) respectivamente. Todos los pacientes estudiados resultaron negativos para marcadores inmunoserológicos de autoinmunidad (factor reumatoide, anticuerpos anti-nucleares, anti-músculo liso, anti-mitochondriales, anti-microsomales y anti-tiroideos). Siete de los 12 pacientes (58%), originalmente donantes voluntarios de Banco de Sangre, se encontraban clínicamente asintomáticos para el momento del estudio. Tres de 12 (25%) presentaban astenia como síntoma relevante. Un paciente (N° 5) mostró signos y síntomas relacionados con Síndrome de

TABLA I
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y NIVELES DE PROTEÍNAS TOTALES E IgG EN CRIOPRECIPITADOS DE PACIENTES CRÓNICAMENTE INFECTADOS CON EL VHC

| Paciente N° | Genotipo viral | ALT (U/L) | AST (U/L) | Crioglobulinas * (mg/mL) | IgG (Crio)** (mg/dL) |
|-------------|-----------------------|-----------|-----------|--------------------------|----------------------|
| 1 | 1b | 106 | 78 | 1,7269 | 15,00 |
| 2 | 1b | 96 | 84 | 2,3900 | 3,69 |
| 3 | 1b | 101 | 86 | 0,2476 | < 0,9 [†] |
| 4 | 1b | 61 | 45 | 0,8464 | 1,25 |
| 5 | 1b | 96 | 87 | 1,7663 | 15,70 |
| 6 | 1a | 52 | 62 | 1,7181 | 2,68 |
| 7 | No 1 y 2 ^a | 90 | 33 | 0,1436 | < 0,9 [†] |
| 8 | 2c | 204 | 148 | 0,9870 | 4,99 |
| 9 | 1b | 93 | 67 | 0,0104 | < 0,9 [†] |
| 10 | 1a | 34 | 42 | 0,0911 | < 0,9 [†] |
| 11 | No 1 y 2 ^a | 85 | 73 | 0,3046 | 1,25 |
| 12 | 1b | 60 | 85 | 0,1939 | 1,12 |

Los resultados se expresan como la concentración de proteínas e IgG en crioprecipitados de pacientes VHC (+).
* Valores normales de crioglobulinas: 0,092-0,520 mg/mL (18). ** Niveles de IgG en muestras de crioglobulinas. [†] Límite de detección del ensayo: 0,9 mg/dL IgG. ^a: Negativo para genotipos virales 1 y 2.

Sjögren mientras que el paciente N°8 presentó signos y síntomas relacionados con crioglobulinemia.

En cuanto a las características de sus crioprecipitados, 6 de los 12 pacientes, todos con genotipo viral 1, mostraron valores elevados de crioglobulinas (entre 0,84 y 2,39 mg/mL) los cuales resultaron superiores a los valores normales de referencia establecidos en nuestro laboratorio a partir de muestras de crioprecipitados de sujetos sanos (0,092-0,520 mg/mL) (18). La determinación de IgG en las crioglobulinas de los pacientes VHC (+) reveló valores que oscilaron entre 1,25 y 15 mg/dL y solo 4 pacientes presentaron valores por debajo del límite de detección del ensayo (0,9 mg/dL). En la mayoría de los casos, la concentración de IgG fue mas elevada en aquellas muestras de crioglobulinas que presentaron valores altos de proteínas, ob-

servándose una correlación positiva y estadísticamente significativa entre estos dos parámetros ($r = 0,6308$, $p = 0,0278$).

La presencia de ARN del VHC en las muestras de suero y crioglobulinas fue examinada mediante un ensayo de RT-PCR. La Fig. 1A ilustra los resultados obtenidos en 9 de las 12 muestras de suero analizadas. Por otro lado, de un total de 12 muestras de crioglobulinas analizadas, 3 resultaron positivas para el ARN viral (Fig. 1B) presentando todas estas muestras valores elevados de crioglobulinas e IgG.

2. Evaluación de la expresión de superficie de receptores para el Fc de IgG (Fc R)

El análisis de la expresión de receptores para Fc : Fc RI (CD64), Fc RII (CD32), y Fc RIII (CD16), se realizó mediante citometría de flujo en leucocitos de sangre periférica de pacientes VHC (+) y sujetos sa-

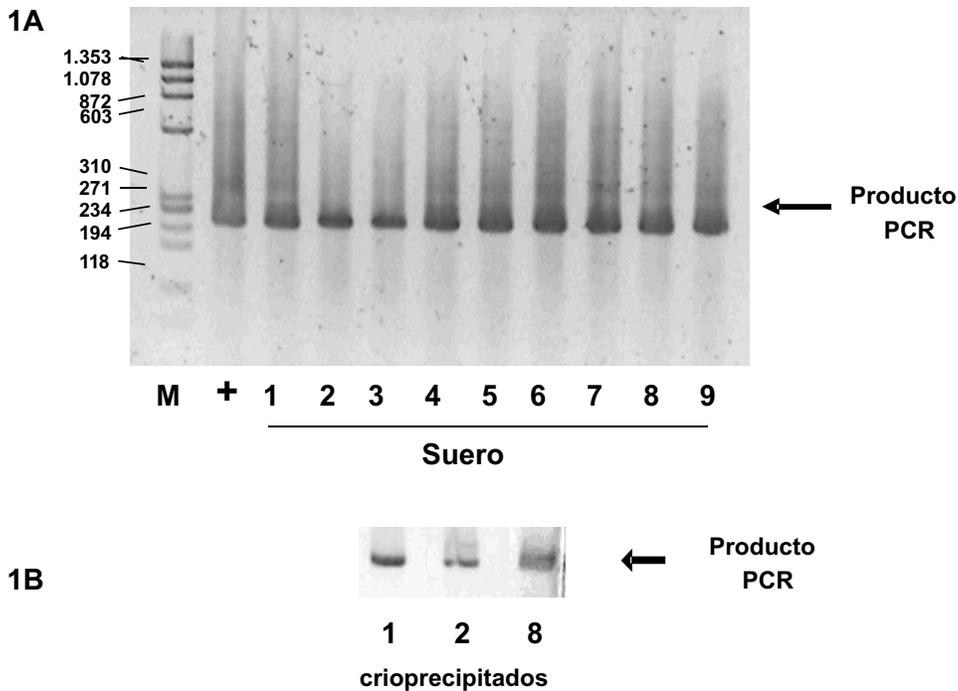


Fig. 1. Identificación de secuencias de ARN del VHC en muestras de suero y crioprecipitados de pacientes infectados con el VHC mediante RT-PCR. 1A, muestras de suero pacientes 1 al 9, 1B, muestras de crioprecipitados de pacientes 1, 2 y 8. M, marcador de peso molecular (ADN de PhiX174-Hae III, números indican el tamaño de las bandas en pares de bases), +, control positivo para ARN del VHC.

nos. Los resultados muestran que los tres tipos de receptores Fc se expresan de manera diferencial en las distintas poblaciones leucocitarias estudiadas representadas por monocitos, linfocitos B, células NK y polimorfonucleares neutrófilos (Tabla II y Fig. 2).

Fc RI (CD64): Los linfocitos B, NK y polimorfonucleares neutrófilos presentaron muy bajos niveles de expresión de la molécula CD64 (< 4%, Tabla II); mientras que la población de monocitos mostró altos porcentajes de expresión tanto en el grupo de pacientes como de controles (82 y 76,4% respectivamente). Al evaluar la densidad de expresión de este receptor, medida a través de la intensidad media de fluorescencia (IMF), se observaron valores similares entre las poblaciones de monocitos de pacientes y controles (5,2 y 5,3 respectivamente), no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos. Mas aún, al comparar la expresión de este receptor entre individuos controles y pacientes con crioglobulinas

elevadas no se encontraron diferencias significativas (Fig. 2).

Fc RII (CD32): Los linfocitos B, monocitos y neutrófilos presentaron altos porcentajes de expresión del receptor CD32 (mayor del 92%, Tabla II) tanto en el grupo de pacientes como de controles, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos. Por su parte, las células NK presentaron bajos niveles de expresión de este receptor (< 13%). Al analizar la intensidad media de fluorescencia en las poblaciones celulares positivas para CD32 se observó una disminución estadísticamente significativa de la densidad de expresión de este receptor en la población de monocitos de pacientes en comparación a la de controles ($p = 0,02$, Fig. 2). Esta disminución se hace mas evidente en aquellos pacientes que presentaron niveles de crioglobulinas por encima de los valores normales ($p = 0,014$). De la misma manera, se observó una disminución significativa en la expresión de este receptor en los neutrófilos de pacientes con

TABLA II
EXPRESIÓN DE LOS Fc R EN SUBPOBLACIONES LEUCOCITARIAS DE PACIENTES INFECTADOS CON EL VHC Y CONTROLES

| Fc R | Población Celular | Pacientes VHC (+) | Controles |
|------|-------------------|-------------------|-------------|
| CD64 | Linfocitos B | 2 ± 1,9 | 2,3 ± 3,5 |
| | NK | 3,6 ± 4,2 | 3,2 ± 4,3 |
| | Monocitos | 82 ± 10,4 | 76,4 ± 18,7 |
| | Neutrófilos | 1 ± 1,3 | 0,7 ± 0,5 |
| CD32 | Linfocitos B | 94,1 ± 8,9 | 92,8 ± 11,2 |
| | NK | 12,8 ± 5,6 | 13,4 ± 8,7 |
| | Monocitos | 97,0 ± 3,1 | 98,7 ± 1,5 |
| | Neutrófilos | 97,4 ± 3,5 | 98,2 ± 3 |
| CD16 | Linfocitos B | 1,9 ± 1,6 | 1,6 ± 1,7 |
| | NK | 85 ± 2,9 | 87 ± 2,9 |
| | Monocitos | 6,3 ± 2,8 | 6,8 ± 3,5 |
| | Neutrófilos | 90,8 ± 3,0 | 90,8 ± 3,0 |

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar del porcentaje de células positivas para cada receptor. Pacientes VHC (+) (n = 12) y controles (n = 12).

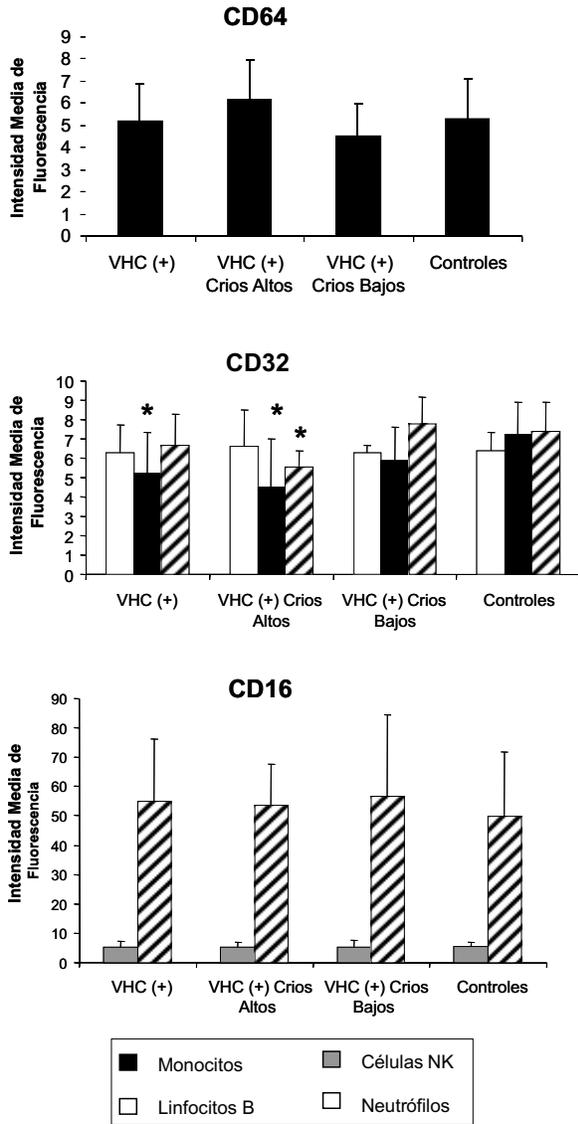


Fig. 2. Densidad de expresión de los Fc R en subpoblaciones leucocitarias de pacientes infectados con el VHC y controles. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar de la intensidad media de fluorescencia, expresado en unidades logarítmicas, para los receptores expresados en cada subpoblación leucocitaria del total de pacientes VHC (+) (n = 12), pacientes con niveles elevados de crioglobulinas (n = 6), pacientes con niveles normales de crioglobulinas (n = 6) y controles (n = 12). *p < 0,05 pacientes vs controles basado en análisis de ANOVA.

crioglobulinas elevadas en comparación con el grupo control así como con el grupo de pacientes con niveles normales de crioglobulinas (p = 0,01 y 0,007 respectivamente) (Fig. 2).

Fc RIII (CD16): Las células NK mostraron altos porcentajes de expresión de CD16 (> 85%, Tabla II) y la totalidad de la población de polimorfonucleares neutrófilos expresaron este receptor. Por el contrario, los linfocitos B y monocitos expresaron bajos niveles de CD16 (< 7%), no observándose diferencias significativas entre pacientes VHC (+) y sujetos sanos en ninguna de las subpoblaciones celulares estudiadas. Al analizar la densidad de expresión de este receptor, se observó que los neutrófilos presentaron valores de IMF significativamente mayores en comparación con las células NK (p < 0,0001), no apreciándose diferencias significativas entre pacientes y controles (Fig. 2).

DISCUSIÓN

En su gran mayoría, las células del sistema inmunitario expresan receptores para la región Fc de la IgG (Fc R) que en conjunto conforman una familia heterogénea de moléculas que desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria mediando la interrelación de sus brazos efectores humoral y celular. Los Fc R no solo representan moléculas que controlan las funciones de la IgG libre o asociada a complejos inmunitarios sino también ejercen un control del balance entre autoinmunidad y tolerancia a nivel periférico (21).

El control de la infección por el VHC depende principalmente de los linfocitos T y mas específicamente de una fuerte respuesta citotóxica virus específica asociada a estas células. La condición de cronicidad que caracteriza a esta infección está relacionada con la incapacidad del sistema inmunitario de montar una respuesta protec-

tiva y/o a factores virales dependientes de mutaciones en los sitios antigénicos que permiten la evasión de la respuesta inmunológica. La producción de anticuerpos no neutralizantes explica la persistencia del virus y la formación de complejos inmunitarios. Más de un tercio de los pacientes infectados por el VHC presentan complejos inmunitarios circulantes con propiedades crioprecipitantes, lo que conlleva a la manifestación del síndrome de crioglobulinemia (14).

En la presente investigación, la caracterización inmunquímica de crioprecipitados de individuos crónicamente infectados con el VHC reveló que el 50% de los pacientes presentaron niveles elevados de crioglobulinas constituidas por IgG. Es de hacer notar que esta determinación se realizó a través de un ensayo de turbidimetría cuya sensibilidad (0,9 mg/dL) resulta inferior a otros ensayos como el de nefelometría, por lo que probablemente la concentración de IgG en algunas de las muestras analizadas fue subestimada. El análisis mediante RT-PCR de 5 muestras de crioglobulinas con niveles elevados de proteínas totales e IgG, reveló la presencia del ARN del VHC en 3 de estas muestras. En conjunto, esta serie de resultados coinciden con hallazgos previos, reportados por nuestro grupo de trabajo y otros investigadores, que señalan la presencia de niveles elevados de crioglobulinas en individuos crónicamente infectados por el VHC estando constituidas dichas crioglobulinas por complejos virus-anticuerpos (14, 18). Una caracterización más detallada ha permitido establecer que estos complejos inmunitarios están formados generalmente, mas no en todos los casos, por moléculas de factor reumatoide IgM unidos a IgG específica para la proteína de la cápside ("core") del VHC (14). Aunque en el presente estudio no se determinó la presencia de IgM en las muestras de crioglobulinas de los pacientes VHC(+), reportes previos realizados

por nuestro grupo de trabajo mostraron una prevalencia de la IgG como principal componente de los crioprecipitados (18). Así mismo, no se encontró correlación alguna entre los niveles de factor reumatoide y concentración de crioglobulinas (datos no mostrados).

La interacción de complejos inmunitarios virus-anticuerpo con células presentadoras de antígeno vía Fc R puede optimizar la presentación antigénica y resultar en una amplificación de la respuesta inmunitaria contra el virus (22). En tal sentido, nuestro estudio muestra que los Fc R humanos (CD64, CD32, y CD16) difieren en cuanto a su distribución celular, expresándose de manera diferencial en las distintas subpoblaciones leucocitarias como ha sido reportado previamente (15). En el caso particular de pacientes infectados por el VHC, se observó que tanto la distribución celular así como el porcentaje de expresión de los Fc R fue comparable al de sujetos sanos. En contrapartida, la densidad de expresión de la molécula CD32 resultó significativamente menor en las poblaciones de monocitos y polimorfonucleares-neutrófilos de pacientes en comparación con sujetos sanos. Esta disminución fue aun más evidente en aquellos pacientes que presentaron altos niveles de crioglobulinas. La densidad de expresión de los otros dos receptores, CD16 y CD64, no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio. El significado que desde el punto de vista fisiopatológico tienen estos hallazgos es poco conocido. En tal sentido, se podría señalar que la baja expresión del receptor CD32 en monocitos y neutrófilos resultaría en una disminución de la capacidad de estas células de fagocitar los complejos virus-anticuerpo incrementándose así la susceptibilidad del organismo a la infección. Este planteamiento es respaldado por estudios realizados por Rossman y colaboradores quienes reportan una correlación positiva entre la expresión de CD32 en ma-

crófagos y la función de los Fc Rs (23). Adicionalmente, cambios en la expresión de CD32 pudieran afectar los eventos de interacción de los complejos inmunitarios virus-anticuerpos con las células del sistema inmunitario alterando sus funciones. En este sentido, Kanto y col. reportan que complejos inmunitarios del tipo VHC-IgG inhiben la respuesta citotóxica *in vitro* de linfocitos T a través de una disminución en la expresión de la molécula co-estimuladora B7-1 en los monocitos y un incremento en la producción de TGF- 1 (24).

La interacción de complejos inmunitarios con células que expresen Fc R podría igualmente representar un mecanismo de penetración e infección de la célula blanco por parte del VHC. Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó la capacidad que tenían complejos VHC-IgG de interactuar con líneas celulares monocíticas humanas a través de Fc R siendo el receptor Fc RII (CD32) fundamental en dicho proceso. Este evento de interacción conllevó a una internalización del complejo inmunitario favoreciendo la penetración y replicación del virus en la célula blanco (18).

El fenómeno de interacción de complejos virus-anticuerpos con células que expresan Fc R ha sido igualmente reportado para otros tipos virales representados por el Virus del Dengue (16) y el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (17). En el caso particular de la infección por VIH se plantea que dicho proceso representa un mecanismo de facilitación de la infección de linfocitos T CD4+ mediado por complejos virus-anticuerpos presentes en la superficie de linfocitos B (17).

En resumen, los resultados presentados en este estudio muestran una disminución en la densidad de expresión del Fc RII (CD32) en las poblaciones de monocitos y polimorfonucleares de pacientes infectados con el VHC. Este fenómeno pudiera tener implicaciones funcionales relacionadas con

los eventos de interacción de complejos inmunitarios virus-anticuerpos los cuales resultan elevados en esta patología viral. Estos aspectos requieren de una futura investigación a fin de evaluar sus implicaciones en la fisiopatología de la infección por el VHC.

AGRADECIMIENTO

Proyecto financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela bajo el código PG 09-36-5105-2005.

REFERENCIAS

1. **Pearlman BL.** Hepatitis C infection: a clinical review. *South Med J* 2004; 97:364-373.
2. **Thomson BJ, Finch RG.** Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:86-94.
3. **Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Wiener A, Esteban R, Guardia J, Gomez J.** Hepatitis C Virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: Quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66:3225-3229.
4. **Cribier B, Schmitt C, Bingen A, Kirn A, Keller F.** *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1995; 76:2485-2491.
5. **Spengler U, Lechmann M, Irrgang B, Dumoulin FL, Sauerbruch T.** Immune response in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1996; 24:20-25.
6. **Corado J, Toro FI, Baroja ML, Bianco NE, Machado IV.** CD3 and CD28 activating pathways in HCV infection. *Viral Immunology* 1994; 7:37-40.
7. **Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zeldis JB.** Hepatitis C is detected in a Monocyte/Macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1276-1280.
8. **Müller H M, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L.**

- Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993; 74:669-676.
9. **Müller HM, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L, Goeser T, Pfaff E.** B-Lymphocytes are predominantly involved in viral propagation of hepatitis C virus (HCV). *Arch Virol* 1994; 9:307-316.
 10. **Corado J, Toro FI, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB.** Impairment of NK cytotoxic activity in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 451-457.
 11. **Toro FI, Conesa A, Garcia A, Bianco NE, De Sanctis J.** Increased peroxide production by polymorphonuclear cells of chronic HCV-infected patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88:169-175.
 12. **Toro F, Conesa A, García A, Deibis L, Bianco NE, DeSanctis JB.** HCV RNA sequences in eosinophils of chronic HCV-infected patients. *J Med* 1999; 30:279-288.
 13. **Hadziyannis SJ.** Nonhepatic manifestations and combined diseases in HCV infection. *Dig Dis Sci* 1996; 41:63S-74S.
 14. **Sansonno D, Dammacco F.** Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:227-236.
 15. **Ravetch J, Bolland S.** IgG Fc Receptors. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:275-290.
 16. **Gould EA, Buckley A, Groeger BK, Cane PA, Doenhoff M.** Immune enhancement of yellow fever virus neurovirulence for mice: studies of mechanisms involved. *J Gen Virol* 1987; 68:3105-3112.
 17. **Jakubik JJ, Saifuddin M, Takefman DM, Spear GT.** Immune complexes containing human immunodeficiency virus Type 1 primary isolates bind to lymphoid tissue B lymphocytes and are infectious for T lymphocytes. *J Virol* 2000; 74:552-555.
 18. **Marino R, Deibis L, De Sanctis JB, Bianco NE, Toro F.** Interaction of immune complex isolated from hepatitis C virus-infected individuals with human cell lines. *Med Microbiol Immunol* 2005; 194:73-80.
 19. **Contreras CE, Orozco A, Sanchez P, Ortega G, Bianco NE.** Physiological aspects of circulating immune complexes in the normal population. *Clin Exp Immunol* 1982; 48: 693-699.
 20. **Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett Yap PL, Simmonds P.** Analysis of a new hepatitis C virus and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73: 1131-1141.
 21. **Cohen-Solal J, Cassard L, Fridman WH, Fridman C.** Fc receptors. *Immunol Letters* 2004; 92:199-205.
 22. **Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodríguez A, Theyry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S.** Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999; 18:371-380.
 23. **Rossmann MD, Ruiz P, Comber P, Gomez F, Rottem M, Schreiber AD.** Modulation of macrophage Fc gamma receptors by rGM-CSF. *Exp Hematol* 1993; 21:177-183.
 24. **Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Katayama K, Ito A, Mochizuki K, Kozuschita N, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M.** Cross-linking of Fc (gamma)-receptor on monocytes inhibits hepatitis C virus-specific cytotoxic T-Lymphocytes induction in vitro. *Immunology* 1998; 94:461-468.