

TIROÏDITIS INDUÏDA PER INTERFERÓ EN  
PACIENTS AMB INFECCIÓ CRÒNICA PEL VIRUS  
DE L'HEPATITIS C I EN PACIENTS AMB  
MELANOMA:

**Estudi de subpoblacions limfocitàries**

Tesi doctoral presentada per **Berta Soldevila i Madorell**  
per optar al grau de DOCTOR EN MEDICINA I CIRURGIA



Treball realitzat sota la direcció de les Doctores  
**Anna Sanmartí i Sala i Eva Martínez i Cáceres**

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Barcelona, maig 2013

*Al Pau i a l'Elna,  
per fer-me tan feliç*

## SUMARI

<b>Agraïments</b>	<b>11</b>
<b>Abreviatures</b>	<b>15</b>
<b>1. PRESENTACIÓ</b>	<b>21</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Malaltia autoimmunitària tiroïdal.Etiopatogènia</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Regulació de la resposta autoimmunitària</b>	<b>26</b>
2.2.1. Sistema de tolerànica	27
2.2.1.1. Tolerànica central	27
2.2.1.2. Tolerànica perifèrica	28
2.2.1.2.1. Cèl·lules T reguladores	29
2.2.1.2.2. Altres cèl·lules reguladores	35
2.2.1.2.2. Anèrgia clonal	36
2.2.1.2.3. Apoptosi	37
2.2.2. Cèl·lules T col·laboradores	39
2.2.3. Limfòcits B	45
2.2.3.1. Cèl·lules B transicionals	47

<b>2.3. Mecanismes patogènics de la malaltia autoimmunitària tiroïdal</b>	<b>48</b>
<b>2.4. Infecció pel virus de l'hepatitis C</b>	<b>51</b>
2.4.1. Epidemiologia	51
2.4.2. Virus de l'hepatitis C	51
2.4.3. Resposta immunitària enfront la infecció pel virus de l'hepatitis C	54
2.4.4. Manifestacions de la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C	58
2.4.4.1. Manifestacions hepàtiques	58
2.4.4.2. Manifestacions extrahepàtiques	60
2.4.5. Infecció pel virus de l'hepatitis C i malaltia autoimmunitària tiroïdal	63
2.4.6. Diagnòstic de la infecció pel virus de l'hepatitis C	65
2.4.7. Valoració de la fibrosi hepàtica	65
2.4.8. Indicacions de tractament	66

2.4.9. Tractament de la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C	66
2.4.9.1. Tractament amb interferó-alfa	67
2.4.9.1.1. Generalitats dels interferons	67
2.4.9.1.2. Mecanisme d'acció de l'interferó-alfa	69
2.4.9.1.3.. Efectes de l'interferó-alfa sobre el sistema immunitari	69
2.4.9.1.4. Interferó-alfa com a tractament per la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C	70
2.4.9.1.5. Efectes de l'interferó-alfa sobre el sistema immunitari en la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C	71
2.4.9.2. Tractament amb ribavirina	72
2.4.9.3. Efectes secundaris del tractament amb interferó-alfa pegilat i ribavirina	73
2.4.9.4. Tractament amb agents antivirals d'acció directa	74
2.4.10. Monitorització de la resposta al tractament	75
<b>2.5. Melanoma maligne</b>	<b>78</b>
2.5.1. Epidemiologia	78
2.5.2. Classificació del melanoma maligne	78

2.5.3. Resposta immunitària enfront al melanoma maligne	80
2.5.4. Tractament del melanoma maligne	82
2.5.4.1. Tractament quirúrgic	83
2.5.4.2. Tractament quimioteràpic	84
2.5.4.3. Tractament amb interferó-alfa2b	84
2.5.4.4. Tractament amb interleucina 2	86
2.5.4.5. Tractaments oncogènics	86
2.5.4.6. Tractament amb ipilimumab	87
2.5.4.7. Nous tractaments en desenvolupament	88
<b>2.6. Tiroïditis induïda per interferó</b>	<b>89</b>
2.6.1. Definició	89
2.6.2. Etiopatogènia	89
2.6.2.1. Mecanismes immunològics	90
2.6.2.2. Efectes directes de l'interferó-alfa sobre la tiroide	91
2.6.2.3. Predisposició genètica a la tiroïditis induïda per interferó	92
2.6.3. Diagnòstic i tractament	93
2.6.3.1. Diagnòstic de la tiroïditis induïda per interferó	93
2.6.3.2. Tractament de la tiroïditis induïda per interferó	94

2.6.4. Tiroïditis induïda per interferó en pacients amb infecció crònica pel virus de l'hepatitis C	95
2.6.4.1.-Factors predisposants	96
2.6.5. Tiroïditis induïda per interferó en pacients amb melanoma maligne	97
<b>3. JUSTIFICACIÓ</b>	<b>99</b>
<b>4. HIPÒTESIS DE TREBALL</b>	<b>105</b>
<b>5. OBJECTIUS</b>	<b>109</b>
<b>6. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>115</b>
<b>6.1. Subjectes d'estudi</b>	<b>116</b>
6.1.1. Pacients amb infecció pel virus de l'hepatitis C	116
6.1.2. Pacients amb melanoma maligne	117
6.1.3. Subjectes sans	117
<b>6.2. Mètodes</b>	<b>118</b>
6.2.1. Determinacions sèriques i plasmàtiques	118



6.2.2. Tractament antiviral i definició de la resposta al tractament	118
6.2.3. Quantificació i genotipat del virus de l'hepatitis C, estratificació de la malaltia hepàtica	118
6.2.4. Tractament amb interferó-alfa2b	119
6.2.5. Definició de tiroïditis induïda per interferó	119
6.2.6. Determinació de les subpoblacions limfocitàries per citometria de fluxe	120
<b>6.3. Anàlisi estadística</b>	<b>126</b>
<b>7. INVESTIGACIÓ I RESULTATS</b>	<b>127</b>
<b>7.1. Primer estudi</b>	<b>128</b>
<i>A prospective study of T- and B-lymphocytes subpopulations, CD81 expression levels in B cells and regulatory CD4+CD25+CD127low/-FoxP3+ T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment.</i>	
<b>7.2. Segon estudi</b>	<b>129</b>
<i>A prospective study of lymphocyte subpopulations and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection developing interferon-induced thyroiditis.</i>	

<b>7.3. Tercer estudi</b>	<b>130</b>
<i>Regulatory T cells and other lymphocyte subpopulations in patients with melanoma developing interferon-induced thyroiditis during high-dose interferon-<math>\alpha</math>2b treatment.</i>	
<b>7.4. Resum dels resultats</b>	<b>131</b>
7.4.1. Primer estudi	131
7.4.2. Segon estudi	134
7.4.3. Tercer estudi	137
<b>8. DISCUSSIÓ CONJUNTA</b>	<b>141</b>
<b>9. CONCLUSIONS</b>	<b>159</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>163</b>
<b>11. ANNEX</b>	<b>191</b>

## AGRAÏMENTS

A la Dra. Anna Sanmartí, codirectora d'aquesta tesi i amb qui em vaig formar com a especialista en Endocrinologia i Nutrició. Per la seva gran vàlua tant a nivell humà com professional. Sempre serà un exemple a seguir per mi

A la Dra. Eva Martínez Cáceres, codirectora d'aquest tesi, per introduir-me en el món de la Immunologia.

A la Dra. Maria Jesús Martínez, pel seu ajut, suport i dedicació en la realització dels estudis immunològics.

A la Dra. Núria Alonso, companya i amiga i amb qui vaig començar la meva immersió al món de la Immunologia. Per tot el seu suport, dedicació, ajuda i ànims durant tot aquest temps.

Als meus companys del Servei d'Endocrinologia i Nutrició, la Dra. Eva Aguilera, la Dra. Clara Joaquin, la Dra. Anna Lucas, el Dr. Dídiac Mauricio, la Dra. Sílvia Pellitero, la Dra. Rocío Puig, el Dr. Manel Puig-Domingo i la Dra. Isabel Salinas,. Al Dr. Jordi Reverter pel seu suport informàtic en els moment més crítics. Als residents Dr. Enric Serra, Dra. Elena Guanyabens i Dra. Roxanna Zabala i a l'equip de dietistes. A la Dra. Eulàlia Colomé, a la Dra. Tere Julián i a la Dra. Edu Pizarro, que sempre formaran part de la família d'Endocrinologia de Can Ruti. És un autèntic plaer poder compartir les hores de feina amb un grup com aquest.

A les infermeres Maribel Cuadrado, Isabel Ordóñez i Carme Pérez per la seva col·laboració en l'extracció de les mostres i pel seu ànim i ajut. A l'Eva Garrigó, la nostra secre del Servei. A les infermeres de l'ambulatori Luci Garrido i Yolanda Chicón, i a la Montse, la nostra auxiliar, per tota la seva ajuda i suport.

A la Dra. Marisa Granada, del Laboratori Hormonal, tant per la seva col·laboració en el control de la realització de les determinacions hormonals com pel seu optimisme i suport en les anàlisis estadístiques dels treballs d'aquesta tesi.

A la Yolanda Alba, pel seu suport i pel rigorós treball en el processament de les mostres de l'estudi.

Al Dr. Planas i Dra. Morillas, de la Unitat d'Hepatologia del Servei de l'Àpares Digestiu, al Dr. Boada, del Servei de Dermatologia, i al Dr. Fraile i la Dra. Vallejos, del Servei de Medicina Nuclear, per la seva col·laboració i suport que han permès poder realitzar els treballs d'aquesta tesi.

A la meva família. Al meu pare i a la Carme. A la meva mare i al Toni pel seu suport incondicional. A la meva germana per poder comptar amb la seva complicitat en tots els moments importants.

Al Pau per entendre'm, aguantar-me i ajudar-me, i poder compartir amb ell i l'Elna el present i el futur, fent-me tan feliç.



## ABREVIATURES

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\delta$	Delta
$\varepsilon$	Epsilon
$\lambda$	Lambda
$\kappa$	Kappa
$\omega$	Omega
$\nu$	Nu
AJCC	<i>American Joint Committee of Cancer</i>
APC	Aloficocianina
APRI	<i>AST to platelet ratio index</i> , índex de la ratio aspartat aminotransferasa-plaquetes
ARNm	ARN missatger
AST	Aspartat aminotransferasa
aTg	Anticòsos anti-tiroglobulina
aTPO	Anticòsos anti-peroxidasa tiroïdal
aTSHR	Anticòsos estimadors del receptor de la tirotròpina
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i> , proteïna 2 de la cèl·lula B limfoma
BGS	Biòpsia del gangli sentinella
BT	Temps basal, abans de l'inici del tractament
CD127	Cadena alfa del receptor de la interleucina 7
CMH	Complex major s'histocompatibilitat
CPA	Cèl·lula presentadora d'antigen
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated factor 4</i> , factor 4 associat a limfocits T citotòxics
DMSO	Dimetilsulfòxid
DS	Desviació estàndard
DVP	Drogues per via parenteral
FasL	Unió del Fas/Fas lligand
FCS	Sèrum fetal boví
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>



FITC	Isocianat de fluoresceïna
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FT	Fi del tractament
GITR	Receptor del factor de necrosi tumoral induït per glucocorticoids
HC-C	Infecció crònica pel virus de l'hepatitis C
HDI	<i>High dose interferón treatment</i> , tractament amb altes dosis d'interferó-alfa2b
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferó
IFN- $\alpha$	Interferó-alfa
IFN- $\alpha$ peg	Interferó- $\alpha$ pegilat
IFNAR	Receptor d'interferó alfa/beta
IFNGR	Receptor d'interferó gamma
IFNLR	Receptor d'interferó lambda
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
iNKT	Limfòcits T citolítics naturals invariants
IPEX	<i>Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i>
ISDR	<i>Interferon-sensibility-determining region</i> , regió determinant de la sensibilitat a l'interferó
ISGs	<i>Interferon-stimulated genes</i> , gens estimulats per l'interferó
ISRE	<i>Interferon-stimulated response elements</i> , elements de resposta estimulats per l'interferó
Jak	Janus quinasa
iTregs	Cèl·lules T reguladores induïdes
MAT	Malaltia autoimmunitària tiroïdal
MGB	Malaltia de Graves-Basedow
MFI	Intensitat mitjana de fluorescència
MM	Melanoma maligne
MT	Meitat del tractament
mTg	<i>Mouse thyroglobulin</i> , ratolí tiroglobulina

NIS	Transportador de sodi-iode
NK	<i>Natural killer</i> , limfòcits citolítics naturals
NKT	Limfòcits T citolítics naturals
NOD	<i>Non obese diabetic mice</i> , ratolí no obès diàbetic
NR	No responedors
NRP	No responedors precoços
NRPar	Responedors parcials
NS	<i>Nonstructural proteins</i> , proteïnes no estructurals
nTregs	Cèl·lules T reguladores naturals
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PBS	Solució salina tamponada amb fosfats
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeriterina
PECy5	Ficoeritrina-cianina 5
PD-1	<i>Programmed death 1</i> , proteïna 1 de la mort cel·lular programada
PT	24 setmanes post-tractament
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase 22</i> , proteïna tirosina fosfatasa 22
RBV	Ribavirina
RCB	Receptor de cèl·lula B
RCT	Receptor de cèl·lula T
RVP	Resposta virològica precoç
RVR	Resposta virològica ràpida
RVS	Resposta viral sostinguda
RVT	Resposta virològica tardana
Stat	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> , transducció de senyals i activació de la transcripció
T3t	5, 3'-triiodetironina total
T4ll	Tiroxina lliure
TAE	Tiroiditis autoimmunitària experimental
Tc	Limfòcits T CD8 <sup>+</sup> o citotòxics

---

TD	Tiroiditis destructiva
Teff	Cèl·lules T efectores
Tg	Tiroglobulina
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , factor de creixement transformant
Th	Limfòcits T CD4 <sup>+</sup> <i>helper</i> o col·laboradors
TH	Tiroiditis de Hashimoto
TII	Tiroiditis induïda per interferó
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> , factor de necrosi tumoral
TPO	Peroxiadasa tiroïdal
Tregs	Cèl·lules T reguladores
Ts	Limfòcits T supressors
TSH	Tirotropina
TSHR	Receptor de la tirotropina
TT	Temps d'aparició de la tiroiditis induïda per interferó
Tyk	Tirosin-quinasa
UTR	<i>Untranslated regions</i> , regions no traduïdes
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , factor de creixement endotelial vascular
VHB	Virus de l'hepatitis B
VHC	Virus de l'hepatitis C
VIH	Virus de la immunodeficiència humana



# 1. PRESENTACIÓ

Aquesta tesi es presenta en forma de compendi de publicacions segons la normativa aprovada per la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El seu nucli principal són tres articles originals que han estat publicats en revistes en les que el doctorand és el primer signant de tots ells.

Aquests articles intenten fer una aproximació a la tiroïditis induïda per l'interferó, i més concretament a la implicació del sistema immunitari en la patogènia d'aquesta entitat. Per aquest motiu s'han estudiat diverses subpoblacions limfocitàries en pacients amb infecció crònica pel virus de l'hepatitis C que desenvolupen tiroïditis induïda per interferó. També s'han avaluat les subpoblacions limfocitàries en pacients amb infecció crònica pel virus de l'hepatitis C i la seva relació amb la resposta al tractament. Finalment, s'han avaluat diverses subpoblacions limfocitàries en pacients amb melanoma maligne que desenvolupen tiroïditis induïda per interferó.

Aquest estudi ha estat finançat, en part, per una beca del *Fondo de Investigaciones Sanitarias* de l' *Instituto Carlos III* (PI051510) concedit l'any 2005 (investigadora principal Dra. Anna Sanmartí i Sala) i per l'Ajut per la Recerca de la Societat Catalana d'Endocrinologia i Nutrició concedit l'any 2009 (investigador principal Dra. Berta Soldevila i Madorell).

## 2. INTRODUCCIÓ

## 2.1.- MALALTIA AUTOIMMUNITÀRIA TIROÏDAL. ETIOPATOGENÈIA.

La malaltia autoimmunitària tiroïdal (MAT) afecta entre el 1-2% de la població<sup>(1)</sup> i representa més del 30% de totes les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan, essent la més freqüent<sup>(2)</sup>. La classificació actual de la MAT inclou les dues entitats principals, que són la tiroïditis crònica autoimmunitària o també anomenada tiroïditis de Hashimoto (TH) i la malaltia de Graves-Basedow (MGB). Així mateix, també inclou variants de la TH com la tiroïditis post-part i la tiroïditis esporàdica, i la tiroïditis atròfica autoimmunitària o mixedema primari<sup>(3)</sup>. La MAT es caracteritza per una infiltració de la glàndula tiroide de limfòcits T i B que reaccionen contra antígens tiroïdals propis<sup>(2)</sup> i que provoquen una disfunció de la glàndula tiroïdal, que pot cursar amb hiper o hipofunció.

Com en la majoria d'altres malalties autoimmunitàries, la seva etiologia és multifactorial. Es requereix una combinació adequada de factors genètics, ambientals i endògens per tal d'iniciar l'autoimmunitat tiroïdal. Tot i així, actualment encara hi ha un cert desconeixement sobre la MAT, i més concretament, sobre els mecanismes específics del seu inici i progressió, així com sobre la interacció concreta entre els autoantígens tiroïdals i el sistema immunitari.

En models experimentals, hi ha estudis que suggereixen que determinants gens implicats en la immunoregulació donen lloc a la intolerància cap a antígens propis<sup>(4)</sup>. Aquests gens determinarien la forma en què un individu és propens a desenvolupar la MAT i podrien ser essencials pel desenvolupament de la malaltia o per incrementar la susceptibilitat individual a desenvolupar-la. Entre



els gens descrits, s'inclouen el locus del gen de les molècules de classe II del complex major d'histocompatibilitat o CMH (HLA o *Human Leukocyte Antigen* en humans)-DR<sup>(5-8)</sup> així com gens no-HLA, més relacionats amb la regulació del metabolisme i la susceptibilitat del teixit tiroïdal. D'aquests gens no-HLA destaquen el del factor 4 associat a limfocits T citotòxics (*cytotoxic T lymphocyte-associated factor 4* o CTLA-4)<sup>(9-12)</sup>, el del CD40<sup>(13, 14)</sup>, el de la proteïna tirosina fosfatasa 22 (*protein tyrosine phosphatase-22* o PTPN22)<sup>(15, 16)</sup>, el de la tiroglobulina (Tg)<sup>(17, 18)</sup> així com els gens del receptor de la tirotropina (TSHR)<sup>(19, 20)</sup>.

Basant-se en estudis realitzats a bessons homozigots, s'ha estimat que entorn el 70-80% de la susceptibilitat per desenvolupar la MAT és de base genètica<sup>(21)</sup> i que el 20-30% restant és degut a factors ambientals. Entre aquests últims, s'ha descrit l'excés o el dèficit de iode, el dèficit de seleni, l'estrés, l'ús d'anticonceptius orals, el tabaquisme, les al·lèrgies, la radiació de la glàndula tiroide, infeccions víriques i bacterianes, tòxics ambientals com per exemple els bifenils policlorats o les isoflavones, i fàrmacs com l'amiodarona, que induïrien l'aparició de MAT en pacients genèticament susceptibles<sup>(22-24)</sup>. El tractament immunomodulador amb interferó-alfa (IFN- $\alpha$ ) és un altre desencadenant implicat en la MAT, tot i que actualment encara es desconeixen els mecanismes concrets pels quals aquest indueix aquesta resposta.

Els factors endògens poden passar desaparebuts, tot i que per exemple, és ben conegut que el període post-part és un factor de risc important per desenvolupar tant hipotiroïdisme autoimmunitari com la MGB. També s'ha descrit el gènere femení i l'edat com a factors de risc pel desenvolupament de la MAT<sup>(22, 24)</sup>.

## 2.2.-REGULACIÓ DE LA RESPOSTA AUTOIMMUNITÀRIA

La funció principal del sistema immunitari és distingir entre els antígens propis i els estranys per tal de poder identificar i eliminar microorganismes i molècules alienes que puguin agredir a les cèl·lules i teixits propis. En condicions fisiològiques, els antígens propis es toleren i la resposta immunològica es dirigeix cap als antígens estranys. Tot i així, a principis del segle passat, Paul Erlich va definir per primer cop el concepte d'autoimmunitat en constatar que el sistema immunològic podia atacar, de forma errònia, antígens propis enlloc de foranis, i va suggerir que aquest fet podria ser el responsable de un tipus de malalties que va anomenar malalties autoimmunitàries<sup>(25)</sup>, entre les quals es troba la MAT.

Actualment, l'autoimmunitat segueix essent un aspecte del funcionament del sistema immunològic no del tot comprès. L'any 1996, Isabelle André i col·laboradors van proposar, basant-se en la diabetis del ratolí no obès diabètic (*non obese diabetic*, NOD), uns punts de control o *check-points* que, si fallaven successivament, podien donar lloc a la generació de respostes autoimmunitàries<sup>(26)</sup>. Recentment, Christopher C. Goodnow ha ampliat aquest concepte<sup>(27)</sup>. Seguint aquests plantejaments, la patogènia de les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan podria dividir-se en diferents etapes que estarien regulades cadascuna d'elles per varis punts de control. Aquestes etapes i punts de control es poden agrupar en 4 grans nivells: la tolerància central, la tolerància perifèrica, la presentació antigènica en el teixit diana i els mecanismes autopèrpetuadors o de cronificació. Aquesta tesi doctoral es centrarà

principalment en els *check-points* de la tolerància, més concretament en la tolerància perifèrica, que es definirà en el següent apartat.

### 2.2.1.Sistema de tolerància immunològica

La prevenció de l'autoimmunitat depèn dels mecanismes controladors dels limfòcits T autoreactius, entre els que s'inclouen la tolerància immunològica, tant central com perifèrica. Les cèl·lules T reguladores, l'anèrgia clonal i l'apoptosis formen part dels mecanismes de tolerància perifèrica<sup>(28, 29)</sup>.

#### 2.2.1.1.-Tolerància central

Els mecanismes de tolerància central tenen lloc al òrgans limfoidals primaris i la seva funció és la d'eliminar els clons de limfòcits T i B, al timus i al moll d'os respectivament, que tinguin receptors que reconeguin els antígens propis amb una alta afinitat abans de que surtin a la perifèria.

El repertori de cèl·lules T es genera en el timus. El procés de selecció i maduració de cèl·lules o limfòcits T es realitza de forma seqüencial en el còrtex i la medul·la tímica. Les cèl·lules T immadures migren des del moll de l'os al timus, on comencen a expressar receptors per antígens. La majoria d'aquests receptors tenen dues cadenes, alfa ( $\alpha$ ) i beta ( $\beta$ ), i s'anomenen receptors  $\alpha\beta$ . Aquests receptors reconeixen un pèptid immunogènic localitzat en la molècula de l'HLA, formant el complex pèptid-antigen-HLA. En el timus, les cèl·lules epitelials i altres cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) mostren una àmplia

varietat de complexos compostos de pèptids propis units a molècules HLA<sup>(30)</sup>. Aquesta representació interna tan completa dels antígens propis del cos humà s'ha anomenat expressió promíscua i permet mantenir un grau apropiat de tolerància a antígens perifèrics<sup>(31)</sup>. En la zona capsular tímica, els timòcits que es generen passen per un procés de *selecció positiva* que permet la supervivència dels timòcits amb els receptors de cèl·lula T (RCT) capaços d'interaccionar amb suficient afinitat amb les molècules HLA pròpies. Posteriorment, aquests timòcits migren a la zona medul·lar del timus on es produeix una *selecció negativa*, eliminant-se les cèl·lules amb RCT que reconeixen molècules HLA amb pèptids propis amb una alta afinitat<sup>(32)</sup>. Només el 3% dels precursors de cèl·lules T que entren en el timus sobreviuen a la selecció positiva i negativa<sup>(33)</sup>. Tot i així, aquests mecanismes no són perfectes i alguns limfòcits autoreactius aconsegueixen escapar-se i arribar al òrgans limfoides secundaris.

#### 2.2.1.2.-Tolerància perifèrica

Els mecanismes de tolerància perifèrica són els que s'encarreguen de la supressió, activació i producció de citoquines dels limfòcits T autoreactius, impedit que reaccionin contra antígens propis. És un fet acceptat que les cèl·lules T autoreactives estan presents en individus sans i que la seva presència per sí sola no implica necessàriament l'inici d'una malaltia autoimmunitària. Per tant, és probable que per tal que apareixi una malaltia autoimmunitària es requereixi, a més de la presència de cèl·lules autoreactives, una alteració en els

mecanismes de tolerància perifèrica, fet que recolzaria la hipòtesi d' errades a varis nivells o *checkpoints* en el procés autoimmuntari.

#### 2.2.1.2.1.-Cèl·lules T reguladores

Les cèl·lules T reguladores (Tregs) representen el 10% dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> perifèrics i formen part dels mecanismes de tolerància perifèrica, prevenint l'autoimmunitat espontània. La seva funció principal és mantenir l'homeòstasi del sistema immuntari, evitant que els limfòcits T autorreactius que han escapat de la selecció tímica, reaccionin contra els antígens propis<sup>(34)</sup>.

Les Tregs van ser descrites i caracteritzades fenotípicament per S. Sakaguchi l'any 1995<sup>(35)</sup>. El seu grup va observar l'absència de la població de limfòcits T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en un model murí d'autoimmunitat induïda per timectomia. A més, també es va constatar que la malaltia es podia evitar si es transferia als ratolins malalts aquest subgrup de limfòcits T procedents de la melsa d'altres animals que no patien malalties autoimmuntàries, en no estar timectomitzats<sup>(35, 36)</sup>. Inicialment, les Tregs van ser definides per la coexpressió de CD4 i CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de la interleucina 2). Posteriorment, es va observar que les cèl·lules que realment exercien una funció supressora eren aquelles que tenien una alta expressió de CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>)<sup>(37)</sup>. Malauradament, la definició de Tregs basada en el grau d'expressió de CD25 no s'ha realitzat de forma universal i aquest fet dificulta la comparació entre diferents estudis. De fet, el CD25 no es considera un marcador específic de les Tregs donat que també s'expressa a les cèl·lules T durant la seva activació

antigènica<sup>(38)</sup>, incloent així cèl·lules T efectores (Teff) en la població de Tregs. Fa pocs anys es va identificar un marcador que, en principi, s'expressava de forma específica a les Tregs. Aquest marcador és el factor de transcripció *Forkhead box P3* (FoxP3), que es caracteritza per presentar una hèlix amb ales (*Forkhead*), i és necessari tant pel desenvolupament com per la funcionalitat de les Tregs<sup>(39)</sup>. Per tant, l'expressió de FoxP3 en els limfòcits T es va convertir en el *gold standard* per la definició de les Tregs. Les mutacions del gen que codifica el FoxP3 (FOXP3) donen lloc, tant en humans com en ratolins, a alteracions en el desenvolupament i la funcionalitat de les Tregs que es tradueixen en una patologia autoimmunitària inflamatòria multiorgànica, letal en la majoria de casos<sup>(40)</sup>. La mutació del gen FOXP3 en humans és la responsable de la malaltia IPEX (*immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) caracteritzada per estar lligada al cromosoma X, per la presència de diverses patologies autoimmunitàries (gastritis autoimmunitària, tiroïditis i diabetis mellitus tipus 1), de malaltia inflamatòria intestinal, de diverses al·lèrgies, i per requerir transplantament de moll d'os a la infància<sup>(41, 42)</sup>. Els estudis efectuats en pacients amb IPEX mostren que el nombre de Tregs en sang perifèrica d'aquests pacients pot variar, essent inclús normal. En canvi, en tots ells hi ha una alteració de la funcionalitat de les Tregs, el grau del qual estaria relacionat amb la gravetat de la mutació del gen<sup>(43)</sup>. La mutació del gen FOXP3 en ratolins, que es tradueix en un dèficit de Tregs<sup>(44)</sup>, és la responsable del ratolí *scurfy*<sup>(40)</sup>, caracteritzat per una síndrome autoimmunitària letal. Tot i que actualment no es coneix la funció específica del FOXP3, tot sembla indicar que aquesta seria indirecta a través d'amplificar i estabilitzar la transcripció de diversos gens específics de regulació.

Recentment, s'ha posat en dubte que el FoxP3 sigui definitori de les Tregs en humans, ja que FoxP3 també està present en els limfòcits T memòria<sup>(45)</sup>. Donat que les cèl·lules amb major capacitat supressora que són FoxP3 positives presenten en la seva membrana una baixa concentració de la cadena  $\alpha$  del receptor de la interleucina 7 (CD127)<sup>(46)</sup>, es considera que la baixa expressió cel·lular de CD127 en les Tregs permetria diferenciar-les de les cèl·lules T convencionals, que presentarien una alta expressió de CD127<sup>(47)</sup>. És per aquest motiu que alguns grups utilitzen, pel estudis de funcionalitat *in vitro*, la baixa expressió cel·lular de CD127 com a biomarcador per aïllar i identificar les Tregs, juntament amb FoxP3, i sovint en combinació amb el CD25<sup>(48)</sup>. S'han descrit altres marcadors presents a les Tregs com ara CD45RB, CD152, CTLA-4, el receptor del factor de necrosi tumoral induït per glucocorticoids (GITR), CD134 i CD62L. Aquests marcadors també estan presents en altres tipus cel·lulars, pel què actualment es consideren de poca utilitat<sup>(49)</sup>.

S'ha suggerit que les Tregs es sintetitzen en el timus normal com a llinatge independent, és a dir, que exerceixen la seva funció supressora sense necessitat de ser activades per l'antigen. Tot i així, les Tregs també es poden generar a la perifèria (Tregs induïdes) a partir de cèl·lules T verges o *naïve*, que mai han contactat amb cap antigen, i que es diferencien cap a Tregs després del seu contacte amb l'antigen<sup>(50)</sup>. D'aquesta forma, les Tregs es poden dividir en dos grans grups: les cèl·lules naturals derivades del timus (nTregs) i les perifèriques induïdes (iTregs). Les iTregs expressen els mateixos marcadors que les nTregs i suprimeixen les respostes immunològiques mitjançant els mateixos mecanismes. Tot i les similituds que presenten, es poden distingir entre sí ja que les nTregs

presenten un locus FOXP3 desmetilat<sup>(51)</sup> i expressen el factor de transcripció Helios<sup>(52)</sup> i en canvi, les iTregs no.

El mecanisme pel qual les Tregs realitzen la supressió no es coneix de forma precisa, però per tal de que aquesta es realitzi, és necessari el factor de transcripció FoxP3<sup>(53)</sup>. Es creu que la supressió s'exerciria mitjançant el contacte cèl·lula a cèl·lula<sup>(54)</sup>. Així, els defectes en la regulació de les cèl·lules T podrien ser deguts tant a defectes en el nombre com en la funció de les Tregs, com a una resistència de les Teff a la supressió mediada per les Tregs<sup>(55)</sup>.

Estudis en models animals i en humans han mostrat que els defectes en el nombre o la funció de les Tregs poden contribuir a l'aparició de les malalties autoimmunitàries i que teràpies dirigides a aquests defectes poden potencialment prevenir i inclús curar aquestes malalties. Els pacients amb IPEX són un exemple de com un nombre inadequat de Tregs permet el desenvolupament d'autoimmunitat en humans, donat que aquests pacients presenten una mutació del FOXP3 i en conseqüència, una absència absoluta de Tregs<sup>(41)</sup>. Tot i així, la majoria de pacients amb malalties autoimmunitàries presenten, probablement, una reducció més modesta de Tregs. En aquestes patologies més comuns, el repte és determinar si el nombre de Tregs és inadequat en el lloc de la inflamació i si és degut a factors sistèmics o a factors locals tissulars. L'anàlisi quantitativa de les Tregs en sang perifèrica de la majoria de malalties autoimmunitàries és molt variable, estant les Tregs normals<sup>(56, 57)</sup>, disminuïdes<sup>(58, 59)</sup> o inclús augmentades<sup>(60)</sup>. Tot i així, la comparació entre els estudis es troba un cop més limitada pel fet que els marcadors moleculars utilitzats per a definir les Tregs no han estat sempre els mateixos. A més, cal valorar la manera com el nombre de Tregs en sang perifèrica



refleixen el nombre global de Tregs i, més específicament, el nombre en els teixits inflamats. Malgrat que la majoria d'estudis realitzats en pacients amb malalties autoimmunitàries han valorat únicament les Tregs en sang perifèrica, en alguns casos, com en l'artiritis reumatoide i la malaltia inflamatòria intestinal en fase activa, s'han valorat també a nivell tissular, describint-se un nombre més elevat en el teixit diana que en sang perifèrica<sup>(59, 61)</sup>. Aquest augment del nombre de Tregs en el teixit diana suggeriria que la falta de regulació en el teixit inflamat pogués ser deguda a alteracions en la funcionalitat de les Tregs.

De fet, el coneixement actual de les Tregs en malalties autoimmunitàries humanes indica que probablement els defectes funcionals són els que tenen un major impacte en la malaltia. Les causes d'aquests defectes funcionals són múltiples i poden incloure tant defectes intrínsecs de les Tregs i les Teff com factors extrínsecs presents en el lloc de la inflamació. La identificació dels defectes de la funció de les Tregs comporta una gran dificultat degut als múltiples mecanismes utilitzats per les Tregs per suprimir la inflamació<sup>(62)</sup> i pels mètodes amb els que es mesura la seva capacitat de supressió. A més, la valoració de la funcionalitat de les Tregs en humans requereix l'ús d'assajos *in vitro* que, donades les característiques de les Tregs en sang perifèrica, s'han de realitzar amb un baix nombre de cèl·lules i amb una limitació del tipus i la qualitat dels assajos que es poden realitzar. Finalment, degut a que el FoxP3 és una proteïna nuclear, l'avaluació de la seva expressió en els limfocits T requereix una fixació i permeabilització d'aquestes cèl·lules que impedeix l'obtenció de cèl·lules viables per realitzar anàlisis funcionals. Tot i així, la majoria d'estudis realitzats en pacients amb malalties autoimmunitàries en les que s'ha valorat la funcionalitat

de les Tregs, coincideixen en afirmar que aquesta es troba disminuïda en comparació amb la de la població sana<sup>(59, 61)</sup>.

D'altra banda, en diferents models experimentals d'autoimmunitat s'ha observat una resistència de les Teff a les Tregs. En aquests models, la inflamació i la destrucció tissular progressa, tot i la presència de Tregs funcionals en el lloc de la inflamació. Aquestes troballes suggereixen que la resistència de Teff a les Tregs pot contribuir a la progressió de la malaltia. Aquest fenomen s'ha descrit en dos models de ratolins diabètics (el ratolí NOD<sup>(63, 64)</sup> i el ratolí DO-11.10 RIP-mOVA<sup>(65)</sup>), en el model experimental d'esclerosi múltiple, l'encefalomielitis experimental autoimmunitària<sup>(66)</sup> i en el model murí de lupus eritematós sistèmic, el ratolí MRL-lpr<sup>(67)</sup>. S'han suggerit múltiples mecanismes pels quals les Teff esdevenen resistents a la supressió. Aquests mecanismes inclouen defectes intrínsecs d'aquestes cèl·lules, alteracions en la seva activació i la seva exposició a factors de creixement<sup>(68)</sup>. Cadascun d'aquests defectes descrits anteriorment podria contribuir, per sí sol o en combinació, al desenvolupament de malalties autoimmunitàries en humans.

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, s'ha evienciat en models experimentals vàries malalties autoimmunitàries que les Tregs tenen un paper important. Concretament, en el model de la tiroïditis autoimmunitària experimental (TAE), s'ha demostrat que canvis en la funcionalitat de les Tregs influencien en la susceptibilitat i/o en la resistència a desenvolupar tiroïditis<sup>(69)</sup>. A més, en aquest model també s'ha demostrat que la disminució de les Tregs afavoreix el desenvolupament de la tiroïditis induïda amb tiroglobulina de ratolí (*mouse thyroglobulin*, mTg) tant en ratolins genèticament resistents com en aquells

genèticament susceptibles<sup>(70, 71)</sup>. Tot i així, és difícil trobar evidències similars en humans degut a les diferències evidents que existeixen entre els models animals i la MAT en humans. A més, hi ha pocs estudis que hagin estudiat les Tregs en humans amb MAT, essent els resultats discordants tant els efectuats en sang perièrica com en teixit tiroïdal<sup>(72-74)</sup>. A més, la comparació entre estudis és difícil degut als diferents fenotips utilitzats per la valoració de les Tregs i a què la MAT s'ha avaluat en diferents estadis evolutius.

#### 2.2.1.2.2.-Altres cèl·lules reguladores

Tot i que les cèl·lules reguladores que més s'han estudiat han estat les Tregs, s'han descrit una àmplia varietat de poblacions de cèl·lules reguladores que controlen la resposta immunològica en diferents punts i mitjançant diversos mecanismes. És tal la diversitat de cèl·lules reguladores, que s'ha arribat a comparar-la amb la varietat de gustos i olors que existeixen<sup>(75)</sup>. Entre les descrites s'inclouen els limfòcits T CD4<sup>+</sup>, els T CD8<sup>+</sup>, els limfòcits T gamma-delta ( $\gamma\delta$ ), els limfòcits citolítics naturals (*natural killer*, NK), els limfòcits T citolítics naturals (NKT) i el seu subgrup NKT invariant (iNKT), els limfòcits CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> i els limfòcits B. La seva existència s'ha deduït per dades funcionals degut a que actualment no es coneix cap marcador específic que pugui distingir-les d'altres subpoblacions cel·lulars amb capacitat col·laboradora o citotòxica<sup>(45)</sup>.

En relació a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> reguladores o tolerogèniques, s'han descrit diferents subgrups<sup>(76)</sup> i d'aquests, el que més s'ha estudiat és el subgrup de cèl·lules que tenen el fenotip CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Aquestes cèl·lules realitzen la seva

funció a través del reconeixement d'antígens en el CMH o HLA de les cèl·lules dendrítiques, convertint-les en tolerògenes mitjançant el bloqueig de l'expressió de molècules coestimuladores, fet que impedeix a la vegada, l'activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> col·laboradores (Th)<sup>(77)</sup>. Un altre grup de cèl·lules reguladores són els limfòcits NKT que presenten tant característiques dels limfòcits T, com la presència a la seva superfície de RCT, com de les cèl·lules NK, en expressar receptors propis de cèl·lules NK com el CD161. Tot i que la seva funció toleragència no es coneix suficientment, sembla que aquesta està mitjançada per interaccions amb altres cèl·lules reguladores i la secreció de citokines moduladores de la resposta, com la interleucina (IL)-4, IL-10 i el factor de creixement transformant (*transforming growth factor*, TGF)- $\beta$ <sup>(78)</sup>. Per altra banda, els limfòcits B reguladors s'han relacionat amb la pèrdua de la tolerància en models experimentals d'autoimmunitat, infeccions i càncer i són fàcilment identificables ja que són CD1d<sup>hi</sup> i CD5<sup>+</sup><sup>(45)</sup>. La seva activitat reguladora sembla estar condicionada per la producció de citocines immunomoduladores, com IL-10 i TGF- $\beta$ , i per la capacitat d'interactuar directament amb limfòcits T autorreactius, als quals són capaços d'inhibir<sup>(79)</sup>.

#### 2.2.1.2.3.-Anèrgia clonal

L'anèrgia clonal forma part dels mecanismes de tolerància perifèrica. Alguns limfòcits T circulants autorreactius no proliferen en resposta a la presentació d'un autoantigen en el context apropiat i es considera que aquests limfòcits estan en una situació de no resposta denominada anèrgia que, a

vegades, es pot revertir experimentalment mitjançant el tractament amb altes concentracions de IL-2. Es creu que la inducció d'aquest estat d'anèrgia podria ser degut a una activació incompleta del limfòcit. Aquest concepte es basa en què per aconseguir la plena activació del limfòcit T es requereix una segona senyal co-estimuladora al mateix temps que la primera, derivada del reconeixement de l'antigen. Aquesta segona senyal és proporcionada per les CPA, com ara els macròfags i les cèl·lules dendrítiques, i només es produeix quan les CPA entren en contacte amb determinades molècules presents en agents patògens o exògens. Quan les CPA presenten exclusivament antígens propis, no expressen les molècules coestimuladores (segona senyal) i per tant, els limfòcits que reconeixen els pèptids propis no s'activen i a més, es queden en una situació de no resposta davant estímuls, és a dir anèrgia, que en molts casos és fonamental per prevenir la resposta enfront antígens propis. Aquesta insuficient coestimulació no permet produir la suficient IL-2 per part del limfòcit T, que és necessària per la seva proliferació i aquest factor podria ser el determinant pel desenvolupament d'aquesta situació d'anèrgia<sup>(25)</sup>.

#### 2.2.1.2.4.-Apoptosi

L'apoptosi o mort cel·lular programada implica l'activació seqüencial d'una sèrie de enzims proteolítics coneguts com a caspases que progressivament digereixen la cèl·lula i el seu material genètic. La cascada caspasa s'activa per dues vies: l'extrínseca i la intrínseca. La via apoptòtica extrínseca es duu a terme mitjançant la unió de receptors de mort cel·lular amb un lligant específic.

D'aquesta via, la que més s'ha estudiat és la unió del Fas/Fas lligand (FasL). En canvi, la via intrínseca s'indueix en resposta a nombrosos estímuls com la retirada de factors de creixement i hormones tròfiques i està regulada per proteïnes tant de tipus antiapoptòtiques, com les del grup de la proteïna 2 de la cèl·lula B limfoma (Bcl-2, *B cell lymphoma 2*), com proapoptòtiques, com les proteïnes Bax/Bax-like. El Bcl-2 regula l'apoptosi mitjançant la seva implicació en el desenvolupament dels limfòcits, en l'establiment de la tolerància central i en el manteniment de la tolerància perifèrica. L'aparició d'autoimmunitat, tant en humans com en models experimentals en ratolins, s'ha relacionat amb defectes en la senyalització de l'apoptosi regulada per Bcl-2<sup>(80)</sup>. A més, hi ha indicis que l'expressió de molècules antiapoptòtiques com Bcl-2 pot estar regulada tant per les cèl·lules tiroïdals com pels limfòcits en un intent d'evitar la mort apoptòtica<sup>(81, 82)</sup>.

En relació a la MAT, s'ha proposat que la destrucció de les cèl·lules tiroïdals tan característica de la TH podria ser causada per un increment de l'apoptosi. La TH es caracteritza histològicament per una infiltració massiva de cèl·lules limfoidals a l'interior o al voltant de les cèl·lules foliculars tiroïdals<sup>(83)</sup>. En àrees on s'observen cèl·lules foliculars intactes pròximes a les cèl·lules infiltrants immunes, les cèl·lules de la tiroide apareixen apoptòtiques, la qual cosa suggeriria una destrucció immunològica d'aquestes cèl·lules<sup>(84)</sup>. S'ha proposat que la disminució de l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 en els tirocits dels pacients amb HT podria afavorir l'apoptosi de les cèl·lules tiroïdals. Aquest fet juntament amb la inducció de l'expressió de Fas en els tirocits<sup>(82)</sup> podria ser un dels mecanismes de la mort apoptòtica de les cèl·lules

tiroidals observada en la TH. En canvi, en la MGB, el grau d'infiltració limfocitària en la tiroide és menor i la taxa d'apoptosi en els tirocits també és menor que la observada en la TH<sup>(85)</sup>.

### 2.2.2.- Cèl·lules T col·laboradores

El sistema immunitari, a través de la immunitat innata i la immunitat adaptativa, és l'encarregat de protegir l'organisme enfront de qualsevol tipus d'agressió, generalment microbianes, que poden afectar a cèl·lules o teixits. La immunitat innata s'anomena així perquè els seus components estan sempre presents i poden actuar immediatament sense temps de latència entre l'estímul i el desencadenament de la seva acció. Tot i així, la resposta defensiva més eficaç és la de la immunitat adaptativa, que permet la identificació i eliminació dels microorganismes i molècules alienes que han aconseguit escapar de la immunitat innata gràcies a la coordinació de diferents grups cel·lulars amb funcions molt diverses. La immunitat adaptativa és una resposta més tardana i específica i està dotada de memòria immunològica, fet que permet una resposta immunològica immediata en cas que l'organisme es torni a infectar pel mateix patògen. El procés de la resposta immunològica adaptativa consta de cinc fases: el reconeixement de l'antigen estrany; la identificació, activació i expansió de les cèl·lules amb molècules que reconeixen específicament a aquest antigen, donant lloc a clons antigen-específics; la diferenciació de les cèl·lules en repòs a cèl·lules amb fenotip efector; el desenvolupament de la resposta pròpiament dita: les

cèl·lules o els seus productes inactiven i eliminen els patògens; i la inactivació de les cèl·lules efectores un cop resolta la situació.

El procés de reconeixement d'antígens, activació i inici de l'activitat efectora dels limfòcits T té lloc en els primers passos de la resposta immunològica i requereix un intercanvi d'informació entre la cèl·lula que ha identificat i processat al patogen i el limfòcit T. Aquest procés es dona en una estructura multimolecular formada entre ambdues cèl·lules anomenada sinapsi immunitària.

La CPA aporta informació al limfòcit T a través de diversos tipus de senyals: la primera és el reconeixement de l'antigen per part del receptor de la cèl·lula T, quan li és presentat unit a les molècules del CMH de la CPA; la segona o senyal de conformitat, la rep el limfòcit T a través de l'antigen CD28, que interactua amb molècules de la CPA; i la tercera està mediada per citocines i determina el tipus de resposta que efectuarà i la intensitat d'aquesta<sup>(86)</sup>.

En la dècada de 1970, les primeres cèl·lules encarregades de la coordinació de la resposta immunològica adaptativa que es van descriure van ser els limfòcits T. A finals d'aquella dècada se'ls va classificar en 3 subgrups segons la seva capacitat funcional: els limfòcits T CD8<sup>+</sup> o citotòxics (Tc), amb capacitat efectora; els limfòcits T CD4<sup>+</sup> o col·laboradors o *helper* (Th), encarregats de coordinar l'acció efectora dels diferents tipus cel·lulars; i els limfòcits T supressors (Ts), encarregats de suprimir la resposta immunològica un cop s'hagués eliminat la molècula aliena.

Durant la dècada de 1980 es va profunditzar sobre el coneixement de la funcionalitat dels limfòcits T i es van identificar 2 tipus de respostes



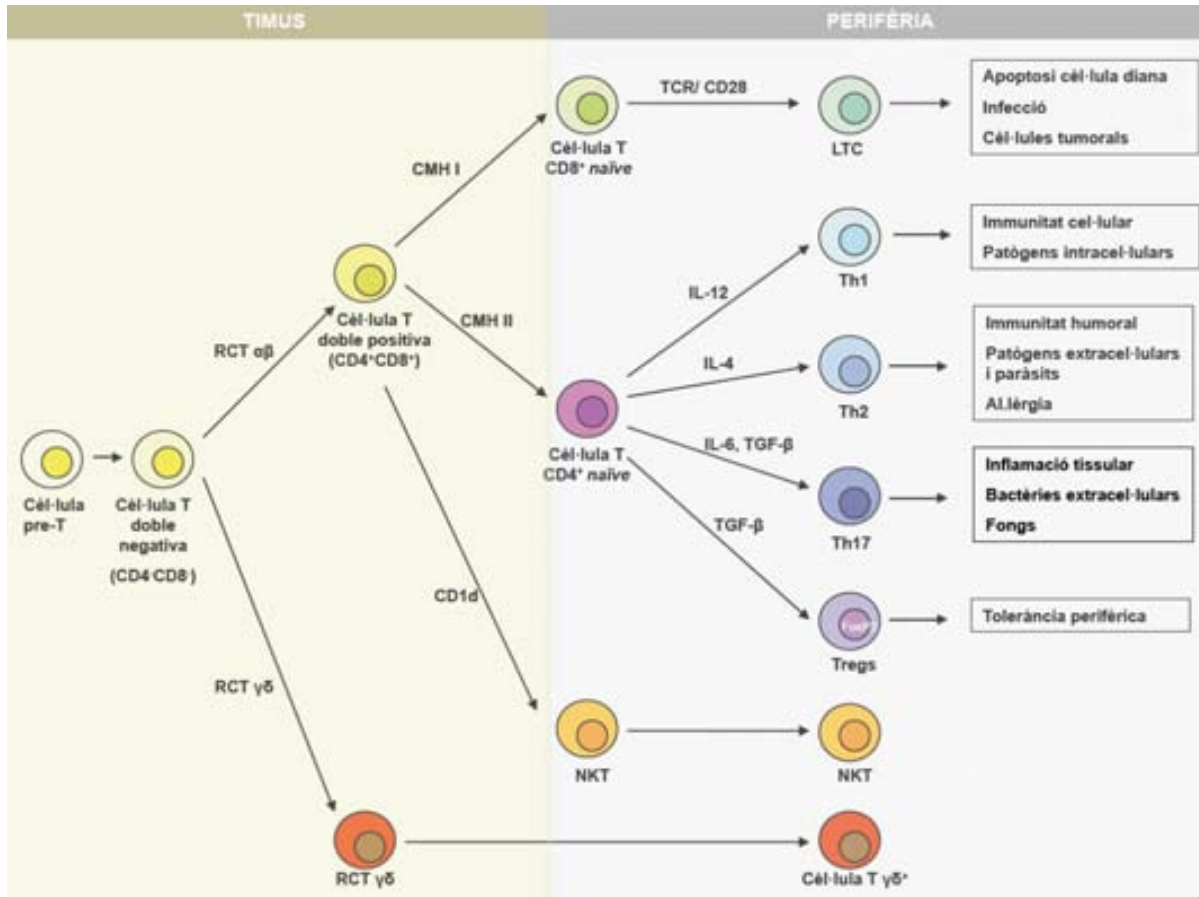
col·laboradores: la resposta Th1 o immunitat cel·lular, que regula la resposta immunològica mediada per cèl·lules i la inducció del dany cel·lular a través de l'activació del mecanisme citotòxic<sup>(87, 88)</sup> i que és altament efectiva en l'eliminació de patògens intracel·lulars; i la resposta Th2 o immunitat humoral, que s'activa per proporcionar ajuda als limfòcits B per la producció d'immunoglobulina específica i que és de gran importància en l'eliminació de microorganismes extracel·lulars i paràsits<sup>(89)</sup>. Aquesta divisió en 2 subtipus es va basar en les citocines que eren capaços de secretar un cop activats, i amb les que modulaven a diversos tipus cel·lulars. Es va denominar Th1 als limfòcits secretors de IFN- $\gamma$ , factor de necrosi tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF)- $\alpha$ , IL-2; i Th2 als limfòcits que alliberen principalment IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13. La diferenciació en Th1 i Th2 a partir dels limfòcits quiescents es determina en la sinapsi immunitària, en funció de les citocines presents. Aquestes funcionen com a terceres senyals durant el procés d'activació. Així, la IL-12 promou la transformació en cèl·lules Th1 i la IL-4 promou la transformació en cèl·lules Th2<sup>(90)</sup>.

Aquesta classificació de les cèl·lules col·laboradores s'ha revisat degut a descobriments recents, com ara la identificació de la família de citocines de la IL-17 i l'estudi de les seves funcions efectores. L'existència d'un tercer grup de cèl·lules es va deduir en comprovar que les cèl·lules T tractades amb pèptids microbians en presència de *Borrelia burgdorferi*, que és l'agent de la malaltia de Lyme, produïen IL-17. Aquesta citocina no és elaborada ni per les Th1 ni per les Th2, fet que implica la existència d'un nou subgrup de limfòcits T (CD4<sup>+</sup>) que secreten IL-17 i que coordinen la resposta immunològica d'una manera diferent a les Th1 i Th2<sup>(90)</sup>. Aquestes cèl·lules, que es van anomenar Th17, són el tercer

tipus de cèl·lules col·laboradores reconegut per la comunitat científica i juguen un paper fonamental en la resposta contra bacteries de creixement extracel·lular i fongs. A més, s'ha descrit que tenen un efecte proinflamatori que els permet fer de pont entre la immunitat innata i la adaptativa<sup>(92, 93)</sup>. Les citocines implicades en el control de l'activitat Th17 són la IL-23, el TGF- $\beta$  i la IL-6. El TGF- $\beta$  i la IL-6 promouen la diferenciació dels limfòcits quiascents a Th17 i, un cop diferenciats, la IL-23 és qui promou la seva proliferació<sup>(94)</sup>. Els diferents tipus de cèl·lules col·laboradores s'inactiven mútuament, de manera que les Th1 inhibeixen de forma electiva l'activitat de les Th2 i Th17, a través de IFN- $\gamma$ . Al mateix temps, les Th2 inhibeixen la proliferació de les Th1 i Th17 mitjançant la IL-10 i la IL-4, i les Th17 inhibeixen a les Th1 i Th2<sup>(92, 95)</sup> (figura 1)

En relació a la MAT, les diferències entre la TH i la MGB es poden explicar, en part, pel diferent perfil de citocines secretades en el microambient local pels diferents tipus de limfòcits infiltrants de la tiroide. En la MGB predomina la producció de citocines proinflamatòries tipus Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) i en canvi, en la TH predominen les del tipus Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )<sup>(96, 97)</sup>. Un predomini de les citocines Th2 afavoreix la immunitat humoral enlloc de la immunitat cel·lular, augmentant així la producció d'autoanticossos per part dels limfòcits B. A més, els pacients amb MGB produeixen títols alts d'anticossos immunoglobulina (Ig) G específics pel TSHR. Aquests anticossos, que tenen una funció similar a la tirotropina (TSH), activen el receptor, provocant una hiperplàsia de les cèl·lules tiroïdals i una hiperfunció tiroïdal. Aquests anticossos estimuladors del receptor de la TSH (aTSHR) podrien tenir un paper antiapoptòtic, mitjançant una disminució de l'expressió de Fas en els tirocits<sup>(98)</sup>. A més, les citocines Th2 poden

estimular la producció de molècules antiapoptòtiques, com la proteïna 2 de la cèl·lula B limfoma (*B cell lymphoma 2*, Bcl-2), i protegir així als tirocits de la mort apoptòtica cel·lular<sup>(99, 100)</sup>. En canvi, en la TH, el micrambient afavoreix la destrucció de cèl·lules tiroïdals mitjançant l'apoptosi induïda pels limfòcits citotòxics invasors. Recentment, s'ha descrit un augment de les Th17 i de les seves citocines en sang perifèrica, sobretot en TH, fet que podria tenir un paper rellevant en la patogènia de l'autoimmunitat tiroïdal<sup>(101)</sup>.



**Figura 1.** Desenvolupament dels limfòcits T

El procés de selecció i maduració de cèl·lules o limfòcits T es realitza de forma seqüencial en el còrtex i la medulla tímica. El progenitor de la cèl·lula T (cèl·lula pre-T) es converteix en una cèl·lula T doble negativa (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Posteriorment, comença a expressar receptors de cèl·lula T (RCT) per antígens. En la zona capsular tímica, els timòcits que es generen passen per un procés de selecció positiva que permet la supervivència dels timòcits amb els RCT per antígens capaços d'interaccionar amb suficient afinitat amb els complexos major d'histocompatibilitat (CMH). Posteriorment, aquests timòcits migren a la zona medullar del timus on es produeix una selecció negativa, eliminant-se les cèl·lules amb RCT que reconeixen molècules CMH amb pèptids propis amb alta afinitat. En funció del RCT que expressi, es diferencien en la cèl·lula T γδ<sup>+</sup>, si expressa RCT γδ, o en la cèl·lula T doble positiva (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), si expressa RCT αβ. Aquests RCT αβ reconeixen un pèptid immunogènic localitzat en la molècula del CMH, formant el complex pèptid-antigen-CMH. Segons el tipus de CMH que reconegui, aquesta cèl·lula doble positiva es converteix en la cèl·lula T CD8<sup>+</sup> naïve (si reconeix el CMH tipus I), en CD4<sup>+</sup> naïve (si reconeix el CMH tipus II) o NKT (si reconeix el CD1d). Posteriorment, la cèl·lula T CD8<sup>+</sup> naïve es converteix en el limfòcit T citotòxic (LTC) madur quan contacta amb l'antigen. Pel que fa a la cèl·lula T CD4<sup>+</sup> naïve, aquesta prolifera i es diferencia a la perifèria en cèl·lules T col·laboradores (Th1, Th2, Th17) i en cèl·lules T reguladores en funció de l'ambient de citocines en què està sotmesa.

*RCT: receptor de cèl·lula T, CMH I: complexe major d'histocompatibilitat tipus I, CMH II: complexe major d'histocompatibilitat tipus II, IL: interleucina, TGF-β: factor de creixement transformant beta, LTC: limfòcit T citotòxic, Th: limfòcit T col·laborador, Tregs: cèl·lules T reguladores.*

### 2.2.3.-Limfòcits B

La diferenciació dels limfòcits B té dues fases: una antígen-indepenent i una altra antígen-dependent. De forma similar a la maduració dels limfòcits T, durant la fase antígen-indepenent, que es realitza al moll d'os, té lloc la generació de limfòcits B immunocompetents i autotolerants. Aquesta maduració es realitza mitjançant una selecció positiva, on sobreviuen aquells limfòcits B que tenen un receptor funcionant (RCB), i una selecció negativa on sobreviuen aquells limfòcits B que no reconeixen els antígens propis. En la fase antígen-depenent, hi ha una migració dels limfòcits B madurs del moll d'os als òrgans limfoidals secundaris on hi ha una activació dels limfòcits B madurs per contacte amb antígens externs, proliferant i diferenciant-se en cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos i en cèl·lules B memòria.

Una de les funcions principals dels limfòcits B és la de generar anticossos, responsables de la immunitat humoral, així com limfòcits B memòria amb una capacitat millorada per respondre a antígens específics, responsables de la memòria immunològica humoral. Així mateix, els limfòcits B també capturen i presenten antígens als limfòcits T i contribueixen a la especialització funcional d'aquests últims, col·laborant així amb la resposta immunològica adaptativa. Aquestes funcions efectores del llinatge dels limfòcits B són ben conegudes i està més que acceptat que defectes en la seva funció poden contribuir a l'autoimmunitat, produïnt autoanticossos. En la darrera dècada, el coneixement d'altres funcions dels limfòcits B s'ha ampliat considerablement, com és el cas del seu el paper immunoregulador.

El CD19 és un dels biomarcadors de superfície més fiables pel limfòcits B. S'expressa des dels limfòcits pre-B fins a la diferenciació terminal en cèl·lules plasmàtiques. A més, el CD19 té un paper important en el manteniment del balanç entre la resposta humoral, la induïda per l'antigen i la inducció de la tolerància<sup>(102)</sup>. Varis estudis han demostrat que l'autoimmunitat en ratolins CD19 transgènics depèn de l'expressió del CMH tipus II<sup>(103)</sup>. Aquest fet ha conduït a la hipòtesi de que el CD19 pot tenir un paper important en la modulació *in vivo* de l'expressió i senyalització de CMH tipus II. Aquests descobriments han conduït a un interès creixent del CD19 com un objectiu potencial per a la immunoteràpia de diverses malalties autoimmunitàries, com ara l'artritis reumatoide o l'esclerosi múltiple.

Els mecanismes que controlen diferents aspectes de la biologia dels limfòcits B inclouen la maduració dels limfòcits B, la selecció negativa en punts de control de maduració i l'edició del receptor, així com molts aspectes de la capacitat de resposta, com ara la generació de limfòcits B efectors. Aquests mecanismes mencionats estan alterats en pacients amb malalties autoimmunitàries en comparació amb subjectes sans. Un reflex de les anomalies en la maduració dels limfòcits B és el nombre d'alteracions de la població de limfòcits B pre-immunes en sang perifèrica en pacients amb lupus eritematós sistèmic. En sang perifèrica, s'han detectat percentatges anormals de limfòcits B no madurs, incloent les cèl·lules B transicionals, els limfòcits B pre-naïve i els naïve<sup>(104)</sup>. Aquestes poblacions indiquen que les principals etapes de la maduració dels limfòcits B es produeixen fora de la medul·la òssia.

### 2.2.3.1.-Cèl·lules B transicionals

Les cèl·lules B transicionals són una altra subpoblació relacionada amb el desenvolupament de l'autoimmunitat. Aquesta subpoblació representa un pas crucial en la diferenciació i selecció dels limfòcits B madurs. Donat que només una petita fracció de cèl·lules B immadures sobreviuen a la transició cap a l'etapa *naïve* madura, es creu que les cèl·lules B transicionals representen un punt de control o *checkpoint* clau de la selecció negativa per les cèl·lules B autoreactives<sup>(105)</sup>. D'acord amb aquest concepte, estudis recents en humans han suggerit que diferents malalties autoimmunitàries podrien compartir una relaxació de la selecció negativa i positiva dels limfòcits B que comportaria una expansió de les cèl·lules B transicionals i que conduiria alhora a un augment de l'autoreactivitat en el compartiment de limfòcits B *naïve* madurs<sup>(106)</sup>. Concretament, en pacients amb lupus eritematós sistèmic i en pacients amb immunodeficiències s'han descrit expansions de cèl·lules B transicionals circulants<sup>(107, 108)</sup>. Per tant, el coneixement de la biologia de les cèl·lules B transicionals té implicacions importants en la tolerància immunològica, l'autoimmunitat i la competència immunitària. Aquesta comprensió es basa, en gran mesura, en la correcta caracterització d'aquesta subpoblació limfocitària i de les seves vies de diferenciació. En relació a aquest punt, les cèl·lules B transicionals en humans s'ha caracteritzat fenotípicament recentment com a cèl·lules CD19<sup>+</sup>, CD24<sup>hi</sup>, CD38<sup>hi</sup> i CD27<sup>-</sup><sup>(109)</sup>.

## 2.3.-MECANISMES PATOGENÈS DE LA MALALTIA AUTOIMMUNITÀRIA TIROÏDAL

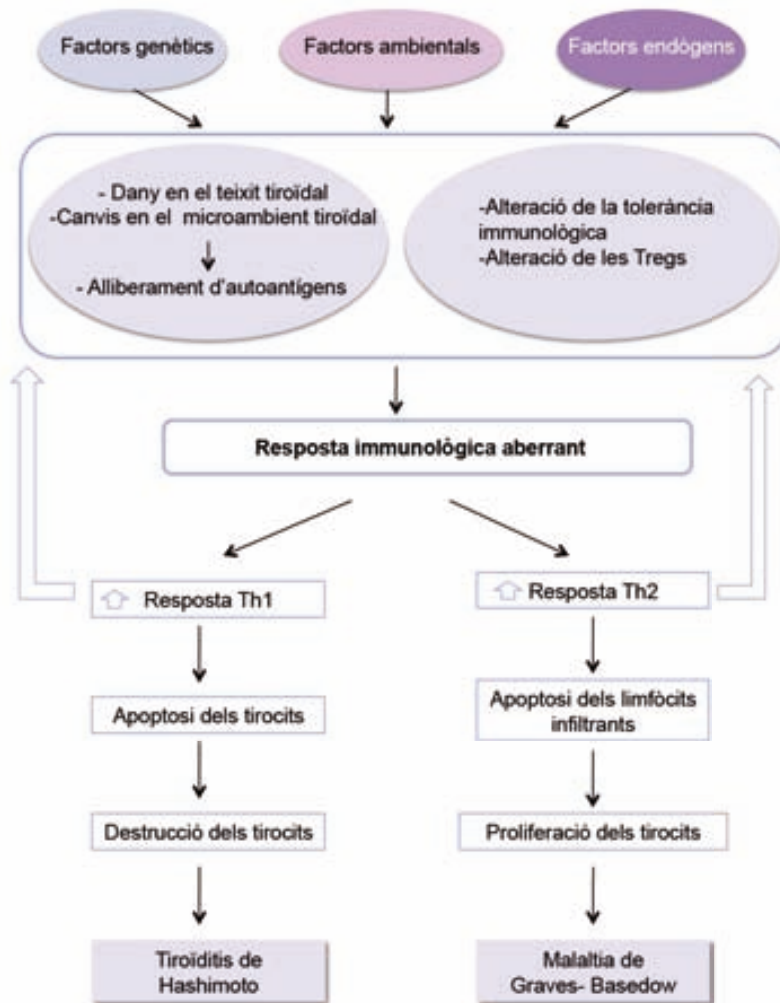
La malaltia autoimmunitària tiroïdal és una malaltia autoimmunitària específica d'òrgan complexa i poligènica. Els estudis en models experimentals que desenvolupen tiroïditis autoimmunitària mostren que la seva patogènia es realitza en un procés que consta de múltiples passos<sup>(4)</sup>. Les interaccions entre factors genètics, endògens i ambientals tenen un paper en la iniciació, progressió i manifestació clínica de la MAT que es poden resumir en la figura 2.

Els factors ambientals poden causar un dany en les cèl·lules tiroïdals i permetre l'alliberament d'autoantígens potencials. Les CPA són atretes i presenten els autoantígens rellevants als limfòcits Th en els ganglis limfàtics tiroïdals<sup>(110)</sup>. Una regulació de la resposta immunològica aberrant, determinada per factors genètics o endògens, permetria una reacció immunològica inapropiada i excessiva en lloc de reforçar la tolerància immunològica cap als autoantígens. En aquest punt, les Tregs podrien tenir un paper rellevant ja que són les encarregades d'eliminar els limfòcits autoreactius que reconeixen antígens propis en condicions normals. Però en presència d'una resposta immunològica aberrant, amb una alteració d'aquests mecanismes de tolerància perifèrica, aquests autoantígens serien presentats per les CPA als limfòcits Th. En funció del diferent perfil de citocines alliberades en el microambient tiroïdal, variaria el balanç entre la resposta Th1 i Th2 que determina l'expressió fenotípica final de la MAT. Així, una resposta predominant Th1 afavoriria la immunitat cel·lular i facilitaria un ambient proapoptòtic per part dels tirocits, podent desenvolupar-se



així la TH. En canvi, una resposta predominant Th2 afavoriria la immunitat humoral, que induiria als limfòcits B a produir aTSHR, afavorint la hiperplàsia de les cèl·lules tiroïdals i la hiperfunció, manifestant-se d'aquesta manera la MGB.

Tot i així, es requereix un millor coneixement de com la resposta immunològica aberrant contra la tiroïde s'inicia i es propaga per diferents vies, permetent l'expressió de diferents expressions fenotípiques de la MAT.



**Figura 2.-** Mecanismes patològics de la malaltia autoimmunitària tiroïdal

Els factors genètics, ambientals i endògens poden iniciar la patogènia de la malaltia autoimmunitària tiroïdal (MAT), mitjançant un dany cel·lular a nivell tiroïdal que afavoriria l'alliberació d'autoantígens. Així mateix aquests factors poden provocar una resposta immunitària aberrant amb una disminució de la tolerància immunològica cap aquests autoantígens alliberats, per exemple mitjançant una alteració de les cèl·lules T reguladores (Tregs). Aquests autoantígens són presentats per les cèl·lules presentadores d'antígens (CPA) als limfòcits T col·laboradors (Th). En funció del microambient i de les citocines, aquests limfòcits es decanten cap a una resposta Th1 (immunitat cel·lular) o Th2 (immunitat humoral), determinant així el desenvolupament de diferents tipus de MAT: la malaltia de Hashimoto en el cas d'un augment de la resposta Th1 i la malaltia de Graves-Basedow en cas d'un augment de la resposta Th2.

*Modificat de Fountoulakis, S. i Tsatsoulis, A. Clin Endocrinol 2004 i de Wang, S.H. i Baker, J.R. Thyroid 2007.*

## 2.4.-INFECCIÓ PEL VIRUS DE L'HEPATITIS C

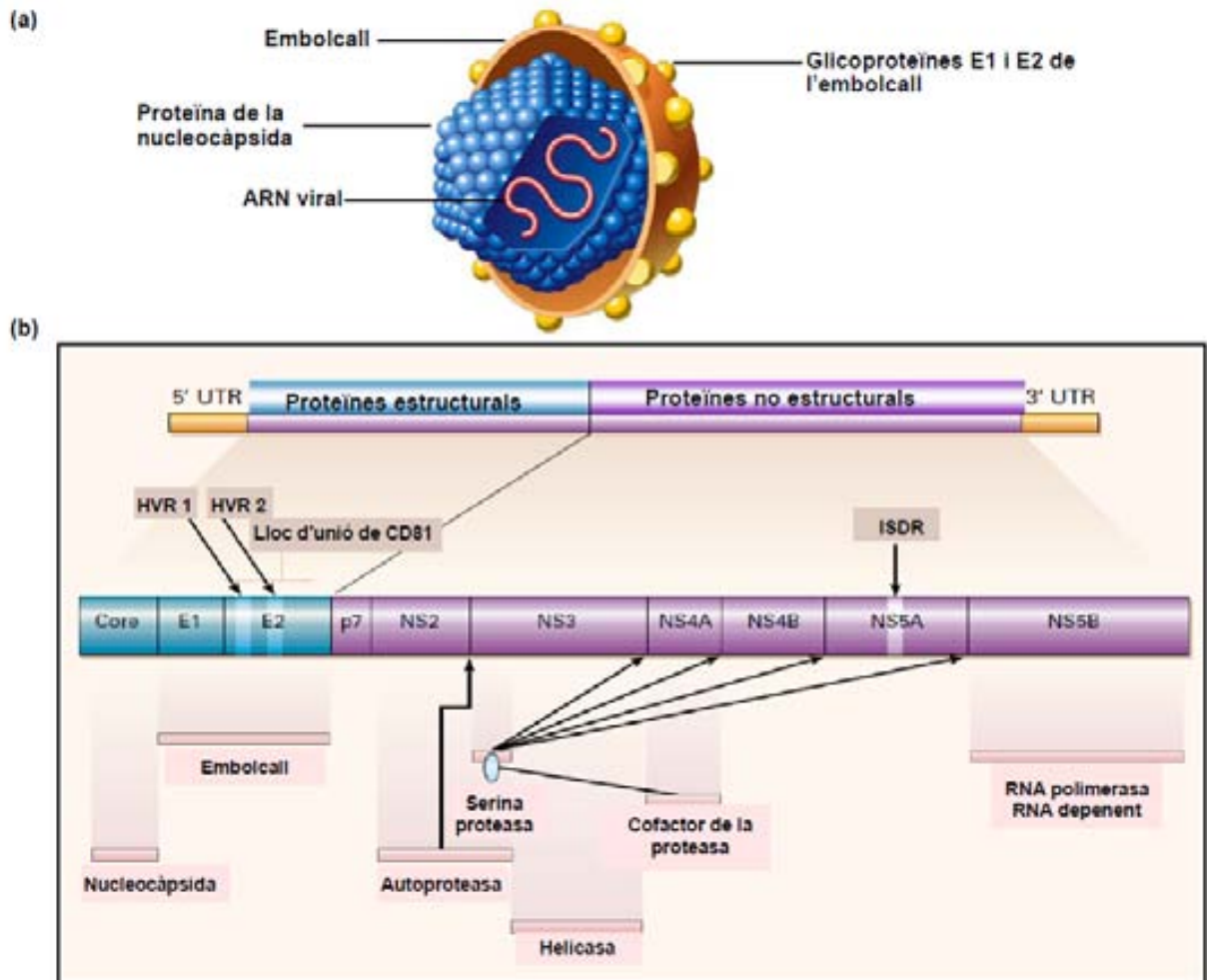
### 2.4.1.-Epidemiologia

La infecció pel virus de l'hepatitis C (VHC) afecta uns 180 milions de persones a nivell mundial, sent la seva prevalença en la població occidental del 1,5-2,2%<sup>(111)</sup>. De fet, és una de les principals causes de malaltia crònica hepàtica, cirrosi, carcinoma hepatocel·lular i la primera indicació pel transplantament hepàtic en el món occidental<sup>(112)</sup>. El factor de risc predominant actual per a l'adquisició del VHC és l'ús de drogues per via parenteral (DVP); sent la prevalença d'infecció pel VHC en adults entre els 20 i els 59 anys d'edat amb antecedents d'ús de DVP als Estats Units superior al 45%<sup>(113)</sup>. Altres factors de risc són les transfusions sanguínies abans de 1990, un elevat nombre de parelles sexuals al llarg de la vida i la transmissió iatrogènica, inclosa la diàlisi o exposició ocupacional<sup>(114)</sup>; tot i així, en grans sèries, entre el 15-30% dels pacients no presentaven cap factor de risc dels descrits anteriorment.

### 2.4.2.-Virus de l'hepatitis C

La infecció pel VHC està causada per un ARN virus del gènere *Hepacivirus* i de la família dels *Flaviviridae* que es replica a gran velocitat a nivell hepàtic. El seu genoma té 9.6-kb de cadena simple positiva d'ARN que codifica 3 proteïnes estructurals (core, E1, E2) i 7 proteïnes no-estructurals (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Les proteïnes de l'embolcall es localitzen a la superfície

externa del virus i són el primer contacte amb les cèl·lules de l'hoste durant la infecció<sup>(115)</sup> (figura 3). Concretament, la proteïna d'embolcall E2 és el component principal de les dues proteïnes de l'embolcall i és el principal mediador de la fixació del virus a l'entrada cel·lular<sup>(116)</sup>. En pacients infectats, la producció diària de partícules virals és aproximadament de  $10^{12}$ , tenint aquestes un temps de vida mitja d'aproximadament 3 hores<sup>(117, 118)</sup>. Existeixen com a mínim 6 genotips del VHC, que varien en la seva freqüència de nucleòtids entre el 30-34%, i més de 50 subtipus, que difereixen en la seva seqüència genòmica entre el 20-23%. Tot i que els diferents genotips del VHC causen la mateixa malaltia amb una evolució similar, l'extensa heterogenicitat genètica del VHC té importants implicacions clíniques i terapèutiques, ja que, per exemple, permet explicar les dificultats per desenvolupar una vacuna eficaç o la falta de resposta d'alguns pacients al tractament<sup>(119, 120)</sup>. La prevalença dels genotips difereix en funció de la zona geogràfica. Actualment, el genotip 1 és el més freqüent a Nord-Amèrica, Sud-Amèrica i a Europa<sup>(121)</sup>. La informació del genotip viral és molt important per prendre decisions terapèutiques ja que, tot i que amb els genotips no es pot preveure l'evolució de la infecció, sí que es pot preveure si hi haurà millor resposta al tractament i també la durada d'aquest<sup>(119)</sup>.



**Figura 3.-Estructura i genoma del virus de l'hepatitis C**

a) Estructura del virus de l'hepatitis C. *Modificat de Perkins, J.A. 2001.*

b) Proteïnes codificades pel genoma del virus de l'hepatitis C. El genoma del virus de l'hepatitis C (VHC) consisteix en dues regions no traduïdes (*untranslated regions, UTR*) i un marc obert que es divideix en una regió que codifica proteïnes estructurals i en una altra que codifica proteïnes no estructurals (*nonstructural, NS*). La regió estructural conté la proteïna de la nucleocàpsida (*core*) i dues proteïnes de l'embolcall (E1, E2). Les regions hipervariables 1 i 2 (*HVR 1 i HVR 2*) localitzades a E2 mostren una seqüència d'extrema variabilitat que es pensa que és el resultat de la pressió selectiva pels anticossos específics contra el virus. E2 també conté el lloc d'unió pel CD81. Les proteïnes no estructurals tenen funcions com proteases (NS2, NS3, NS4A), helicasa (NS3) i RNA polimerasa depenent de RNA (NS5B). S'ha relacionat una regió a NS5A amb la resposta al tractament amb interferó-alfa que s'anomena regió determinant de la sensibilitat a l'interferó (*interferon-sensitivity-determining region, ISDR*). Tot i així, la rellevància i importància d'aquesta regió encara no estan clars. No totes les funcions i característiques de les proteïnes estan tan ben caracteritzades com les de NS3 i NS5. Aquest és el cas de la p7 (NS1).

*Modificat de Lauer, G.M i Walker, B.D. N Engl J Med 2001.*

### 2.4.3.- Resposta immunitària enfront la infecció pel virus de l'hepatitis C

La relació entre el VHC i el seu hoste és dinàmica: el virus intenta coexistir utilitzant diverses estratègies per escapar de la resposta immunitària i el sistema immunitari de l'hoste intenta controlar i eliminar la infecció sense danyar-se a ell mateix. El resultat final de la confrontació entre aquestes dues forces biològiques depèn de la cinètica de replicació del VHC i de les característiques quantitatives i qualitatives de la resposta immunitària de l'hoste<sup>(122)</sup>.

De fet, la resolució de la infecció pel VHC requereix una interacció coordinada entre la resposta immunològica innata i adaptativa. A nivell hepàtic, la resposta immunològica innata és deguda a les cèl·lules NK, les NKT, els macròfags hepàtics i a una resposta ràpida de les cèl·lules hepàtiques infectades. Les cèl·lules NK i NKT són limfòcits especialitzats que proporcionen una de les primeres línies de defensa durant la infecció pel VHC. Reconeixen les cèl·lules infectades de manera independent a l'antigen, les destrueixen amb la seva activitat citotòxica, mitjançant l'alliberament de grànuls que contenen perforina i proteases, i produeixen gran quantitat de IFN- $\gamma$  tipus II i TNF- $\alpha$  per activar la resposta immunològica cel·lular<sup>(123)</sup>. La resposta immunològica adaptativa consisteix en una resposta humoral, amb la producció d'anticossos per part dels limfòcits B, i en una resposta cel·lular, per part dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> Th i els CD8<sup>+</sup> citotòxics, que tenen un paper rellevant en l'aclariment de partícules del VHC i en el control de la infecció<sup>(124, 125)</sup>. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> reconeixen els antígens presentats per les molècules del CMH de classe II a la superfície de les CPA professionals. A més, els limfòcits T CD4<sup>+</sup> realitzen diverses funcions

efectores, incloent l'activació directa dels macròfags i dels limfòcits B antígen-específics així com l'activació dels limfòcits T CD8<sup>+</sup>. Per altra banda, els limfòcits T CD8<sup>+</sup> reconeixen els antígens presentats per molècules del CMH de classe I a la superfície de les cèl·lules infectades. Aquests també realitzen diferents funcions efectores, com ara la destrucció de cèl·lules diana infectades i la secreció de citocines, com IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , que poden inhibir la replicació viral sense matar la cèl·lula infectada<sup>(126)</sup>. Per tot això, la detecció de les respostes dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> durant la fase aguda de la infecció són predictores de l'evolució de la infecció.

Al contrari del que passa en els pacients que aconsegueixen eliminar el virus durant la infecció aguda, l'evolució a la cronicitat s'associa amb una disfunció precoç i persistent de la resposta immunitària dels limfòcits T. Els limfòcits T CD8<sup>+</sup> específics contra el VHC no proliferen significativament després de l'estimulació *in vitro* amb l'antigen, no produeixen IFN- $\gamma$  en resposta als pèptids del VHC i despleguen una baixa citotoxicitat específica contra el virus *in vitro*<sup>(127)</sup>. A més, la resposta dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> gairebé és indetectable *in vivo*, amb una capacitat molt limitada per l'expansió i una producció defectuosa de citocines Th1, com ara la IL-2 i el TNF- $\alpha$ <sup>(128)</sup>. De fet, s'ha suggerit que una resposta Th1 precoç i persistent pot ser rellevant per a la prevenció de la infecció crònica i, en canvi, una resposta Th1 feble o absent juntament amb una resposta Th2 més pronunciada s'associa amb el desenvolupament i el manteniment de la infecció crònica<sup>(129)</sup>. Varis estudis han identificat alteracions en sang perifèrica entre els limfòcits T, B i les cèl·lules NKT de pacients amb HC-C en comparació amb subjectes sans<sup>(130-135)</sup>, fet que suggereix la importància d'aquestes subpoblacions

limfocitàries en la infecció pel VHC. Tot i que la resposta immunitària contra la HC-C és dèbil i defectuosa, es creu que aquesta pot ser un factor crucial pel desenvolupament de la fibrosi hepàtica i la cirrosi<sup>(136)</sup>. De fet, la resposta immunitària cel·lular podria potenciar la inflamació hepàtica en la malaltia crònica i que les cèl·lules T específiques contra el VHC experimentessin apoptosi<sup>(137)</sup>. Aquests fets podrien a la vegada activar les cèl·lules estrellades hepàtiques, que són la principal font extracel·lular en la fibrosi hepàtica<sup>(122)</sup>. Tot i així, aquesta hipòtesi no es confirma en tots els estudis realitzats<sup>(138)</sup>.

D'altra banda, les cèl·lules dendrítiques tenen un paper crucial com a moduladores de la resposta immunitària antiviral ja que són CPA professionals<sup>(139)</sup> i desencadenen la resposta immunitària específica contra l'antigen. Així, una alteració de les cèl·lules dendrítiques durant la infecció primària del VHC pot contribuir a un retard en l'aparició de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. En aquest sentit, algunes proteïnes del VHC, principalment core i E1, poden provocar una maduració defectuosa de les cèl·lules dendrítiques, inhibint la seva capacitat per induir les respostes immunitàries cel·lulars<sup>(140)</sup>. A més, la presència de la proteïna E2 del VHC pot inhibir directament la funció dels limfòcits citolítics (les cèl·lules NK)<sup>(141)</sup>, els quals contribueixen a la maduració de les cèl·lules dendrítiques<sup>(142)</sup>. D'aquesta manera, s'inhibiria indirectament la funció de les cèl·lules dendrítiques per desencadenar respostes immunitàries adaptatives.

El CD81 és un membre de la família de proteïnes de membrana tetraspanines, que contenen quatre dominis transmembrana, dominis curts intracel·lulars i dos bucles extracel·lulars<sup>(143)</sup>. S'ha demostrat que les



tetraspanines estan implicades en múltiples funcions fisiològiques així com en nombrosos processos, com ara les malalties infeccioses. El CD81 s'expressa en la superfície d'una gran varietat de tipus cel·lulars i té un ampli espectre d'activitats biològiques. En els limfòcits B, el CD81 és un component del complex molecular CD19-CD21-CD81-Leu 13 que exerceix un paper en l'activació dels limfòcits B<sup>(144)</sup>. Recentment s'ha demostrat *in vitro* que el segon bucle extracel·lular de CD81 està relacionat amb la glicoproteïna E2 del VHC<sup>(145)</sup> i s'ha hipotetitzat que aquesta interacció podria modificar les respostes immunològiques en els pacients infectats pel VHC<sup>(143)</sup>. A més, s'ha identificat el CD81 com un dels candidats dels receptors del VHC en els limfòcits B<sup>(145)</sup>, facilitant la seva infecció per part del VHC, tot i que l'expressió del CD81 en els limfòcits B dels pacients amb infecció pel VHC s'ha avaluat en pocs estudis i amb un nombre reduït de pacients, sent els resultats contradictoris<sup>(130, 146-148)</sup>.

En els darrers anys, s'ha evidenciat el paper de les Tregs en la supressió de la resposta immunològica tant en contra d'antígens estranys, incloent les infeccions virals, com en contra d'antígens propis. S'ha suggerit que les Tregs poden tenir un paper important en la determinació de la resolució o la persistència de la infecció pel VHC durant la seva fase aguda<sup>(149)</sup>. La inducció específica de les Tregs pot tenir diverses conseqüències per al VHC. En primer lloc, pot ser un procés important que es produeix per evitar l'excessiu dany immunopatològic i, en segon lloc, pot permetre la persistència viral<sup>(150)</sup>. La relació entre les Tregs i la infecció crònica pel VHC ha estat avaluada en varis estudis. El percentatge de Tregs en sang perifèrica en pacients amb infecció crònica pel VHC (HC-C) és similar<sup>(149, 151)</sup> o més elevat<sup>(152-158)</sup> en comparació amb els pacients amb

la infecció resolta i amb els individus no infectats. Tot i així, la comparació entre els diferents estudis és complicada donat que s'utilitzen diferents fenotips per descriure les Tregs. Encara que alguns d'aquests estudis suggereixen una correlació entre el nombre de cèl·lules T reguladores i l'aclariment del VHC, no s'ha determinat si les Tregs són induïdes per l'antigen de forma específica o si estan elevades per inhibir el dany immunopatològic que s'associa a una infecció crònica.

El sistema immunitari dels pacients amb HC-C no té la mateixa eficàcia funcional que el dels pacients que han estat capaços de controlar l'infecció aguda pel VHC<sup>(159)</sup>. Malauradament, no es coneixen del tot bé els mecanismes precisos que expliquen la ineficàcia del sistema immunitari per controlar la replicació viral en la fase crònica de la infecció. Aquesta dificultat persisteix tot i els múltiples esforços i les troballes importants obtingudes a partir d'estudis en humans i en models animals, així com en estudis *in vitro*<sup>(160)</sup>.

## **2.4.4.-Manifestacions de la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C**

### **2.4.4.1.-Manifestacions hepàtiques**

La història natural de la infecció pel VHC és molt difícil d'avaluar a causa de l'aparició silenciosa de la fase aguda en la majoria de casos així com de l'escassetat de símptomes durant les etapes primerenques de la infecció crònica. La infecció pel VHC infreqüentment es diagnostica durant la seva fase aguda i normalment les manifestacions clíniques apareixen entre la setena i la vuitena

setmana després de l'exposició al VHC, tot i que la majoria de pacients no tenen símptomes o aquests són molt lleus<sup>(161)</sup>. Malgrat tot, s'han descrit alguns casos d'hepatitis fulminant durant aquest període, tot i que és molt infreqüent<sup>(162)</sup>. En els casos en què s'han documentat símptomes de l'hepatitis aguda, aquests normalment consisteixen en icterícia, malestar i nàusees. La resposta immunològica de l'hoste determina en gran mesura si el VHC s'eradica espontàniament o si persisteix, com ho fa en la majoria dels pacients, entorn al 70%<sup>(163)</sup>. La infecció crònica típicament es caracteritza per un període perllongat sense simptomatologia<sup>(161)</sup>. L'aclariment espontani de la virèmia un cop la infecció crònica s'ha establert és infreqüent. La majoria d'infeccions cròniques donen lloc a una hepatitis crònica i a un cert grau de fibrosi, que pot acompanyar-se de símptomes relativament inespecífics com ara l'astènia. Encara que la història natural de la infecció pel VHC té una gran variabilitat interpersonal, s'estima que entorn el 15-30% dels pacients en els quals es cronifica l'infecció tenen progressió a cirrosi durant les següents tres dècades<sup>(164)</sup>. Normalment les complicacions greus i la mort només es produeixen en persones amb cirrosi. La infecció pel VHC també pot tenir efectes adversos en la qualitat de vida, fins i tot en absència de malaltia greu<sup>(165)</sup>.

Existeix un nombre de factors de risc per a la progressió de la malaltia, que s'associen a un major risc de fibrosi. Entre aquests s'inclouen la durada de la infecció, l'edat avançada en el moment de l'exposició, el gènere masculí, la ingesta enèrica i la coinfecció amb altres virus com per exemple, el virus de la immunodeficiència humana (VIH) o el virus de l'hepatitis B (VHB) <sup>(161, 166)</sup>. Els pacients amb cirrosi relacionada amb la HC-C requereixen un seguiment

freqüent per les complicacions que poden presentar, incloent el carcinoma hepatocel·lular que es desenvolupa entre el 1 i el 3% d'aquests pacients per any<sup>(167)</sup>. Actualment hi ha un acord generalitzat de la indicació del tractament antiviral en aquells pacients amb fibrosi hepàtica clínicament significativa pel alt risc de cirrosi que presenten<sup>(121)</sup>.

#### 2.4.4.2.-Manifestacions extrahepàtiques

Tot i que la replicació del VHC té lloc principalment en els hepatòcits, l'existència de complicacions extrahepàtiques en la infecció pel VHC recolza la idea que el VHC es pot replicar eficientment en els teixits extrahepàtics<sup>(168-170)</sup>. Una de les possibles localitzacions de replicació extrahepàtica poden ser les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), suggerint que el VHC també és limfotrópic<sup>(171-173)</sup>. De fet, la infecció del teixit limfoidal pot ser un reservori de replicació viral important per a la persistència de la infecció<sup>(168-169)</sup>, encara que la demostració precisa de la replicació extrahepàtica del VHC és difícil donada la manca de models sòlids *in vitro*. Fins ara, els estudis s'han realitzat de forma gairebé exclusiva a partir de cèl·lules i teixits obtinguts de pacients infectats pel VHC. La detecció de la cadena positiva d'ARN del VHC no és suficient per demostrar replicació del virus ja que els propis virions, que són les partícules víriques morfològicament completes i infeccioses de l'hepatitis C contenen genomes d'ARN de sentit positiu. Per tant, és necessària la detecció de genomes virals replicant activament mitjançant la detecció de la cadena negativa de l'ARN del VHC. No obstant això, no s'han

detectat els factors genètics, virològics i genètics que regulen la replicació extrahepàtica del VHC, com en el cas de la tiroide, ni tampoc s'han identificat les poblacions cel·lulars que permeten aquesta replicació<sup>(174)</sup>.

Entre el 38-76% dels pacients amb HC-C desenvolupen almenys una manifestació extrahepàtica<sup>(175-177)</sup> i, inclús en alguns pacients, aquestes són les primeres manifestacions de la infecció. Aquestes manifestacions extrahepàtiques (taula 1) inclouen principalment trastorns autoimmunitaris, com la crioglobulinèmia mixta, la síndrome de Sjögren o la MAT, i processos limfoproliferatius. Així mateix, la HC-C és la responsable de la producció d'autoanticossos, tant òrgan com no òrgan-específics<sup>(178-180)</sup>. En la HC-C, alguns autoanticossos tenen manifestacions bioquímiques, histològiques o genètiques, i altres poden predir la resposta a tractaments antivirals, trastorns concomitants o el pronòstic d'aquests pacients<sup>(181)</sup>. D'altra banda, s'ha demostrat el paper oncogènic de la HC-C en el desenvolupament de carcinoma hepatocel·lular i el limfoma no Hodgking de cèl·lules B<sup>(169)</sup>. L'estreta relació entre la carcinogènesi i l'autoimmunitat també ha estat àmpliament reconeguda<sup>(170)</sup>. Els mecanismes responsables de l'expansió d'autoanticossos i de limfoproliferació crònica en pacients amb HC-C segueixen sent controvertits. Aquests poden incloure: (a) l'expansió d'autoanticossos pels limfòcits B; (b) el mimetisme molecular entre els autoantígens i els antígens virals que pot causar una resposta immunològica creuada; (c) la modulació directa de la resposta immunològica per part de complexos immunològics, fragments d'immunoglobulines o components del complement, que poden ser generats durant el curs de la infecció; (d) la inducció d'inflamació a nivell local, per exemple mitjançant l'alliberament de citocines,

que es traduiria en l'activació de cèl·lules autorreactives; (e) la desregulació de citocines produïdes per les Tregs que afavoririen un fenotip Th2, que alhora es podria associar a un augment de la resposta immunitària humoral i la producció d'autoanticossos; (f) una infecció directa de subconjunts específics dels limfòcits T o B i/o altres cèl·lules mononuclears; o (g) factors genètics de l'hoste (per exemple, HLA) que poden influir en la seva capacitat per eliminar el virus o sostenir les respostes immunològiques humorals<sup>(168, 169, 182)</sup>. La limfoproliferaçió crònica es pot potenciar per la interacció entre la proteïna E2 de l'embolcall viral i el receptor CD81 de les cèl·lules infectades, que augmenta els reordenaments genètics en els limfòcits reactius a l'antigen<sup>(168, 169)</sup>. A més, la posterior activació del protooncogen Bcl2, amb activitat antiapoptòtica, és la responsable de la prolongació de la supervivència dels limfòcits<sup>(183)</sup>.

Taula 1. Manifestacions extrahepàtiques de la infecció pel VHC	
<b>Reumatològiques</b>	- Crioglobulinèmia mixta - Vasculitis/ Poliarteritis nodosa - Oligopoliartritis/ Artràlgies - Síndrome de Sjögren - Síndrome de fatiga crònica/ Fibromiàlgia - Factor reumatoide positiu
<b>Hematològiques</b>	- Trastorns limfoproliferatius/ Linfoma no Hodgkin - Púrpura trombocitopènica autoimmunitària - Gammopaties monoclonals - Anèmia hemolítica autoimmunitària
<b>Endocrinològiques</b>	- Malaltia autoimmunitària tiroïdal - Insulinoresistència /DM tipus 2
<b>Dermatològiques</b>	- Porfíria cutània tarda - Lliquen pla - Púrpura palpable - Psoriasi - Prurit
<b>Miscelània</b>	- Neuropatia perifèrica/ Miopatia - Deteriorament cognitiu subclínic/ Desacceleració psicomotriu - Síndrome depressiva - Miocardiopatia hipertròfica/ Miocardiopatia dilatada/ Miocarditis - Arteriosclerosi aòrtica - Fibrosi pulmonar idiopàtica/ Alveolitis crònica - Glomerulonefritis - Úlceres corneals de Mooren

Modificat de Zignego, A.K. i col·laboradors. *World Journal of Gastroenterology* 2007 i de Obermayer-Straub, P. *Journal of Autoimmunity* 2001.

#### 2.4.5.-Infecció pel virus de l'hepatitis C i malaltia autoimmunitària tiroïdal

S'han relacionat diversos agents infecciosos amb la patogènia de la MAT, però l'associació més consistent és amb el VHC<sup>(184)</sup>. Els estudis realitzats mostren resultats discordants, alguns recolzant l'associació entre la infecció pel VHC amb la MAT clínica o subclínica<sup>(185-189)</sup> i altres no<sup>(190-192)</sup>. Tot i així, alguns dels estudis amb resultats negatius van utilitzar mètodes poc sensibles per a la detecció d'anticossos antitiroïdals i van tenir una manca de control dels factors que podien afectar el desenvolupament de l'autoimmunitat tiroïdal, principalment la ingesta de iode. Recentment s'ha realitzat un estudi que ha mostrat que els nens amb infecció pel VHC presentaven una major prevalença d'hipotiroïdisme no autoimmunitari i d'anticossos anti-tiroglobulina (aTg) en comparació amb subjectes sans. Aquest augment de la prevalença no es va associar amb altres paràmetres com ara una història familiar de malalties autoimmunitàries, la durada de la infecció pel VHC, el genotip viral, la càrrega viral o la funció hepàtica; a excepció de la infecció activa pel VHC<sup>(193)</sup>. Per tant, aquest estudi suggereix que la infecció pel VHC és un factor de risc tant per la tiroïditis autoimmunitària com per la no autoimmunitària.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, existeixen múltiples possibles mecanismes per explicar l'associació entre la infecció pel VHC i l'autoimmunitat. Entre aquestes hipòtesis destaca la de l'activació de l' "observador" que es basa en el fet que la infecció viral d'un cert teixit pot induir inflamació local, per exemple, mitjançant l'alliberament de citocines. Aquesta inflamació de baix nivell podria causar l'activació de limfòcits T autorreactius que estaven suprimits per

mecanismes de tolerància perifèrica, com són les Tregs<sup>(194)</sup>. Hi ha dades recents sobre el mecanisme principal a través del qual els agents virals poden desencadenar l'autoimmunitat en la tiroïditis autoimmunitària<sup>(195)</sup> que donen suport a aquesta hipòtesi. Per tant, és possible que el VHC pugui desencadenar tiroïditis autoimmunitària mitjançant la infecció de cèl·lules de la tiroide i l'alliberament de mediadors proinflamatoris. La possibilitat que el VHC pugui infectar les cèl·lules tiroïdals es recolza en un estudi recent on es va demostrar la presència de virions del VHC a l'interior de les cèl·lules foliculars tiroïdals<sup>(196)</sup>. No obstant això, encara que el VHC no pogués infectar les cèl·lules de la tiroide, les proteïnes virals que es desprenen dels virions del VHC també podrien tenir importants conseqüències fisiològiques. Per exemple, s'ha demostrat que la proteïna E2 del VHC pot induir apoptosi<sup>(197, 198)</sup> i regular a l'alça la IL-8, que és proinflamatòria<sup>(199)</sup>. Aquestes dades suggereixen que les proteïnes de l'embolcall del VHC podrien afectar significativament el medi tiroïdal i contribuir a la seva disfunció. A més, recentment s'ha demostrat que el VHC pot activar la secreció de citocines per part de les cèl·lules tiroïdals<sup>(200)</sup>. Concretament, s'ha evidenciat concentracions significatives de l'ARN missatger (ARNm) de CD81 en les cèl·lules tiroïdals humanes en cultius primaris. D'altra banda, la incubació de les cèl·lules tiroïdals humanes amb la glicoproteïna d'embolcall E2 del VHC afavoreix la unió de E2 a les cèl·lules de la tiroide i la secreció d'IL-8<sup>(200)</sup>. Aquestes troballes suggereixen que la pròpia unió de les proteïnes de l'embolcall del VHC a les cèl·lules tiroïdals és suficient per desencadenar la secreció de citocines i l'activació dels limfòcits T. Aquesta activació, en individus genèticament



susceptibles, podria desencadenar tiroïditis autoimmunitària a través d'aquest mecanisme de l' "observador".

#### **2.4.6.-Diagnòstic de la infecció pel virus de l'hepatitis C**

El diagnòstic de la infecció pel VHC es basa en la detecció d'anticossos anti-VHC per enzim-immunoassaig (EIA) i del ARN del VHC mitjançant un mètode molecular sensible. El diagnòstic de la infecció aguda pel VHC requereix la determinació del ARN del VHC ja que aquest apareix abans que els anticossos anti-VHC siguin detectables. L'ús de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en temps real detecta mínimes quantitats de ARN del VHC, tant poques com 10 UI/ml, i quantifica amb precisió els nivells de ARN fins aproximadament 10<sup>7</sup> UI/ml. La detecció i quantificació del ARN del VHC s'ha de mesurar mitjançant un mètode sensible, amb un límit inferior de detecció de 15 UI/ml o inferior, idealment un assaig amb PCR a temps real. El genotips i subtipus del VHC es poden determinar mitjançant varis mètodes, incloent els anàlisis directes de seqüència, la hibridació reversa i les PCR en temps real específiques per genotip. El genotip del VHC s'hauria d'avaluar abans d'iniciar el tractament antiviral ja que aquest pot determinar la dosi de RBV i la decisió terapèutica<sup>(201)</sup>.

#### **2.4.7.-Valoració de la fibrosi hepàtica**

Es recomana la valoració de la gravetat de la malaltia hepàtica abans d'iniciar el tractament per tal d'identificar els pacients amb cirrosi. La

identificació d'aquest tipus de pacients és particularment important ja que el seu pronòstic i la probabilitat de respondre al tractament s'alteren i requereixen cert seguiment. La biòpsia hepàtica és el mètode *gold standard*. Més recentment també s'han valorat en pacients amb HC-C mètodes no invasius com ara marcadors serològics i l'elastografia transitòria<sup>(201)</sup>. L'índex APRI (*AST to platelet ratio index*, índex de la ratio aspartat aminotransferasa (AST)-plaquetes) és un mètode no invasiu que utilitza resultats de laboratori i que permet identificar amb un alt grau de precisió els pacients amb HC-C amb fibrosi i cirrosi significativa<sup>(202)</sup>.

#### **2.4.8.-Indicacions de tractament**

S'hauria de considerar iniciar tractament a tots aquells pacients *naïve* amb HC-C compensada. El tractament s'hauria de iniciar immediatament en aquells pacients amb fibrosi avançada i considerer-lo molt en aquells amb fibrosi moderada<sup>(201)</sup>.

#### **2.4.9.-Tractament de la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C**

En els darrers anys s'han aconseguit importants progressos en el tractament de la infecció pel VHC ja que varis fàrmacs antivirals nous d'acció directa, molts d'ells actius contra tots els genotips del VHC, es troben en desenvolupament clínic. Els objectius del tractament són prevenir les complicacions i la mortalitat mitjançant l'eradicació del virus. En la darrera

dècada, el tractament estàndard per pacients amb HC-C ha estat la combinació d'interferó- $\alpha$  pegilat (IFN- $\alpha$ peg) i ribavirina (RBV)<sup>(203)</sup>. Tot i així, a partir de l'any 2012, arran dels resultats de múltiples estudis aleatoritzats, s'ha proposat que el tractament estàndard per als pacients amb HC-C per genotip 1 i fibrosi significativa (F2 o més, segons la biòpsia o l'elastografia hepàtiques) sigui una teràpia triple a base d'un inhibidor de la proteasa NS3 (boceprevir o telaprevir), IFN- $\alpha$ peg i RBV. La durada del tractament en aquests pacients és entre 6-12 mesos, dependent de si tenen història prèvia de tractament, absència o presència de cirrosi, i de la resposta inicial al tractament<sup>(204)</sup>. El tractament dels pacients amb altres genotips de HC-C és la combinació clàssica de IFN- $\alpha$ peg i RBV<sup>(205)</sup>. Els principals requisits que han de complir els pacients per iniciar el tractament són els següents: presentar una HC-C, amb detecció de ARN del VHC, una histologia amb evidència de progressió de la malaltia hepàtica i absència de contraindicacions. La resposta al tractament s'avalua mitjançant la determinació de l'ARN viral.

#### **2.4.9.1.-Tractament amb interferó-alfa**

##### *2.4.9.1.1.-Generalitats dels interferons*

Els IFNs són una família de molècules proteiques que es van identificar a mitjans del segle XX per Isaacs i Lindenmann<sup>(206)</sup>. A dia d'avui, s'han descobert més de 10 espècies d'IFNs i nombrosos subtipus, cadascun d'ells amb la seves propietats individuals, però tenint tots ells una activitat antiviral en comú<sup>(207)</sup>. A

part de la seves propietats antivíriques, els IFNs tenen un ampli espectre d'activitats biològiques, incloent efectes immunomoduladors, antiangiogènics, antiproliferatius i antiactivitat tumoral donat que actuen com a reguladors del creixement i de la diferenciació cel·lular<sup>(208)</sup>. Es classifiquen en 3 grans grups en funció de la seva capacitat per acoblar-se a uns receptors de membrana cel·lular: IFN tipus I, tipus II i tipus III.

En els IFNs tipus I s'inclouen tots els IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN-epsilon ( $\epsilon$ ), IFN-kappa ( $\kappa$ ), IFN-omega ( $\omega$ ) i IFN-nu ( $\nu$ )<sup>(207)</sup>. Els éssers humans tenen 12 IFN- $\alpha$  diferents i un únic IFN- $\beta$ . Els gens dels IFNs tipus I estan agrupats al cromosoma 9. Cada subtipus està codificat pel seu propi gen, regulat pel seu propi promotor, i cap d'ells conté introns<sup>(209)</sup>. La principal diferència entre l'IFN- $\alpha$  i l'IFN- $\beta$  està en les seves activitats antivirals específiques i en les proporcions d'activitats antivirals *versus* antiproliferatives, tot i que la base molecular d'aquestes diferències no es coneix encara. Tots els IFNs tipus I s'uneixen al mateix receptor interferó  $\alpha/\beta$  (IFNAR). Només existeix una classe d'IFN tipus II, l'IFN- $\gamma$ , que és produït pels limfòcits T quan s'estimulen amb antígens o mitògens. L'IFN- $\gamma$  s'uneix a un receptor diferent, el receptor de interferó  $\gamma$  (IFNGR). Recentment s'han descrit els IFNs tipus III que inclouen l' IFN-lambda ( $\lambda$ )<sub>2</sub>, IFN-  $\lambda$ <sub>3</sub> i IFN-  $\lambda$ <sub>1</sub>, també coneguts com a IL28A, IL28B i IL29 respectivament<sup>(210, 211)</sup>. De la mateixa manera que els IFNs tipus I, aquests també són induïts per les infeccions virals<sup>(212, 213)</sup> i s'uneixen al receptor d'IFN-  $\lambda$  (IFNLR)<sup>(210, 214)</sup>.

#### 2.4.9.1.2.- Mecanismes d'acció de l'interferó-alfa

La unió entre els IFN tipus I, incloent l' IFN- $\alpha$  i el seu receptor IFNAR permet iniciar la transducció de senyals per diverses vies que condueixin a l'expressió dels gens estimulats per l'IFN (*IFN-Stimulated Genes, ISGs*). La via clàssica de senyalització IFNAR és la via Janus quinasa (Jak)-transducció de senyals i activació de la transcripció (*Signal transducer and activator of transcription, Stat*) en la què participen la tirosin-quinasa (Tyk) 2 i la Jak-1. Les quinases activades recluten i fosforil·len els factors de transcripció Stat1 i Stat2, que finalment s'associen amb IRF9. El complexe Stat1/Stat2/IRF9 es transloca al nucli, s'uneix a elements de resposta estimulats per l'IFN (*IFN-stimulated response elements, ISRE*) i activa la transcripció de centenars de ISGs<sup>(215)</sup>. La funció exacta de la majoria dels productes ISG no està del tot establerta. Tot i així, s'han estudiat alguns dels mecanismes que confereixen un estat antiviral, mostrant que els IFNs tipus I interfereixen en diferents punts de la replicació viral<sup>(216)</sup>.

#### 2.4.9.1.3.- Efectes de l'interferó-alfa sobre el sistema immunitari

L'IFN- $\alpha$  és important per la transició de la resposta innata a la resposta adaptativa del sistema immunològic. Aquesta transició és vital per a l' aclariment efectiu de tots els antígens no propis i pel manteniment de la memòria immunològica<sup>(217)</sup>. L' IFN- $\alpha$  afecta nombrosos tipus de cèl·lules del sistema immunitari. S'ha descrit el seu efecte estimulador de la immunitat innata, augmentant directament de l'activitat citotòxica i proliferació de les cèl·lules

NK<sup>(218-220)</sup>. Així mateix, té un efecte sobre la immunitat adaptativa, incrementant la resposta Th1 respecte la Th2<sup>(221-223)</sup>, augmentant l'activitat dels limfòcits T CD8<sup>+</sup> citotòxics<sup>(224)</sup>, influint en la resposta dels limfòcits B<sup>(225)</sup> i induint l'activitat dels macròfags<sup>(226)</sup>. Aquestes activitats mostren unes funcions superposades amb altres citocines de resposta primerenca, com ara TGF- $\alpha$  o IL-2, i en algunes situacions, poden induir una resposta sinèrgica<sup>(221)</sup>. Per tant, s'ha suggerit que l'IFN- $\alpha$  és la primera citocina secretada per la CPA i la més important després de l'estimulació de l'antigen a un limfòcit Th0<sup>(227)</sup>. L'IFN- $\alpha$  també regula a l'alça l'expressió de Bcl-2<sup>(228)</sup>, que és una proteïna reguladora de l'apoptosi, tal i com s'ha mencionat anteriorment. Com a citocina immunomoduladora, l'IFN- $\alpha$  regula la transcripció de múltiples citocines i quimiocines de forma directa o indirecta. La regulació transcripcional directa es produeix després de la unió del lligant a l'IFNAR i de l'inici d'una cascada de transducció de senyals, que inclou membres de les famílies Jak i Stat. Donat que la regulació de la transcripció directa és dosi, temps i cèl·lula dependent, aquest fet remarca la diversitat d'activitats de l'IFN- $\alpha$  i les diferències entre les teràpies d'alta i baixa dosi<sup>(217)</sup>.

#### *2.4.9.1.4.- Interferó-alfa com a tractament de la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C*

L'IFN- $\alpha$  fou la primera citocina que es va reproduir per tecnologia d'ADN recombinant. L'IFN- $\alpha$  recombinant es va utilitzar per primer cop l'any 1986 pel tractament de l'HC-C<sup>(229)</sup>, anomenada aleshores infecció crònica pel virus de l'hepatitis no A, no B, i des de llavors, s'ha mantingut com a component clau de tots els seus tractaments, sent la seva indicació més freqüent. Inicialment, l'IFN- $\alpha$

recombinant s'injectava en monoteràpia 3 cops a la setmana durant 6-12 mesos. A final dels anys 90, el tractament amb IFN- $\alpha$  es va combinar amb RBV, millorant les taxes de resposta viral sostinguda (RVS) <sup>(230)</sup>. Entre l'any 2001-2002, l'IFN- $\alpha$ 2 pegilat (IFN- $\alpha$ 2peg) va reemplaçar l'IFN- $\alpha$  recombinant permetent la seva dosificació a un cop a la setmana, donada la seva major vida mitja en sèrum. Aquest canvi va augmentar encara més les taxes de curació al 40-50% <sup>(231, 232)</sup>. La pegilació és la unió del polietenglicol a una proteïna, en aquest cas l'IFN, que permet una reducció de la seva absorció subcutània i del seu filtrat renal, així com una disminució de la seva immunogenicitat. Actualment existeixen dues llicències d'interferó pegilat, l'IFN- $\alpha$ 2apeg (Pegasys®, Hoffman-La Roche, Basilea, Suïssa ) i l'IFN- $\alpha$ 2bpeg (PegIntron-A®; Merck & Co.; Inc.; Ewhitehouse Station, NJ, EUA) que tenen una eficàcia i un perfil de seguretat similar però que difereixen en la seva farmacocinètica <sup>(233)</sup>.

#### *2.4.9.1.5.- Efectes de l'interferó-alfa sobre el sistema immunitari en la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C*

S'han descrit els efectes immunomoduladors del tractament amb IFN- $\alpha$  sobre diferents subpoblacions limfocitàries, com ara els limfòcits T, B i les NKT, en pacients amb HC-C en diferents estudis i amb resultats discrepants entre ells <sup>(130-133, 135)</sup>. Així mateix, també s'ha observat la restauració de l'homeostasi de Th1/Th2 tant amb el tractament només amb IFN- $\alpha$  <sup>(234)</sup>, com amb la seva combinació amb RBV <sup>(234, 235)</sup>, com amb la seva forma pegilada (IFN- $\alpha$ peg) <sup>(236)</sup>. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la tetraspanina CD81 pot modular la resposta

immunològica en front el VHC. L'efecte de l' IFN- $\alpha$  sobre el CD81 en els limfòcits B en pacients amb HC-C amb resposta o no al tractament s'ha valorat en varis estudis amb resultats ben diferents<sup>(130, 146-148)</sup>. Finalment, tot i que s'ha suggerit la rellevança de les Tregs en el curs natural de la infecció pel VHC<sup>(150, 237)</sup>, no s'ha determinat del tot el seu paper en relació a la resposta dels pacients HC-C al tractament antiviral. De fet, molts pocs estudis han examinat l'efecte de la resposta al tractament amb IFN- $\alpha$ peg i RBV sobre les Tregs en sang perifèrica, sent els resultats discordants<sup>(151, 238, 239)</sup>. Tot i així, donada la diferent definició fenotípica de les Tregs emprada, la comparació entre aquests estudis és difícil.

#### 2.4.9.2.-Tractament amb ribavirina

La RBV és un anàleg sintètic dels nucleòsids amb activitat contra varis patògens virals que s'ha convertit en un component crític de l'èxit del tractament de la infecció pel VHC. Actualment al mercat existeixen dues formes comercials: Rebetol® (Merck Sharp & Dohme Corp., Whitehouse Station, NJ, EUA) i Copegus® (Roche Pharma, Basilea, Suïssa). Tot i que només presenta un efecte lleu i transitori antiviral en la replicació del VHC quan s'administra en monoteràpia, en combinació amb l'interferó, la RBV ha fet augmentar la resposta al tractament del 20 al 45%<sup>(230)</sup>. En gran mesura, s'ha atribuït aquesta milloria de la RVS a la prevenció de la recaiguda un cop completat el tractament, reduint-la aproximadament en un 50%.



Tot i els anys d' ús clínic i d' investigació, els mecanismes d' acció de la RBV no es coneixen del tot. Es sap que presenta una activitat directa sobre la replicació viral, mitjançant la deplecció intracel·lular del trifosfat de guanosina, que és necessari per la síntesi de l'ARN viral, i en conseqüència perquè els virions mutin de forma ràpida i letal<sup>(240)</sup>. Així mateix, la RBV té efectes immunomoduladors, alterant l'equilibri entre les citocines pro i antiinflamatòries, mitjançant una polarització cap a la resposta proinflamatòria Th1, augmentant així la producció de IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  i sumprimint la producció de IL-4, IL-5 i IL-10<sup>(241, 242)</sup>. Finalment, també s'ha suggerit que pot potenciar l'efecte de l'IFN a través de la regulació de gens implicats en la senyalització de l'IFN<sup>(243)</sup>.

#### 2.4.9.3.-Efectes secundaris del tractament antiviral amb interferó-alfa pegilat i ribavirina

La majoria de pacients tractats amb IFN- $\alpha$ peg i RBV presenten algun efecte advers durant el tractament<sup>(121)</sup>. De fet, els efectes adversos són una de les principals raons per les què els pacients rebutgen o supenen el tractament, succeint en el 10-14% dels casos<sup>(231, 232)</sup>, primordialment durant les primeres setmanes de tractament.

Els efectes adversos més comuns de l'IFN- $\alpha$ peg són els símptomes *influenza-like* com ara fatiga, cefalea, febre i calfreds, que es produeixen en més de la meitat dels pacients, i la simptomatologia psiquiàtrica, en forma de depressió, irritabilitat, labilitat emocional i insomni, que es produeixen en el 22-31% dels pacients<sup>(121)</sup>. Les alteracions analítiques són la causa més freqüent de reducció de

dosi. L'anèmia s'observa aproximadament en un terç dels pacients i en canvi, la neutropènia greu és menys freqüent, succeint en el 4% dels casos<sup>(121)</sup>. Així mateix, l'IFN- $\alpha$ peg pot induir trastorns autoimmunitaris, com per exemple la tiroïditis, o pot empitjorar trastorns autoimmunitaris preexistents. Tot i així, la presència de trastorns autoimmunitaris previs al tractament només és una contraindicació relativa al tractament.

Pel què fa a la RBV, l'efecte secundari més comú és l'anèmia hemolítica. Donat que s'elimina a nivell renal, s'ha d'utilitzar amb extrema precaució en pacients amb insuficiència renal. Altres efectes adversos associats a la RBV són la limfopènia lleu, la hiperuricèmia i en conseqüència les crisis gotoses, el prurit, erupcions, tos i congestió nasal. Donat que s'han documentat que pot causar defectes congènits i embrionaris i mort fetal, es recomana l'ús de mètodes anticonceptius durant tot el tractament i fins a 6 mesos després d'haver-lo finalitzat<sup>(121)</sup>.

#### **2.4.9.4.-Tractament amb agents antivirals d'acció directa**

La caracterització molecular de les característiques virològiques (figura 3) i el cicle de vida del VHC ha permès el desenvolupament d'agents antivirals que actuen directament, amb l'objectiu d'una major eficàcia i, si és possible, menys efectes adversos en comparació amb els règims terapèutics basats en l'IFN<sup>(244)</sup>. Totes les enzims del VHC que són essencials per a la seva replicació són dianes potencials. A banda de l'ablació de la replicació, una altra branca terapèutica són els inhibidors de la proteasa amb capacitat d'inhibir la capacitat de la no

estructural 3 (NS3)/ 4A serina-proteasa per escindir la poliproteïna del VHC i l'estimulador 1 del promotor de l' IFN- $\beta$ , restaurant així la senyalització immunològica innata dins dels hepatòcits<sup>(245)</sup>. En aquest sentit, dos inhibidors de la proteasa, el telaprevir i el boceprevir, han estat recentment aprovats per la *Food and Drug Administration* (FDA) dels Estats Units i pel Ministeri de Sanitat i Consum a Espanya l'any 2012.

Tot i que és probable que el tractament amb IFN- $\alpha$ peg i RBV continuï sent l'eix vertebral en el futur proper, s'espera una ràpida expansió d'altres opcions terapèutiques pel tractament de la infecció pel VHC en els pròxims anys<sup>(246)</sup>. La combinació òptima d'agents (incloent inhibidors de la polimerasa de nucleòsids i no nucleòsids, inhibidors de proteases NS4B i NS5A, moduladors de la resposta immunològica, i els medicaments que interfereixen amb el metabolisme dels lípids, que és essencial per a l'acoblament i la maduració de les partícules del VHC) i la durada de la teràpia s'haurà de definir, per tal de maximitzar la taxa de RVS i minimitzar el risc de desenvolupament de resistències<sup>(247)</sup>.

#### **2.4.10.-Monitorització de la resposta al tractament**

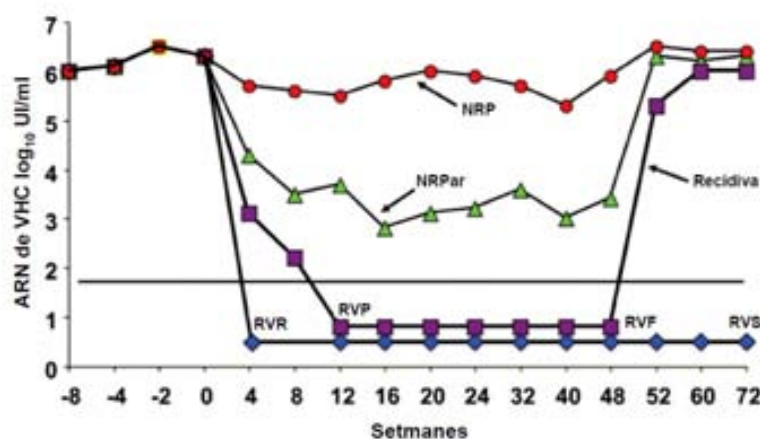
La monitorització de l'eficàcia del tractament es basa en la determinació repetida dels nivells de ARN del VHC. Durant el tractament, la determinació del ARN del VHC s'hauria de realitzar a la setmana 4, 12 i 24 per ajudar a ajustar el tractament. S'ha de valorar la resposta virològica al final del tractament i la resposta virològica sostinguda (RVS) a les 24 setmanes després de finalitzar el tractament<sup>(201)</sup>. Està indicat realitzar un tractament més curt (24 setmanes) en

aquells pacients amb HC-C genotip 1 i un ARN del VHC indetectable a les 4 setmanes de tractament, sempre que l'ARN del VHC basal sigui inferior a 400.000 UI/ml i el pacient no presenti cirrosi.

Els pacients poden classificar-se en diferents grups segons la seva resposta virològica al tractament (figura 4). Els pacients amb RVS són aquells que tenen nivells de ARN del VHC indetectables (< 50 UI/ml) a les 24 setmanes després de finalitzar el tractament. Els pacients amb una resposta virològica ràpida (RVR) són aquells que tenen uns nivells de ARN del VHC indetectables a la setmana 4 de tractament i els mantenen indetectables durant tot el tractament. En canvi, els pacients amb una resposta virològica precoç (RVP) són aquells amb ARN del VHC detectable a la setmana 4 de tractament, però indetectable a la setmana 12 i durant la resta de tractament. Els pacients amb resposta virològica tardana (RVT) són aquells que presenten una reducció del ARN del VHC de més de  $2\log_{10}$  UI/ml però encara detectable a la setmana 12 i indetectable a la setmana 24 que es manté fins al final del tractament. Si la reducció del ARN del VHC és inferior a  $2\log_{10}$  UI/ml a la setmana 12 o encara es detectable a la setmana 24 (50 UI/ml), es recomana suspendre el tractament antiviral. En els pacients amb una càrrega virològica basal baixa (< 400.000 UI/ml), sense predictors negatius de resposta al tractament, és a dir fibrosi hepàtica avançada, cirrosi, estatosi hepàtica, síndrome metabòlica o resistència a la insulina, i una RVR, es pot considerar disminuir la durada del tractament a 24 setmanes en el cas de pacients amb HC-C amb genotips 1 i 4, i a 12-16 setmanes en el cas de pacients amb HC-C amb genotips 2 i 3. Els pacients amb una RVP han de tractar-se durant 48 setmanes,

independentment del genotip i de la càrrega viral. Els pacients amb VHC genotip 1 i una RVT es poden tractar durant 72 setmanes<sup>(201)</sup>.

Es considera pacients no responedors precoços (NRP) aquells que no aconseguen assolir una reducció de  $2\log_{10}$  UI/ml del ARN del VHC després de 12 setmanes de tractament. Els pacients responedors parcials (NRPar) són aquells que presenten una reducció de més de  $2\log_{10}$  UI/ml del ARN del VHC a la setmana 12 setmanes però que mai arriben a tenir nivells indetectables de ARN del VHC durant un mínim de 24 setmanes de tractament. Els pacients que aconseguen una resposta virològica al final del tractament antiviral (ARN del VHC indetectable al final del tractament) però que recauen posteriorment, sense arribar a una RVS, es defineixen com pacients recidivants. La taxa de recidiva després del tractament amb IFN- $\alpha$ peg i RBV és aproximadament del 15-25%<sup>(201)</sup>. Es considera pacients no responedors (NR) tant els NRP, els NRPar com els pacients amb recidivants.



**Figura 4.-**Resposta virològica al tractament

RVR: resposta virològica ràpida, RVP: resposta virològica precoç, NRP: no responedor precoç, NRPar: no responedor parcial, RVF: resposta virològica al final del tractament, RVS: resposta virològica sostinguda.

Modificat de Ghany, M. i col·laboradors. *Hepatology* 2009.

## 2.5.-MELANOMA MALIGNNE

### 2.5.1.-Epidemiologia

Tot i que el melanoma maligne (MM) representa el 4% de tots els càncers dermatològics, és el responsable del 80% de les morts per càncer de pell<sup>(248)</sup>. Els factors de risc més importants per desenvolupar MM són una història familiar de MM, tenir múltiples nevus benignes o atípics i haver presentat anteriorment un MM. La immunosupressió, la sensibilitat solar i l'exposició a radiació ultravioleta són factors de risc addicionals. De fet, cadascun d'aquests factors de risc correspon a una predisposició genètica o a un estrés ambiental que contribueix a la gènesi del MM<sup>(248)</sup>.

### 2.5.2.-Classificació del melanoma maligne

Tota lesió sospitosa de MM ha de ser extirpada. Un cop es confirma el diagnòstic clínic i histològic de MM, es realitza l'estudi d'extensió de la malaltia. Per l'estadificació de la malaltia s'utilitza la classificació TNM de l'*American Joint Committee of Cancer (AJCC)*<sup>(249)</sup> (taula 2a i 2b). La categoria tumor (T) es determina principalment pel gruix micromètric de Breslow, mesurat en mil·límetres, i per la presència o absència d'ulceració. L'índex mitòtic només es considera en els melanomes amb una afectació més superficial, és a dir, amb un gruix de Breslow  $\leq 1$  mm. Segons el valor de T, l'estadi del pacient es correlaciona amb més o menys risc de desenvolupar metàstasis ganglionars i /o a distància i, per tant,

amb la supervivència del pacient. Aquest risc es pot classificar en 4 categories (risc mínim, baix, intermig o elevat), fet que permet protocol·litzar el maneig d'aquests pacients. La sospita d'afectació ganglionar, per la presència d'adenopaties palpables, es confirma sempre citològicament mitjançant una punció-aspiració amb agulla fina, que pot ser guiada o no per ecografia segons la localització de l'adenopatia i les característiques del pacient. En els casos en què l'estudi citològic no sigui conclouent, es procedeix a la biòpsia del gangli. En pacients sense sospita clínica d'afectació ganglionar o a distància, l'estadificació ganglionar (N) es realitza mitjançant una limfogammagrafia per detectar el territori ganglionar de drenatge limfàtic, seguida de la biòpsia del/s gangli/s sentinella/es (BGS) detectat/s mitjançant l'ús de radio-isòtops. El gangli sentinella és el primer gangli en la cadena limfàtica que rep el drenatge aferent directe des de la localització primària de la neoplàsia. No s'indica BGS en els pacients amb MM de risc mínim (estadi 0 o IA) i sense cap sospita d'afectació ganglionar. En canvi, en els pacients amb MM de risc baix i intermig (estadis IB i IIA) es realitza la BGS excepte en aquells casos en els què hi hagi sospita clínica d'afectació ganglionar o visceral. En els pacients amb MM de risc elevat (estadis IIB o IIC), es realitza un estudi d'extensió complet previ a la realització de la BGS. Per tal de realitzar l'estadificació visceral (M), es realitza una exploració física exhaustiva, una analítica general i una radiografia de tòrax a tots aquells pacients diagnosticats de MM invasiu, independentment de l'estadificació de la lesió primària. En els pacients amb MM de baix risc o intermig, les exploracions complementàries no es realitzen d'entrada. En els casos amb sospita de malaltia

metastàsica o en tots els pacients amb MM de risc elevat es realitza un estudi d'extensió complet previ a la realització de la BGS.

T	Grux (mm)	Estat d'ulceració
Tis	NA	NA
T1	≤1,00	a: sense ulceració i índex mitòtic <1/mm <sup>2</sup> b: amb ulceració o índex mitòtic ≥1/mm <sup>2</sup>
T2	1,01-2,00	a: sense ulceració b: amb ulceració
T3	2,01-4,00	a: sense ulceració b: amb ulceració
T4	>4,00	a: sense ulceració b: amb ulceració
N	Num. ganglis metastàtics	Càrrega metastàtica ganglionar
N0	0	NA
N1	1	a: micrometàstasi b: macrometàstasi
N2	2-3	a: micrometàstasi b: macrometàstasi c: metàstasi en trànsit/ satèl·lit sense metàstasi ganglionar
N3	4+ ganglis metastàtics o metàstasi en trànsit/ satèl·lit amb ganglis metastàtics	
M	Lloc	LDH sèric
M0	No metàstasi a distància	NA
M1a	Metàstasi cutànies, subcutànies o ganglionars a distància	Normal
M1b	Metàstasi pulmonars	Normal
M1c	Altres metàstasi viscerals Qualsevol metàstasi a distància	Normal Elevat

Estadiatge clínic				Estadiatge patològic			
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b T2a	N0 N0	M0 M0	IB	T1b T2a	N0 N0	M0 M0
IIA	T2b T3a	N0 N0	M0 M0	IIA	T2b T3a	N0 N0	M0 M0
IBB	T3b T4a	N0 N0	M0 M0	IBB	T3b T4a	N0 N0	M0 M0
IIIC	T4b	N0	M0	IIIC	T4b	N0	M0
III	Tis-T4	N>N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
				IIIB	T1-4a	N2a	M0
					T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					T	N3	M0
IV	Tis-T4	N0-N3	M1	IV	Tis-T4	N0-N3	M1

**Taula 2.-** Classificació i estadiatge del melanoma maligne cutani de l' *American Joint Committee of Cancer (AJCC)*

- a) Classificació TNM del melanoma maligne cutani
- b) Estadiatge TNM del melanoma maligne cutani

*Modificat de Balch, C.M. i col·laboradors. Journal of Clinical Oncology 2009.*

**2.5.3.-Resposta immunitària enfront al melanoma maligne**

Actualment es considera el MM com un dels tipus de càncer més immunogènics per diverses raons. En primer lloc, s'han identificat diversos antígens específics del MM, com ara aquells expressats pels gens de les línies germinals MAGE i NY-ESO-1<sup>(250)</sup>, que provoquen respostes específiques contra el



melanoma, tant per part d'anticossos específics com de limfòcits funcionals<sup>(250)</sup>. A més, el MM metastàtic respon a agents estimulants del sistema immunològic, com ara l'IFN i la IL-2<sup>(251)</sup>. I finalment, varis estudis han correlacionat la quantitat, la qualitat i la distribució d'infiltració limfocítica tumoral amb la supervivència d'aquests pacients<sup>(252-254)</sup>. En conseqüència, en les darreres dècades, la immunoteràpia ha tingut un lloc destacat en la teràpia experimental del MM<sup>(255)</sup>. Els experiments amb animals han proporcionat proves convincentes que es pot induir amb eficàcia la immunitat contra el MM amb regressió del tumor i que aquesta pot procedir tant de la via mediada per anticossos com per la mediada per cèl·lules T<sup>(256)</sup>.

Existeix una evidència creixent que les cèl·lules tumorals esbiaixen el sistema immunitari cap a un estat més immunosuprimit i adquireixen els mecanismes per escapar de la resposta immunològica eficient. De fet, els tumors són capaços d'estimular les Tregs a través de la influència d'alguns factors que encara es deconeixen<sup>(257)</sup>. Les Tregs tenen un paper essencial en mantenir la tolerància pròpia i l'homeostasi immunològica, mitjançant la supressió de diverses respostes immunològiques, tant fisiològiques com patològiques<sup>(258)</sup>. A més, s'ha descrit que les Tregs s'infiltraen en el microambient tumoral i esmorteixen la resposta immunològica contra les cèl·lules tumorals tant en humans com en ratolins<sup>(256)</sup>. Varis estudis han mostrat un augment de Tregs en sang perifèrica en pacients amb melanoma metastàtic en comparació amb controls sans<sup>(259-264)</sup> així com un enriquiment de les Tregs en el microambient tumoral, incloent les lesions primàries, els ganglis limfàtics i les lesions metastàsiques<sup>(265, 266)</sup>. En aquests pacients, les Tregs s'han descrit com a funcionalment immunosuppressives<sup>(265, 267)</sup>.

Fins i tot, alguns estudis han suggerit la presència d'un alt percentatge de Tregs en les lesions primàries de MM i en els ganglis metastàsics com a predictor de recurrència local i de reducció de la supervivència<sup>(268, 269)</sup>, tot i que no s'ha confirmat en altres<sup>(262, 270)</sup>.

#### **2.5.4.-Tractament del melanoma maligne**

El tractament quirúrgic segueix sent el tractament estàndard del MM primari. La cirurgia dels MM estadi I-II resulta en més del 95% de taxa de supervivència als 5 anys<sup>(249)</sup>. Tot i així, entorn un 20% dels MM progressa a malaltia metastàtica, amb unes opcions terapèutiques molt limitades i una supervivència mitja de 8-18 mesos<sup>(249)</sup>. Donat que es considera el MM com un tumor immunogènic, s'han plantejat múltiples estratègies immunoterapèutiques amb la finalitat de superar l'ambient del tumor immunosupressor i augmentar la immunitat contra el MM. En els darrers dos anys s'han aconseguit importants progressos en el tractament de la malaltia en estadi avançat amb l'aprovació de la FDA de nous tractaments amb noves dianes terapèutiques en base a grans estudis en fase III que han demostrat una millora de la supervivència dels pacients amb MM metastàtic<sup>(271)</sup> (taula 3).

Taula 3. Nous agents terapèutics pel melanoma maligne aprovats per la <i>Food &amp; Drug Administration</i>		
Any d'aprovació	Agent	Tipus d'agent i acció
2011	Vemurafenib	Inhibidor kinasa de l'oncogèn BRAF
2011	Ipilimumab	Anticòs monoclonal humà contra el CTLA-4
2011	Interferó alfa-2b pegilat	Interferó modificat amb una vida mitja més llarga i una millora de la seva eficàcia terapèutica
1998	Interleucina 2 a altes dosis	Citocina que promou l'activació i la proliferació dels limfòcits T
1995	Interferó alfa-2b	Potencia la resposta immunològica antitumoral i té propietats antiangiogèniques i proapoptòtiques
1975	Dacarbazina	Agent quimioteràpic alquilant que indueix l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi de cèl·lules tumorals

*Modificat de Lacy KE i col·laboradors. Clinical Medicine 2012.*

#### 2.5.4.1.-Tractament quirúrgic

El tractament inicial de tot MM és l'exèresi de la lesió juntament amb l'ampliació dels marges de resecció segons el gruix micromètric del tumor (gruix de Breslow). La limfadenectomia terapèutica es realitza a tots els pacients amb afectació ganglionar evident i la limfadenectomia selectiva es realitza en aquells casos en els què l'estudi histopatològic de/s gangli/s sentinella/es mostren la presència de micrometàstasis ganglionars. Una recaiguda local és tot aquell nòdul tumoral que apareix a menys de 2 cm de la cicatriu de l'exèresi. En canvi, les metàstasis en trànsit són aquelles en què els nòduls tumorals apareixen entre la cicatriu de l'exèresi del tumor primari (a més de 2 cm) i els ganglis limfàtics regionals, sense arribar a envair aquests últims. El tractament de les recurrències

locals és essencialment quirúrgic. Tot i la manca de dades sobre els marges més adequats, es recomana extirpar la lesió amb un marge de seguretat de 2 cm i reconsiderar la possibilitat de reestadificar el pacient amb BGS. En els casos en què la recurrència local/ en trànsit sigui de forma de múltiples nòduls dispersos, cal considerar alternatives terapèutiques no quirúrgiques.

#### 2.5.4.2.- Tractament quimioteràpic

El MM en estadis avançats no respon de forma significativa als tractaments convencionals com la quimio o la radioteràpia. Tot i així, la dacarbazina s'utilitza com a part del tractament del MM en estadi IV irressecable, encara que la taxa de resposta és només del 20%<sup>(272)</sup>.

#### 2.5.4.3.-Tractament amb interferó-alfa2b

A nivell molecular, l'IFN- $\alpha$  té múltiples efectes en una gran varietat de neoplàsies, com ara el MM, incloent efectes antiangiogènics, immunoreguladors, inductors de la diferenciació, antiproliferatius i proapoptòtics<sup>(273)</sup>. L' IFN- $\alpha$  s'uneix als receptors de l' IFN i activa diverses vies de senyalització, incloent la via del JAK-STAT, la del CRk, la del IRS i la de la MAP quinasa, estimulant així la transcripció de proteïnes que tenen efectes immunològics antitumorals<sup>(274, 275)</sup>. També té efectes relacionats en la promoció de la immunogenicitat tumoral i en millorar la resposta, la maduració i la supervivència de les cèl·lules dendrítiques al tumor, i en afavorir la presentació creuada amb l'antigen que condueix a la

immunitat antitumoral<sup>(273)</sup>. A més, l'IFN- $\alpha$  promou un canvi dels limfòcits Th1 en la immunitat de l'hoste contra el tumor i juga un paper en atreure el trànsit dels limfòcits Th1 cap al tumor<sup>(276)</sup>. Varis estudis suggereixen un mecanisme d'acció immunomodulador de l'IFN en el MM<sup>(277-280)</sup>. Un dels possibles mecanismes de l'efecte immunoregulator de l'IFN- $\alpha$ 2b és a través de les Tregs, mitjançant variacions del seu percentatge en sang perifèrica tal i com s'ha observat en alguns estudis<sup>(263, 264)</sup>.

Recentment, dos metanàlisis d'estudis aleatoritzats han mostrat que el tractament adjuvant amb IFN- $\alpha$ 2b millora tant la supervivència lliure de malaltia com la supervivència global, independentment de la dosi, durada i ruta en comparació amb l'observació en pacients amb MM d'alt risc<sup>(281, 282)</sup>. Tot i així, aquest tractament s'associa a una toxicitat important, similar a la descrita anteriorment amb l'IFN- $\alpha$ 2a en el cas dels pacients amb HC-C, que afecta a la qualitat de vida dels pacients. El tractament amb altes dosis d'IFN- $\alpha$ 2b (*High dose interferon*, HDI) fa anys que està aprovat com a indicació terapèutica pel MM avançat. L'HDI consisteix en una fase d'inducció amb  $20 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup> d'IFN- $\alpha$ 2b via endovenosa 5 dies a la setmana durant 4 setmanes i una fase de manteniment amb  $10 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup> d'IFN- $\alpha$ 2b via subcutània 3 cops per setmana durant 48 setmanes. Actualment al mercat existeix un sol preparat de IFN- $\alpha$ 2b (Intron-A®; Merck & Co.; Inc.; Eshelton Station, NJ, EUA) així com també la seva forma pegilada, IFN- $\alpha$ 2bpeg (PegIntron-A®; Merck & Co.; Inc.; Eshelton Station, NJ, EUA), aquesta darrera aprovada per la FDA com a tractament adjuvant pel MM estadi III, però actualment encara no aprovada a l'estat espanyol. Les contraindicacions principals per iniciar el tractament són: presentar una malaltia

autoimmunitària subjacent, hepatopatia, malaltia cardíaca, malaltia renal greu, epilèpsia, malaltia psiquiàtrica i depressió, infecció pel VHC, anticossos contra el VIH-1 i VIH-2 i el tractament immunosupressor.

#### 2.5.4.4.- Tractament amb interleucina 2

Un altre tractament mèdic adjuvant utilitzat és la IL-2 que promou l'activació i proliferació de limfòcits T, B i cèl·lules NK i estimula la resposta antitumoral de l'hoste. Aquest tractament està indicat per pacients amb MM estadi IV, amb una taxa de resposta objectiva del 16%, incloent un 6% de resposta completa, tot i que s'associa a una toxicitat aguda a curt termini<sup>(283)</sup>.

#### 2.5.4.5.- Tractaments oncogènics

Un dels possibles objectius terapèutics específics del MM és el bloqueig d'oncogens. La mutació que es troba de forma més freqüent en el MM, entre el 50-65%, és una mutació del controlador de l'oncogen BRAF, el BRAF<sup>V600E</sup>, involucrat en la via de proliferació de les proteïnes quinases activades per mitogens (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK)<sup>(284)</sup>. S'han dissenyat inhibidors específics per BRAF<sup>V600E</sup> i s'han fet assajos clínics en pacients amb MM avançat. El primer inhibidor que es va desenvolupar és el vemurafenib i s'ha aprovat per la FDA com a indicació terapèutica per a pacients amb melanoma metastàtic o irreseccable amb la mutació BRAF<sup>V600E</sup>. El vemurafenib ha demostrat de forma consistent més del 50% de taxa de resposta en assajos clínics de fase I, II i III, amb

un increment de la supervivència global i la supervivència lliure de progressió<sup>(285-287)</sup>, encara que aquestes remissions són transitòries, ja que s'han observat recidives. Tot i així, donat que l'administració de vemurafenib no interfereix ni amb la viabilitat ni amb la funcionalitat de les cèl·lules T, permet aplicar aquest tractament en combinació amb la immunoteràpia<sup>(288)</sup>. Una altra diana terapèutica a la via de proliferació MAPK és la inhibició de la quinasa tirosina/ treonina (*tyrosine/threonine kinase*, MEK) que fosforil·la i activa la MAPK<sup>(289)</sup>. Un estudi recent ha demostrat una major supervivència de pacients amb MM avançat amb mutació del BRAF amb el tractament amb trametinib, que és un inhibidor del MEK, en comparació amb la dacarbazina<sup>(290)</sup>.

#### 2.5.4.6.- Tractament amb ipilimumab

El CTLA-4 s'expressa en la superfície cel·lular dels limfòcits T activats, actuant com una molècula inhibidora, donat que competeix per la unió al B7 amb el CD28, que és una molècula co-estimuladora també expressada en els limfòcits T. L'ipilimumab és un anticòs monoclonal humà contra el CTLA-4 que ha mostrat una millora de la supervivència de pacients amb MM avançat<sup>(291)</sup>, tot i que també presenta efectes secundaris importants.

Actualment, quan un pacient amb MM progressa a estadi IV, ja no es considera un aprimer a opció indicar dacarbazina sinó que es determina la mutació del BRAF. Si aquesta està present, s'intenta incloure al pacient en algun programa d'ús expansiu de vemurafenib o dabrafenib. En canvi, si no hi ha la mutació del BRAF, s'indica dacarbazina i quan hi ha progressió, es opta a intentar

l'ús compassiu amb ipimumab que actualment no està aprovat encara com a primera línia de tractament.

#### 2.5.4.7.- Nous tractaments en desenvolupament

Donat que s'han identificat mutacions en el receptor de la tirosin quinasa del factor de cèl·lules mare, anomenat cKit, en el 20% dels melanomes acrals i de mucosa, s'està avaluant l'efecte d'inhibidors del cKit, com ara l'imatinib, el nilotinib o el dasatinib, en pacients amb aquestes mutacions<sup>(271)</sup>. Així mateix, es sap que la formació de nous vasos sanguinis en el tumor pot promoure les metàstasis i el creixement tumoral. El bevacizumab és un anticòs monoclonal que bloqueja la unió del factor de creixement endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) amb el seu receptor, inhibint així l'angiogènesi. El bevacizumab ja està aprovat com a indicació terapèutica en altres tipus de neoplàsies i actualment s'està avaluant el seu ús en el MM<sup>(271)</sup>. Per altra banda, la proteïna 1 de la mort cel·lular programada (*programmed death 1*, PD-1) és una molècula inhibidora de superfície que s'expressa en els limfòcits T. El seu lligand, PDL-1, està present en les cèl·lules tumorals i s'ha associat a un pitjor pronòstic. Actualment s'estan desenvolupant anticòs monoclonals contra el PD-1 pel tractament del MM<sup>(271)</sup>. Finalment, s'estan avaluant diverses vacunes contra antígens tumorals en pacients amb MM avançat que s'injectarien localment a la metàstasi del MM amb l'objectiu d'induir respostes immunològiques tant a nivell local com sistèmic amb poca toxicitat<sup>(271)</sup>.



## 2.6.-TIROÏDITIS INDUÏDA PER INTERFERÓ

### 2.6.1.-Definició

Un dels efectes secundaris més freqüents del tractament amb IFN- $\alpha$  és la disfunció tiroïdal, ja sigui de causa autoimmunitària o no. L'associació entre IFN- $\alpha$  i disfunció tiroïdal va ser descrita per primer cop fa més de 25 anys<sup>(292)</sup> i des d'aleshores varis estudis han descrit una alta incidència de malaltia tiroïdal, sobretot en pacients amb HC-C, que són els que més s'han estudiat<sup>(293)</sup>. Donada la gran varietat d'entitats que engloba aquesta disfunció tiroïdal, recentment s'ha descrit el terme tiroïditis induïda per interferó (TII)<sup>(294)</sup>, classificant-se en TII autoimmunitària i TII no autoimmunitària. La TII autoimmunitària inclou la TH, la MGB i la producció d'anticossos antitiroïdals, antiperoxidasa tiroïdal (aTPO) i /o aTg, sense malaltia clínica. En canvi, la TII no autoimmunitària inclou la tiroïditis destructiva (TD) i l'hipotiroïdisme no autoimmunitari.

### 2.6.2.-Etiopatogènia

Atès que els efectes beneficiosos del tractament amb IFN- $\alpha$  en les infeccions i malalties neoplàsiques són deguts al seu efecte sobre el sistema immunològic, durant molt anys es va pensar que els seus efectes secundaris també eren deguts a una desregulació immunitària. Tot i així, la presència de TII no autoimmunitària, amb una prevalença d'entorn el 50%, i la predilecció de

l'IFN- $\alpha$  per la glàndula tiroide suggereixen que probablement els efectes directes sobre la tiroide també tenen un paper en la etiopatogènia de la TII<sup>(295)</sup> (figura 5).

### 2.6.2.1.-Mecanismes immunològics

L'activació de la via de senyalització JAK-STAT per part de l'IFN- $\alpha$  permet l'activació de ISGs, on s'inclouen gens de citocines i de molècules d' adhesió que poden contribuir al desenvolupament de l'autoimmunitat tiroïdal. L'IFN- $\alpha$  també incrementa l'expressió d'antígens del CMH tipus I en les cèl·lules, entre les que s'inclouen les cèl·lules epitelials tiroïdals<sup>(296)</sup>, que a la vegada poden activar els limfòcits T citotòxics que provocarien un dany tissular i una resposta inflamatòria<sup>(297)</sup>. Un altre efecte de l' IFN- $\alpha$  que pot desencadenar la TII autoimmunitària és l'afavoriment d' una resposta Th1<sup>(221-223, 298)</sup>. Tot i així, cal tenir en compte que la MGB, que clàssicament és una malaltia mediada per una resposta Th2, és una de les manifestacions de la TII autoimmunitària<sup>(294)</sup>. La descripció en un estudi de que la fase inicial de la MGB podria estar condicionada per una resposta Th1<sup>(299)</sup> pot ser una possible explicació respecte a aquest punt. A més, l'IFN- $\alpha$  millora l'activitat de limfòcits, macròfags<sup>(226)</sup> i cèl·lules NK<sup>(218-220)</sup> i també activa neutròfils i monòcits<sup>(220)</sup>. Així mateix, també allibera citocines com la IL-6<sup>(220)</sup>, que s'ha relacionat amb la tiroïditis autoimmunitària, i pot alterar les Tregs<sup>(295)</sup> que també podrien contribuir al desenvolupament de respostes autoimmunitàries.

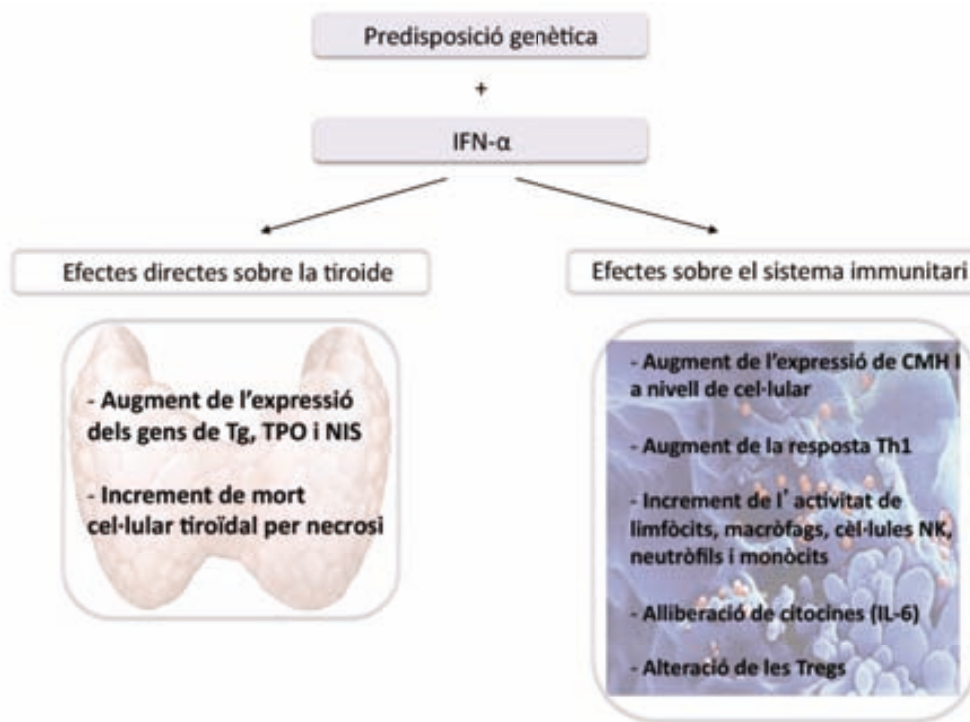
### 2.6.2.2.-Efectes directes de l'interferó-alfa sobre la tiroide

Pocs estudis han valorat els efectes directes de l'IFN- $\alpha$  sobre la glàndula tiroide. S'ha observat que l'IFN- $\alpha$  augmenta l'expressió de gens de la tiroglobulina (Tg), de la peroxidasa tiroïdal (TPO) i del transportador de sodi iode (NIS) en tirocits humans cultivats<sup>(300)</sup>. A més, s'ha observat un increment de mort cel·lular tiroïdal induïda per l'IFN- $\alpha$ <sup>(301)</sup>, per necrosi però no per apoptosi<sup>(302)</sup>.

### 2.6.2.3.-Predisposició genètica a la tiroïditis induïda per interferó

El component genètic té un paper important en l'etiologia de la MAT<sup>(303)</sup>. Per tant, és possible que l'IFN- $\alpha$  pugui desencadenar TII en individus genèticament predisposats<sup>(294)</sup>. Aquesta hipòtesi es recolza en observacions epidemiològiques que mostren variacions de la prevalença de TII en diferents poblacions ètniques<sup>(304)</sup> i entre gèneres, amb una prevalença més alta en dones<sup>(305)</sup>. A més, donat que els anticossos antitiroïdals poden ser un biomarcador per la predisposició genètica a la MAT i que són genèticament heretables<sup>(306)</sup>, el fet que la presència d'anticossos antitiroïdals prèvia a l'inici del tractament amb IFN- $\alpha$  sigui un factor de risc per desenvolupar TII<sup>(307, 308)</sup>, dóna suport al concepte de susceptibilitat genètica pel desenvolupament de TII. Finalment, tal i com s'ha comentat anteriorment, en els darrers anys s'han identificat múltiples gens susceptibles per la MAT que també podrien contribuir

a la susceptibilitat genètica cap a la TII. Totes aquestes dades recolzen el paper genètic de la etiologia de la TII.



**Figura 5.-** Possibles mecanismes pel desenvolupament de de la tiroïditis induïda per interferó

En la etiopatogènia de la tiroïditis induïda per interferó (TII), estan implicats tant la predisposició genètica individual com els efectes autoimmunitaris i els no autoimmunitaris de l'interferó-alfa (IFN- $\alpha$ ). Els efectes directes tòxics cap a la glàndula tiroide inclouen un augment de l'expressió de les proteïnes específiques tiroïdals (receptor de la tirotropina (TSHR), tiroglobulina (Tg), peroxidasa tiroïdal (TPO) i transportador de iode (NIS)) i un augment de la mort de les cèl·lules tiroïdals per necrosi. Els efectes immunitaris inclouen un augment de l'activació del complex major d'histocompatibilitat (CMH) tipus 1, un augment de la resposta d'immunitat cel·lular Th1, la inducció de citocines com la interleucina-6 (IL-6), l'activació de diferents subpoblacions cel·lulars immunològiques i una alteració de les cèl·lules T reguladores (Tregs).

*Modificat de Tomer, Y. i Menconi, F. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009.*

## 2.6.3.-Diagnòstic i tractament

### 2.6.3.1.-Diagnòstic de la tiroïditis induïda per interferó

El diagnòstic de TII no és senzill ja que a vegades la seva simptomatologia es pot confondre amb la de la malaltia de base, com ara la HC-C o una neoplàsia com el MM. Degut a que la TII pot causar hiper o hipotiroïdisme clínic greu<sup>(296, 309-311)</sup>, es recomana realitzar la determinació basal de la funció tiroïdal a tots aquells pacients que inicien tractament amb IFN- $\alpha$  així també de forma periòdica durant el tractament i sempre en presència de clínica suggestiva de disfunció tiroïdal<sup>(394)</sup>. Així mateix, atès que la presència d'anticossos antitiroïdals prèvia a l'inici del tractament amb IFN- $\alpha$  s'ha descrit com un dels factors de risc per desenvolupar TII<sup>(307, 308)</sup>, es recomana també la seva determinació (aTPO i aTg) a nivell basal<sup>(295)</sup>. Actualment no existeix cap prova predictiva establerta que sigui indicativa de presentar un major risc per a desenvolupar TII. Tot i així, recentment s'ha descrit una associació entre concentracions sèriques baixes de CXCL10 i el desenvolupament de TII, suggerint que podria ser un possible test predictiu<sup>(312)</sup>.

Si es desenvolupa una alteració tiroïdal durant el tractament, s'ha de completar l'estudi. En el cas de la tirotoxicosi, s'ha de distingir entre la MGB i la TD mitjançant els anticossos antiTSHR, positius en la MGB i negatius en la TD, i la realització d'una gammagrafia tiroïdal amb I<sup>123</sup>, que serà hipercaptant en el cas de la MGB i hipocaptant en cas de la TD. La TD és un trastorn inflamatori autoilimitat que es caracteritza per una primera fase tiro tòxica, causada per

l'alliberament d'hormones tiroïdals degut a la destrucció tissular, una fase posterior hipotiroïdal, seguida de la resolució del quadre en la majoria de casos<sup>(294)</sup>. És freqüent que la TD s'infradiagnostiqui ja que la majoria de casos són lleus. A més, el fet que la majoria de casos es resolguin espontàniament i que l'hipotiroïdisme permanent es desenvolupi en menys d'un 5% dels casos contribueix a la subestimació de la seva incidència. Per poder realitzar un correcte diagnòstic de l'hipotiroïdisme i distingir entre l'autoimmunitari i el no autoimmunitari, cal determinar la funció i l'autoimmunitat tiroïdal (aTPO i aTg).

### 2.6.3.2.-Tractament de la tiroïditis induïda per interferó

Una tirotoxicosi per TD es tracta simptomàticament amb beta-blocadors. Cal tenir present que, en aquest tipus de pacients, s'ha de monitoritzar la funció tiroïdal per descartar un hipotiroïdisme, ja que aquest es pot desenvolupar poques setmanes després de la fase de tirotoxicosi. En la majoria de casos, no és necessari interrompre el tractament amb IFN- $\alpha$ . En el cas de l'hipertiroïdisme per MGB es pot iniciar tractament amb tioderivats, però monitoritzant la funció hepàtica, sobretot en aquells pacients amb HC-C, degut a que aquesta pot empitjorar. Altres opcions terapèutiques per la MGB serien el tractament amb radioiode o quirúrgic. En el cas de l'hipotiroïdisme, ja sigui de causa autoimmunitària o no, el tractament és substitutiu amb levotiroxina, no essent tampoc necessària la retirada del tractament amb IFN- $\alpha$ .

#### 2.6.4.-Tiroïditis induïda per interferó en pacients amb infecció crònica pel virus de l'hepatitis C

Tot i que la TII s'ha descrit en pacients tractats amb IFN- $\alpha$  per diferents patologies<sup>(313)</sup>, la malaltia on més s'ha valorat és la HC-C. Aquest fet és degut a que és la principal causa d'indicació de tractament. En aquests pacients, la prevalença de disfunció tiroïdal subclínica és del 20-40% i de disfunció clínica del 5-10% durant el tractament amb IFN- $\alpha$ <sup>(314)</sup>.

La TH és la manifestació més freqüent de la TII immunitària en pacients amb HC-C. Com ja s'ha comentat anteriorment, la presència d'anticossos antitiroïdals prèvia a l'inici del tractament amb IFN- $\alpha$  és un factor de risc pel desenvolupament de TH<sup>(307, 308)</sup>. S'ha estimat un valor predictiu de la presència d'aTPO basals del 67% pel desenvolupament de TH durant el tractament amb IFN- $\alpha$ <sup>(296)</sup>. Tot i així, la TH pot desenvolupar-se *de novo* malgrat no tenir anticossos antitiroïdals positius abans del tractament. La positivització d'anticossos antitiroïdals, tant aTPO com aTg, sense clínica, també és freqüent durant el tractament. La incidència de desenvolupar *de novo* anticossos antitiroïdals varia entre el 10-40% segons els estudis<sup>(296, 307, 308, 315)</sup>. Els anticossos antitiroïdals es desenvolupen més freqüentment en dones i en pacients de més edat<sup>(310)</sup> i inclús ho poden fer després de finalitzar el tractament amb IFN- $\alpha$ <sup>(315)</sup>. Els pacients amb anticossos antitiroïdals positius abans del tractament, poden incrementar els seus títols durant el tractament<sup>(307, 308)</sup>. La MGB secundària al tractament amb IFN- $\alpha$  és menys freqüent<sup>(296)</sup>. De fet, només entre un 20 i un 25% de tots els pacients amb tirotoxicosi són per MGB<sup>(305)</sup>, i en la majoria de casos, aquesta no es resol després

de la finalització o la supressió del tractament amb IFN- $\alpha$ <sup>(307, 316, 317)</sup>. La baixa prevalença de MGB durant el tractament amb IFN- $\alpha$  pot estar relacionada amb els seus efectes supressors sobre la resposta immunològica Th2, que juga un paper molt important en la patogènia de la MGB.

La TII no autoimmunitària també és freqüent, representant aproximadament el 50% dels casos de TII i principalment es manifesta en forma de TD<sup>(318)</sup>. Normalment, la TD es resol espontàniament, tot i que en un grup de pacients pot evolucionar cap a un hipotiroïdisme permanent<sup>(309)</sup>. La TII no autoimmunitària també es pot manifestar per un hipotiroïdisme amb anticossos antitiroïdals negatius, normalment és transitori i es resol després de finalitzar el tractament amb IFN- $\alpha$ <sup>(296, 307)</sup>.

La relació entre l'aparició d'autoimmunitat tiroïdal i la resposta al tractament antiviral és controvertida ja que els estudis realitzats mostren resultats discordants, alguns a favor de la relació positiva entre l'aparició d'autoimmunitat tiroïdal i la resposta al tractament i altres en contra<sup>(319, 320)</sup>.

#### 2.6.4.1.-Factors predisposants

S'han descrit varis factors de risc pel desenvolupament de la TII en aquests pacients, com ara el tipus d'ètnies<sup>(304)</sup>, el gènere femení<sup>(305, 321)</sup> i la tirotròpina (TSH) sèrica pre-tractament<sup>(321)</sup>. Tal i com s'ha comentat anteriorment, varis estudis mostren l'associació entre la HC-C i la MAT. S'ha analitzat la influència del genotip viral en la susceptibilitat per desenvolupar TII, que no s'ha confirmat en la majoria d'estudis<sup>(322, 323)</sup>. La pauta terapèutica també podria



influir. Alguns estudis han suggerit que les altes dosis d'IFN- $\alpha$  i la durada del tractament podrien ser factors de risc per TII<sup>(317, 297)</sup>, tot que no s'ha confirmat en altres estudis<sup>(304)</sup>. En canvi, la nova forma pegilada de l'IFN- $\alpha$  no sembla que causi més TII en comparació amb l'IFN- $\alpha$ <sup>(324)</sup>. A més, atès que la RBV indueix un perfil de citocines Th1, és possible que pugui contribuir a la susceptibilitat de TII en pacients amb HC-C tractats amb teràpia combinada<sup>(325)</sup>.

### **2.6.5.-Tiroïditis induïda per interferó en pacients amb melanoma maligne**

Molts pocs estudis han descrit la TII en pacients amb MM, essent la seva prevalença entre 14,9-37,8%<sup>(326-328)</sup>. Aquesta manca d'informació sobre la TII en pacients amb aquesta patologia probablement és deguda a que el tractament amb IFN- $\alpha$  només està indicat en un reduït nombre de pacients amb MM, concretament en aquells que el presenten en fases més avançades. A més, donat l'estat clínic d'aquest tipus de pacients i els efectes secundaris del tractament, no tots els pacients el finalitzen, ja sigui perquè són exitus durant el seguiment o degut a l'abandonament del tractament per mala tolerància, fet que dificulta l'estudi de la TII al llarg de tot el tractament amb IFN- $\alpha$ . En els darrers anys, varis estudis han suggerit que l'aparició d'autoimmunitat, incloent l'autoimmunitat tiroïdal, en pacients amb MM durant el tractament amb IFN podria tenir un paper pronòstic, augmentant la seva supervivència<sup>(329, 330)</sup>, tot i que no s'ha confirmat en tots els estudis<sup>(331, 332)</sup>.



### 3. JUSTIFICACIÓ

El tractament immunomodulador amb interferó-alfa (IFN- $\alpha$ ) té diferents efectes sobre el sistema immunitari. Un d'aquests és l'alteració de diferents subpoblacions limfocitàries, tant de la immunitat innata com de l'adaptativa, i l'alteració de mecanismes de tolerància perifèrica cap a antígens propis. Les cèl·lules T reguladores són un dels mecanismes de tolerància perifèrica i s'encarreguen d'evitar que els limfòcits T autoreactius reaccionin contra antígens propis, impedit així l'aparició de malalties autoimmunitàries. En els darrers anys, també s'ha evidenciat que les cèl·lules T reguladores (Tregs) tenen un paper important en la supressió de la resposta immunològica en contra d'antígens estranys, incloent les infeccions virals. Per exemple, s'ha suggerit que les Tregs podrien estar implicades en la resolució o la persistència de la infecció pel virus de l'hepatitis C (VHC).

Una de les principals indicacions terapèutiques del tractament amb IFN- $\alpha$  és la infecció crònica pel virus de l'hepatitis C (HC-C), de la qual n'és el tractament *gold standard*. Tot i que s'han valorat els efectes immunomoduladors de l'IFN- $\alpha$  sobre diferents subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C en varis estudis, existeixen molt pocs treballs que hagin valorat aquests efectes sobre les Tregs en pacients amb HC-C i la seva relació amb la resposta al tractament, essent els resultats contradictoris. És per aquest motiu que s'ha considerat interessant aprofundir en els efectes immunomoduladors del tractament antiviral amb IFN- $\alpha$ 2a i ribavirina (RBV) en algunes subpoblacions en sang perifèrica de la immunitat innata i adaptativa, i especialment en les Tregs, en pacients amb HC-C. Així mateix s'ha volgut valorar la relació d'aquestes subpoblacions amb la resposta al tractament antiviral en aquests pacients.

El tractament amb IFN- $\alpha$  pot causar varis efectes secundaris que en ocasions provoquen la seva finalització. La tiroïditis induïda per interferó (TII) és un dels efectes secundaris més prevalents d'aquest tractament. Aquesta engloba una ventall molt ampli de disfuncions tiroïdals, tant autoimmunitàries com no autoimmunitàries, que a vegades persisteixen tot i finalitzar el tractament amb IFN- $\alpha$ .

Els pacients on més s'ha estudiat la TII són els que presenten HC-C degut a que aquesta infecció és la principal indicació de tractament amb IFN- $\alpha$ . S'ha suggerit que la TII pot ser causada tant per efectes directes sobre la glàndula tiroïdal com per alteracions en el sistema immunitari, entre les que es trobaria una alteració de la tolerància perifèrica cap antígens propis. Tot i així, existeixen pocs estudis sobre les subpoblacions limfocitàries relacionades amb el desenvolupament de la TII. És per aquest motiu que aquesta tesi s'ha centrat en valorar els efectes immunomoduladors del tractament antiviral amb IFN- $\alpha$  i RBV sobre diferents subpoblacions limfocitàries perifèriques, fent especial èmfasi en les Tregs, en pacients amb HC-C que desenvolupen TII. Tot i que les Tregs s'han relacionat amb la patogènia de la malaltia autoimmunitària tiroïdal (MAT) i, a més, s'ha suggerit que el tractament amb IFN- $\alpha$  les pot afectar, a data d'avui, no existeix cap estudi previ a la literatura que hagi avaluat el paper de les Tregs en pacients amb TII. És per aquest motiu que s'ha trobat interessant avaluar aquestes cèl·lules en relació amb l'aparició de TII.

En general, els símptomes clínics de les malalties autoimmunitàries apareixen temps després de l'inici de la lesió a l'òrgan afecte, fet que dificulta la seva detecció des de les fases inicials, així com el seguiment seqüencial dels

esdeveniments que apareixen a nivell glandular abans que la malaltia sigui diagnosticada per sospita clínica o per estudi hormonal. És per aquest motiu que s'ha trobat interessant valorar si existeixen alteracions en diferents subpoblacions limfocitàries perifèriques relacionades amb l'aparició de la TII, inclús en estadis inicials de la malaltia i si aquestes alteracions precedeixen als canvis hormonals i clínics de la TII, essent així possibles factors predictors de l'aparició de l'entitat. Aquest darrer punt seria de gran importància des d'un punt de vista pràctic ja que de cara al maneig clínic, es podria tenir més informació abans d'iniciar el tractament amb IFN- $\alpha$  i es podria monitoritzar de forma més estricta aquells pacients amb més risc de desenvolupar TII. Cal tenir present que la TII és una entitat sovint infradiagnosticada ja que la seva simptomatologia passa desaparebuda o es confon amb efectes secundaris del propi tractament.

Atès que la pròpia infecció pel VHC s'ha associat *per se* a la MAT, en aquesta tesi s'ha volgut avaluar l'efecte immunomodulador de l'IFN- $\alpha$  sobre diferents subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en un model de TII no relacionat amb la infecció pel VHC, per tal d'evitar qualsevol possible interacció de la infecció viral. Aquest és el cas dels pacients amb melanoma maligne (MM) en estadis avançats tractats amb IFN- $\alpha$ . A més, la TII és una entitat poc avaluada en pacients amb MM i fins ara, cap estudi ha analitzat la resposta del sistema immunitari en els pacients amb MM que desenvolupen TII durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b. Tot i així, cal remarcar la dificultat de realitzar estudis en aquests pacients ja que el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b només està indicat en els casos que presentin estadis avançats de la malaltia i sovint aquests pacients no completen el tractament, ja sigui pel grau de complexitat de la malaltia o per l'abandonament

del tractament degut a efectes secundaris d'aquest. Cal tenir present que el tractament amb IFN- $\alpha$  en els pacients amb MM s'inicia a dosis altes i per via endovenosa, fet que implica una mala tolerància per una part dels pacients.

Degut als pocs o nuls treballs existents sobre les alteracions en subpoblacions limfocitàries en pacients amb TII durant el tractament amb IFN- $\alpha$ , s'ha considerat interessant realitzar una valoració completa incloent diferents subpoblacions tant de la immunitat innata com de l'adaptativa en aquests pacients, fent un especial èmfasi en les Tregs. Tot i així, en un futur, per poder aprofundir en l'estudi de la patogènia d'aquesta entitat, seria convenient poder realitzar estudis d'aquestes subpoblacions limfocitàries en el teixit diana, és a dir a la tiroide, i comparar-los amb els obtinguts en sang perifèrica.





## **4. HIPÒTESIS DE TREBALL**

Es plantegen les següents hipòtesis que seran desenvolupades en els corresponents articles publicats.

*4.1.- Les alteracions basals de subpoblacions limfocitàries a nivell perifèric en pacients amb HC-C tractats amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV poden ser un marcador predictiu de la resposta al tractament.*

S'ha descrit que el VHC és un virus limfotròpic i que la cronicitat de la infecció pel VHC implica alteracions en subpoblacions limfocitàries, concretament una disfunció precoç i persistent de la resposta immunitària dels limfòcits T. Per altra banda, el CD81 té un paper en la modulació de la funció del sistema immunològic ja que és un dels components d'un complex que permet l'activació dels limfòcits B. A més, el CD81 interacciona amb la glicoproteïna E2 de l'embolcall del VHC i aquesta interacció pot modificar la resposta immunològica en pacients amb HC-C. Finalment, s'ha suggerit que les Tregs poden tenir una rellevança en el curs natural de la infecció pel VHC.

Per tant, la primera hipòtesi de treball és que alteracions basals de diverses subpoblacions limfocitàries perifèriques, concretament de limfòcits T (Tregs, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>), de limfòcits B (CD19<sup>+</sup>), i el grau d'expressió de CD81 en els limfòcits B poden ser marcadors predictius de la resposta al tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV en pacients amb HC-C.

4.2.- *El tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV pot modificar diverses subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C i aquests canvis poden influenciar en la resposta al tractament antiviral.*

Molt pocs estudis han valorat els efectes del tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV sobre les Tregs en pacients amb HC-C i el seu paper en relació a la resposta al tractament en aquests pacients no ha estat suficientment estudiat. En canvi, s'han descrit els efectes immunomoduladors del tractament amb IFN- $\alpha$  i RBV sobre altres subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C.

La segona hipòtesi de treball és que el tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV pot modificar diverses subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica, concretament els limfòcits T (Tregs, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>), els limfòcits B (CD19<sup>+</sup>), i el grau d'expressió de CD81 en els limfòcits B en pacients amb HC-C i que aquests canvis poden influenciar en la resposta al tractament antiviral.

4.3.- *Les alteracions basals de subpoblacions limfocitàries a nivell perifèric poden ser un marcador predictiu de l'aparició de TII tant en pacients amb HC-C com en pacients amb MM durant el tractament amb IFN- $\alpha$ .*

La TII és un dels efectes secundaris més freqüents del tractament amb IFN- $\alpha$  i s'ha suggerit que aquesta pot estar causada, en part, per una alteració de la regulació del sistema immunitari. Per altra banda, les malalties autoimmunitàries es caracteritzen per una pèrdua dels mecanismes de tolerància cap a antígens propis. Les Tregs formen part dels mecanismes de tolerància perifèrica i la seva

principal funció és mantenir l'homeòstasi del sistema immunitari, evitant que els limfòcits T autoreactius reaccionin contra els antígens propis. Donat que la pròpia infecció pel VHC s'ha associat a la malaltia autoimmunitària tiroïdal, s'ha volgut estudiar les subpoblacions limfocitàries en un altre model de pacients, no relacionats amb la infecció del VHC, que pot desenvolupar TII durant el tractament amb IFN- $\alpha$  com són els pacients amb MM.

La tercera hipòtesi de treball és que alteracions basals de diverses subpoblacions limfocitàries a nivell perifèric, tant de la immunitat innata com de l'adaptativa i amb especial èmfasi les Tregs, poden ser marcadors predictius del desenvolupament de la TII tant en pacients amb HC-C com en pacients amb MM durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2.

*4.4.- El tractament amb IFN- $\alpha$  pot modificar diverses subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C i en pacients amb MM i aquests canvis podrien estar relacionats amb l'aparició de TII en aquests pacients.*

S'han descrit efectes immunomoduladors del tractament amb IFN- $\alpha$  sobre diferents subpoblacions limfocitàries, com ara els limfòcits T, els limfòcits B, les cèl·lules NKT i les Tregs, que podrien influir en el desenvolupament de la TII.

Per tant, la quarta hipòtesi de treball és que el tractament amb IFN- $\alpha$  pot modificar diverses subpoblacions limfocitàries a nivell perifèric, tant de la immunitat innata com de l'adaptativa i amb especial èmfasi les Tregs, en pacients amb HC-C i en pacients amb MM i que aquests canvis podrien estar relacionats amb el desenvolupament de TII en aquests pacients.

## 5. OBJECTIUS

L'objectiu principal de la tesi ha estat valorar l'efecte del tractament amb IFN- $\alpha$  sobre vàries subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en pacients amb HC-C i en pacients amb MM. D'aquesta manera, s'ha volgut fer una aproximació global de l'efecte immunomodulador de l'IFN- $\alpha$ , tant sobre la immunitat innata com l'adaptativa, fent especial atenció en els mecanismes de tolerància perifèrica, concretament en les Tregs.

Així mateix, també s'ha volgut avaluar si alguna d'aquestes subpoblacions limfocitàries pot ser un marcador predictiu de la resposta al tractament antiviral en els pacients amb HC-C o de l'aparició de TII, tant en pacients amb HC-C com en pacients amb MM durant el tractament amb IFN- $\alpha$ .

Finalment, aquesta tesi també s'ha centrat en la relació que podria existir en els pacients HC-C entre les modificacions d'aquestes subpoblacions limfocitàries i la resposta o no al tractament antiviral. D'altra banda, també s'ha estudiat, tant en pacients HC-C com en pacients amb MM, la seva relació amb l'aparició o no de TII.

Més concretament, els objectius plantejats en aquest estudi són els que es detallen a continuació, seguint l'ordre cronològic dels treballs publicats.

**5.1.- Subpoblacions limfocitàries i expressió de CD81 en els limfòcits B analitzades en sang perifèrica de pacients amb HC-C abans, durant i després del tractament amb IFN- $\alpha$ 2a peg i RBV i la seva relació amb la resposta al tractament antiviral.**

- Cèl·lules T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/-FoxP3<sup>+</sup>).
- Limfocits T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>) i limfòcits B (CD19<sup>+</sup>).
- Expressió de CD81 en els limfòcits B.
- Estudi de les subpoblacions limfocitàries Tregs, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, i de l'expressió de CD81 en els limfòcits B abans, durant i després del tractament antiviral combinat en funció del genotip viral així com la seva relació a la resposta al tractament en funció del genotip viral.
- Estudi de la relació entre les subpoblacions limfocitàries Tregs, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> i l'expressió de CD81 en els limfòcits B i la càrrega viral basal.

Els objectius s'han assolit i s'han publicat en l'article:

*B. Soldevila, N. Alonso, M.J. Martínez-Arconada, R.M. Morillas, R. Planas, A.M. Sanmartí, E.M. Martínez-Cáceres. A prospective study of T- and B-lymphocytes subpopulations, CD81 expression levels in B cells and regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/-FoxP3<sup>+</sup> T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. Journal of Viral Hepatitis 2010; 18 (6): 384-392*

*(factor d'impacte 2010: 3,502 )*

## 5.2.- Caracterització clínica i immunològica de la TII en pacients amb HC-C tractats amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV.

- Prevalença i tipus de TII
- Estudi de les cèl·lules T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/-FoxP3<sup>+</sup>) en sang perifèrica en relació a l'aparició i tipus de TII.
- Estudi de les subpoblacions limfocitàries CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (resposta Th1), CD4<sup>+</sup>CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (resposta Th2), CD19<sup>+</sup>, NK, NKT i iNKT en sang perifèrica en relació a l'aparició i el tipus de TII.
- Estudi de l'expressió de Bcl-2 en limfòcits B en sang perifèrica en relació a l'aparició i tipus de TII.

Els objectius s'han assolit i s'han publicat en l'article:

*B. Soldevila, N. Alonso, M.J. Martínez-Arconada, M.L. Granada, D. Baía, V. Vallejos, M. Fraile, R.M. Morillas, R. Planas, R. Pujol-Borrell, E.M. Martínez-Cáceres, A.M. Sanmartí. A prospective study of lymphocyte subpopulations and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection developing interferon-induced thyroiditis. Clinical Endocrinology 2011; 75 (4): 535-543.*

*(factor d'impacte 2011: 3,168)*



### 5.3.- Caracterització clínica i immunològica de la TII en pacients amb MM tractats amb altes dosis d'IFN- $\alpha$ 2b.

- Prevalença i tipus de TII
- Estudi de les cèl·lules T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/-FoxP3<sup>+</sup>) en sang perifèrica en relació a l'aparició i tipus de TII.
- Estudi de les subpoblacions limfocitàries CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (resposta Th1), CD4<sup>+</sup>CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (resposta Th2), CD19<sup>+</sup>, cèl·lules transicionals (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), NK, NKT i iNKT en sang perifèrica en relació a l'aparició i el tipus de TII.
- Estudi de l'expressió de Bcl-2 en limfòcits B en sang perifèrica en relació a l'aparició i tipus de TII.

Els objectius s'han assolit i s'han publicat en l'article:

*B. Soldevila, N. Alonso, M.J. Martínez-Arconada, M.L. Granada, A. Boada, V. Vallejos, M. A. Fernández-Sanmartín, R- Pujol-Borell, M- Puig-Domingo, A. Sanmartí, E.M. Martínez- Cáceres. Regulatory T cells and other lymphocyte subpopulations in patients with melanoma developing interferon-induced thyroiditis during high-dose interferon- $\alpha$ 2b treatment. Clinical Endocrinology 2013. 78 (4): 621-682.*

*(factor d'impacte 2013: 3,168)*



## 6. MATERIAL I MÈTODES

## 6.1. SUBJECTES D'ESTUDI

### 6.1.1.- Pacients amb infecció crònica pel virus del'hepatitis C

Es van incloure a l'estudi 120 pacients amb HC-C que iniciaven tractament antiviral amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV. Es van reclutar pacients amb HC-C que acudien de manera consecutiva a control a les consultes externes de la Unitat d'Hepatologia del Servei de l'Aparell Digestiu de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona) entre els anys 2006-2008. El diagnòstic de HC-C es va basar en la presència de RNA del VHC durant més de 6 mesos i anticossos anti-VHC positius mesurats per un immunoassaig de tercera generació (Vitros®; OrthoClinical Diagnostics, Rochester, NY, EUA). Tots els pacients eren negatius per l'antígen de superfície de l'hepatitis B i pels anticossos dels VIH tipus 1 i VIH tipus 2. Es van excloure aquells pacients amb malaltia hepàtica de diferent etiologia, malalties autoimmunitàries, consum de més de 20 grams diaris d'alcohol, abús de DVP actual o en el passat. Prèviament al tractament antiviral, cap pacient presentava malaltia tiroïdal, definida com a disfunció tiroïdal i/o autoimmunitat tiroïdal positiva.

Un subgrup de pacients amb HC-C amb RVS al tractament (n=18) es van comparar amb aquells pacients NR (n=17) aparellats per edat, gènere i genotip. Així mateix, els pacients amb HC-C que van desenvolupar TII (n=11) es van comparar amb un grup de pacients amb HC-C que no van desenvolupar TII (n=11) aparellats per edat i gènere.

### **6.1.2.- Pacients amb melanoma maligne**

Es van incloure a l'estudi 30 pacients amb MM d'alt risc (estadis AJCC IIB-C, IIIA-B-C) que van completar el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b després de la cirurgia. Abans del tractament, cap dels pacients presentava malaltia tiroïdal, definida com alteració de la funció tiroïdal i/o autoimmunitat tiroïdal positiva. Els pacients es van reclutar quan acudien de manera consecutiva a control a les consultes externes de Dermatologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol durant els anys 2006-2008. Es van excloure aquells pacients que presentaven contraindicacions per iniciar el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b: malalties autoimmunitàries subjacents, malaltia hepàtica, cardíaca o renal severa, epilèpsia, malaltia psiquiàtrica, infecció pel VHC, anticossos positius pels VIH tipus 1 i VIH tipus 2 i tractament immunosupressor.

Els pacients que van desenvolupar TII (n=9) es van comparar amb pacients amb MM que no van desenvolupar TII durant el tractament (n=9), aparellats per edat i gènere.

### **6.1.3.- Subjectes sans**

Els subjectes sans van ser voluntaris del personal sanitari de l'Hospital Germans Trias i Pujol de que no tinguessin HC-C, ni MM ni cap malaltia autoimmunitària. Els subjectes del grup control van ser comparables per edat i gènere amb els pacients amb MM.

El protocol d'estudi fou aprovat pel Comitè Ètic de l'hospital i es va obtenir el consentiment informat firmat de tots els pacients.

## **6.2. MÈTODES**

### **6.2.1.- Determinacions sèriques i plasmàtiques**

Es va avaluar la funció tiroïdal [tiotropina (TSH), tiroxina lliure (T4l) i 3, 5, 3'-tirodetironina total (T3t)] sèrics i l'autoimmunitat tiroïdal (aTg, aTPO i aTSHR sèrics).

### **6.2.2.- Tractament antiviral i defnició de la resposta al tractament**

Els pacients amb HC-C genotip 1 o 4 van rebre 180 µg setmanals d' IFN- $\alpha$ 2apeg (Pegasys®; Hoffman-La Roche, Basilea, Suïssa) combinats amb 1000-1200 mg diaris de RBV (Copegus®; Hoffman-La Roche) durant 48 setmanes. Els pacients amb infecció HC-C genotip 2 o 3 van rebre 180 µg setmanals de IFN- $\alpha$ 2apeg combinats amb 800 mg diaris de RBV durant 24 setmanes.

### **6.2.3.- Quantificació i genotipat del VHC, estratificació de la malaltia hepàtica**

La determinació de la concentració sèrica de RNA del VHC es va realitzar per PCR en temps real (Abbott real Time HCV®; Abbott Park, IL, EUA; límits dels títols del RNA del VHC 30-10<sup>8</sup> UI/ml). EL genotipat del VHC es va realitzar

utilitzant un assaig comercial (Abbott Real Time HCV Genotype II®; Abbott Park, IL, EUA).

La biòpsia hepàtica es va realitzar en el 63% dels pacients amb genotips 1 o 4. Tot i així, l'índex APRI<sup>(202)</sup> es va calcular en tots els pacients amb HC-C per tal de conèixer el grau de fibrosi hepàtica abans de rebre el tractament antiviral combinat.

La RVS es va definir com ARN del VHC indetectable en sèrum a les 24 setmanes de finalitzar el tractament.

#### **6.2.4.- Tractament amb interferó-alfa2b**

El pacients amb melanoma van rebre un règim HDI que consisteix en una fase d'inducció [20x10<sup>6</sup> UI/m<sup>2</sup> via endovenosa de IFN- $\alpha$ 2b (Intron-A®; Merck & Co.; Inc.; Ehithehouse Station, NJ, EUA) diari del dia 1 al 5 durant 4 setmanes consecutives] i una fase de manteniment [10x20x10<sup>6</sup> UI/m<sup>2</sup> via subcutània de IFN- $\alpha$ 2b 3 cops a la setmana durant 48 setmanes]. Abans d'inciar el tractament, es requerira una analítica sanguínia i un electrocardiograma sense alteracions.

#### **6.2.5.- Definició de tiroïditis induïda per interferó**

Els pacients que van desenvolupar TII (11 pacients amb HC-C i 9 pacients amb MM) es van seleccionar basant-se en l'aparició d'autoanticossos antitiroïdals i/o disfunció tiroïdal. Es va realitzar una gammagrafia tiroïdal amb iode radioactiu (I<sup>123</sup>) en aquells pacients amb TSH suprimida.

El terme TII inclou la TH, definida per hipotiroïdisme o la presència de anticossos aTg i/o aTPO; la MGB, definida per hipertiroïdisme amb positivització dels anticossos aTSHR i una hipercaptació de difusa a la gammagrafia tiroïdal; i la TD, definida com a tirotoxicosi amb anticossos aTSHR negatius i una hipocaptació a la gammagrafia tiroïdal.

#### **6.2.6.- Determinació de les subpoblacions limfocitàries per citometria de fluxe**

Els estudis immunològics es van realitzar en temps basal, és a dir abans de l'inici del tractament, (BT), a la meitat del tractament (MT), a la fi del tractament (FT), a les 24 setmanes post-tractament (PT) i a l'aparició de TII (TT) i els resultats es van comparar entre els grups a cada punt. Les avaluacions immunològiques a TT es van realitzar a partir de mostres criopreservades adquirides en el moment d'aparició de TII en pacients amb TII i es van comparar amb les mostres criopreservades adquirides a MT (3-6 mesos de tractament antiviral en el cas dels pacients amb HC-C control i 6 mesos de tractament amb HDI en el cas dels pacients amb MM control respectivament).

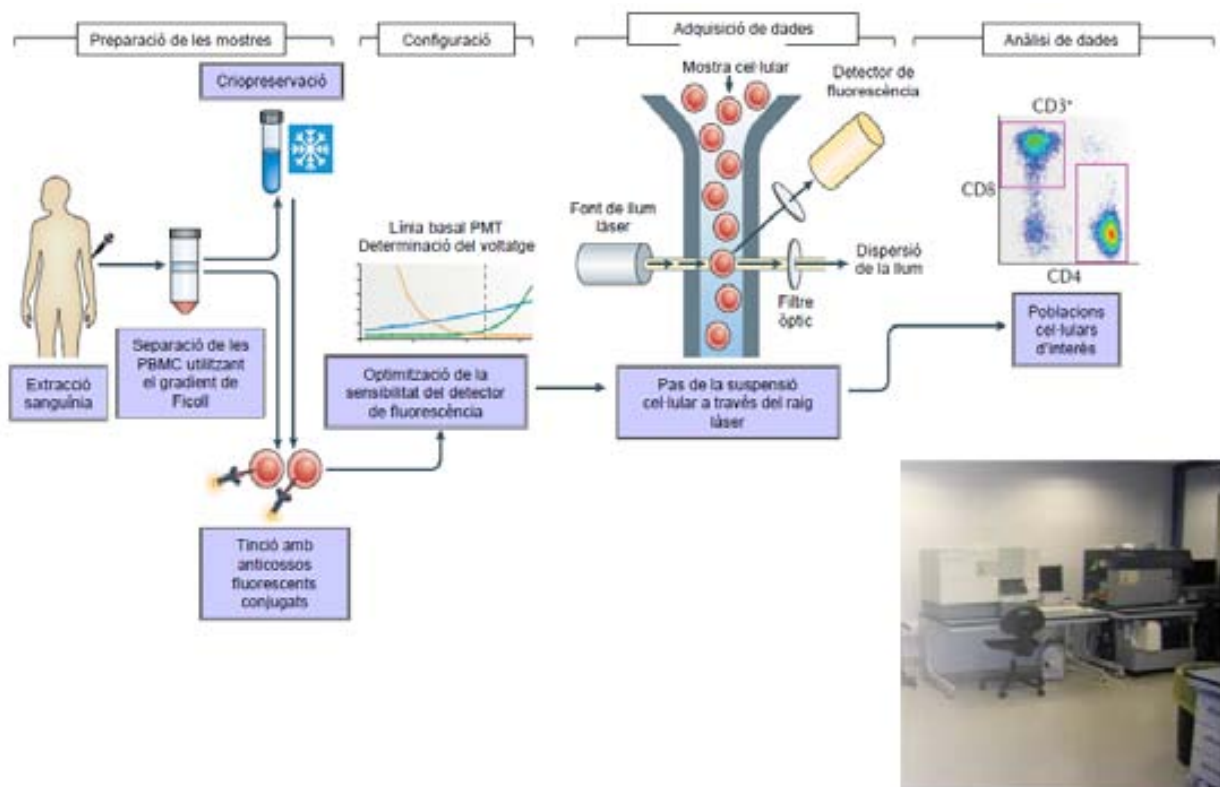
De cada pacient, es van obtenir 4 tubs Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) de 8 ml, amb heparina com anticoagulant, de cada temps abans esmentats. Les PBMCs es van aïllar mitjançant el gradient de centrifugació Ficoll-Hypaque® (Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). El resum d'aquesta tècnica és el següent: tota la sang dels tubs Vacutainer® es va transferir a un tub cònic de 50 ml i es va diluir 1:2 amb sèrum fisiològic. Tot seguit, es va transferir la sang diluïda a un altre tub cònic de 50 ml que contenia



10 ml de Ficoll® i es va centrifugar a 1490 rpm durant 30 minuts a temperatura ambient. Després de la centrifugació, les PBMCs es van recollir de la interfase amb una pipeta Pasteur. Finalment, les PBMCs es van rentar dues vegades amb una solució del sèrum fisiològic i sèrum fetal boví (FCS) al 2%. Per criopreservar les PBMCs, es va preparar una solució que contenia un 20% de dimetilsulfòxid (DMSO) amb un 80% de FCS. A cada alíquota es va afegir aproximadament 500 µl d'una concentració de 3 a  $4 \times 10^6$  cèl·lules/ml i es va afegir gota a gota un volum igual de DMSO a 20%. Després, es van transferir les alíquotes a un congelador a  $-80^{\circ}$  C durant 24 hores i posteriorment es van emmagatzemar en un contenidor de nitrogen líquid fins al seu ús. Per descongelar les PBMCs, es van descongelar les alíquotes en un bany d'aigua a  $37^{\circ}$  C. Quan estaven quasi descongelades, es va afegir 10 ml de solució salina tamponada amb fosfats (PBS) amb FCS al 10% i es van centrifugar dues vegades durant 5 minuts a 1200 rpm. Després del segon rentat, les PBMCs es van resuspendre en 1 ml de PBS amb FCS al 10% i es van comptar en càmera de Neubauer.

Per identificar les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica es va seguir el següent protocol. Les PBMCs descongelades es van tenyir amb molècules de superfície amb diferents combinacions dels següents anticossos monoclonals: CD3-ficoeritrina-cianina 5 (PECy5), CD4-isocianat de fluoresceïna (FITC), CD8-ficoeriterina (PE), CD3<sup>+</sup>- $\gamma\delta$ -aloficocianina (APC), CD19-PECy5, CCR5-PECy5, CD3-FITC, CD8-FITC, CD24-FITC, CD81-PE, iNKT-PE, CCR7-PE, CD16/56-PE, CD38-PE, CD4-APC, CRTH2-APC, CD27-APC, (tots de Becton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA, EUA) durant 30 minuts a  $4^{\circ}$  C i protegides de la llum. Després de la incubació amb els anticossos, les PBMC es

van rentar dues vegades amb FACSFlow (PBS) i es va procedir a l'anàlisi per citòmetre de fluxe, utilitzant-se el citòmetre mutiparàmetres de 4 colors FACSCalibur® (BD BioSciences) i el programa de software CellQuest® (BD BioSciences) (figura 6).



**Figura 6.-**Exemple d'experiment de citometria de fluxe

La preparació de les mostres sanguínies requereix sovint la separació de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) mitjançant el gradient Ficoll i en ocasions la criopreservació abans de la tinció amb anticossos conjugats fluorescents. La configuració de l'instrument implica l'establiment dels guanys de voltatge pels tubs fotomultiplicadors (PMT) per tal d'assolir una sensibilitat òptima. L'adquisició de les dades implica el pas de les cèl·lules tenyides a través d'un feix de làser i el registre de l'emissió de fluorescència a partir de la unió de tots els anticossos conjugats. Posteriorment, es realitza l'anàlisi de dades en què es defineixen les poblacions cel·lulars d'interès.

*Modificat de Maecker HT i col·laboradors. Nature Reviews Immunology 2012.  
PBMC: Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, PMT: tubs fotomultiplicadors.*

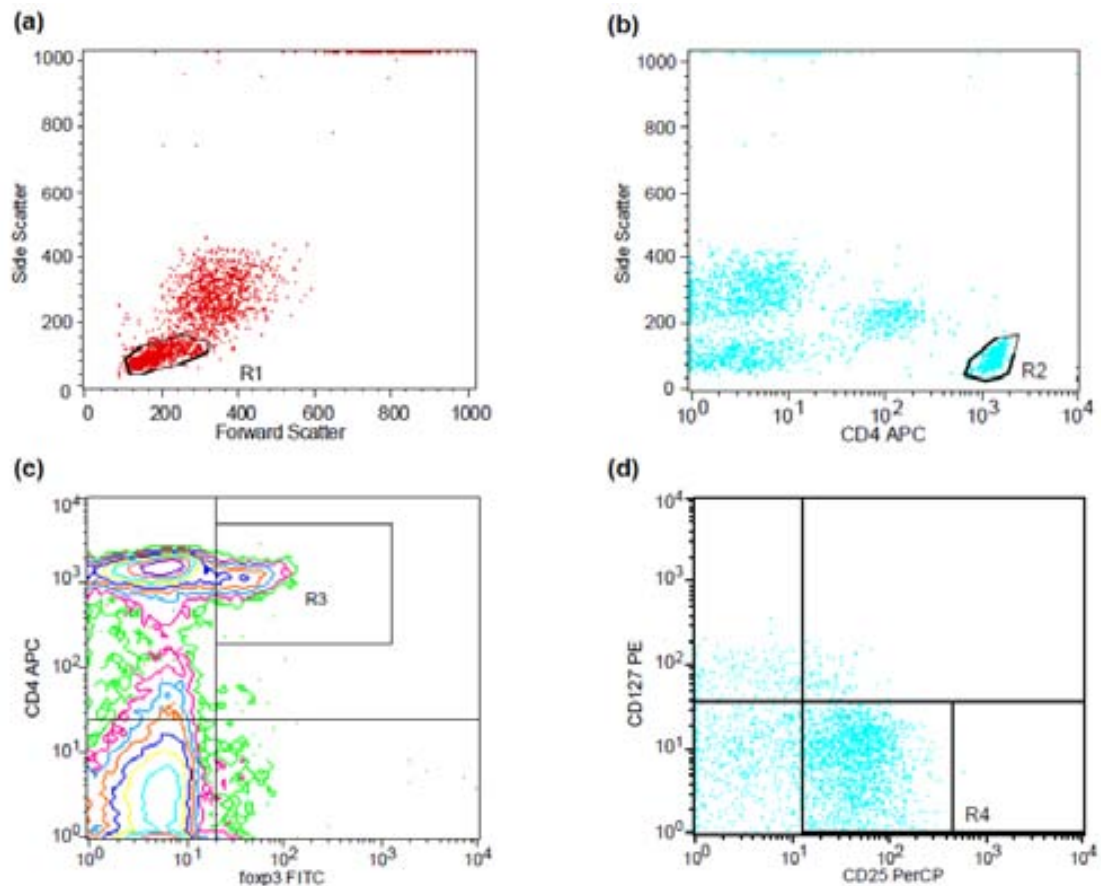
Pel marcatge de les Tregs ( $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}FoxP3^+$ ), les PBMCs descongelades es van incubar durant 30 minuts amb CD4-APC, CD25-PECY5 i CD127-PE a 4° C. Després de fixar i permeabilitzar les cèl·lules (FoxP3 staining buffer set, eBioscience Inc.®, San Diego, CA, EUA), aquestes cèl·lules es van rentar i es van bloquejar de possibles lligaments no específics, utilitzant sèrum normal de rata. Posteriorment, les cèl·lules es van incubar amb anti-FoxP3-FITC humà (PCH101; ebiosciences) o l'isotip control durant 45 minuts a 4°C a les fosques, es van rentar posteriorment dues vegades amb la solució permeabilitzadora del *kit* i es van resuspendre en un tampó de tinció per citometria de fluxe. Finalment, es van analitzar per citòmetre de fluxe, utilitzant com a citòmetre un FACSCalibur (Becton Dickinson®) que és capaç de diferenciar 4 marcadors fluorescents diferents. Per analitzar la població es va seleccionar en primer lloc una *gate* de limfòcits segons volum i rugositat de les cèl·lules (*Forward Scatter/ Side Scatter*). D'aquesta població, es van seleccionar els limfòcits  $CD4^+$  i posteriorment, dels limfòcits  $CD4^+$  es van seleccionar aquells que eren  $FoxP3^+$ . A partir d'aquesta *gate*, es va crear un *dot plot* de CD25 contra CD127 per tal de calcular el percentatge de cèl·lules  $CD4^+FoxP3^+CD25^+CD127^{low/-}$  (Figura 7).

El marcatge citoplasmàtic de Bcl-2 en els limfòcits B ( $CD19^+$ ) es va realitzar de forma similar al del FoxP3. Després de la tinció de superfície de les cèl·lules  $CD19^+$ , les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar, es van tenyir amb Bcl-2 o el seu isotip control i posteriorment es van incubar durant 45 minuts a 4 °C a les fosques. Finalment, es van rentar dues vegades amb la solució

permeabilitzadora i es van resuspendre en un tampó de tinció per citometria de fluxe.

Es van estudiar els percentatges de les subpoblacions limfocitàries CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>), iNKT<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, cèl·lules B transitcionals (CD24<sup>high</sup>CD28<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> i Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/-FoxP3<sup>+</sup>) així com la intensitat mitjana de fluorescència (MFI) de CD81 en els limfòcits B (CD19<sup>+</sup>) i la MFI de Bcl-2 en els limfòcits B (CD19<sup>+</sup>).

Totes les mostres de cada pacient dels estudis longitudinals es van processar en el mateix experiment pel mateix tècnic a cegues per tal d'evitar la variabilitat interassaig.



**Figura 7.**-Anàlisi de les cèl·lules T reguladores en sang perifèrica per citometria de fluxe

Les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) es tenyeixen amb anti-CD4-APC, FoxP3-FITC, CD127-PE i CD25-PECy5, tal i com s'especifica en l'apartat Material i Mètodes. Per a l'anàlisi de citometria de fluxe, es selecciona la subpoblació de limfòcits a partir de les PBMCs basant-se en la mida (*Forward Scatter*, FSC) i la complexitat (*Side Scatter*, SSC) (R1, a). Els limfòcits CD4<sup>+</sup> es seleccionen a partir de la tinció positiva de les PBMCs per CD4<sup>+</sup> i de SSC (R2, b). De totes les cèl·lules CD4<sup>+</sup>, es seleccionen aquelles que són FoxP3<sup>+</sup> (R3, c). De les cèl·lules CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, es seleccionen aquelles que són CD127<sup>low/-</sup> i CD25<sup>+</sup> (R4, d).

APC: alofocianina, FITC: isocianat de fluoresceïna, PE: ficoeriterina, PERCEP o PECy5: ficoeritriniana 5.

### 6.3. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Es va utilitzar el paquet estadístic SPSS (SPSS/versió Windows 12, SPSS® Inc, Chicago, IL, EUA) i el programa GraphPrism (versió 4.0B, graphPad, La Jolla, CA, EUA) per l'anàlisi de dades i la realització de les gràfiques. La distribució normal de les variables es va avaluar mitjançant el test de distribució de Kolmogorov-Smirnov. Les variables quantitatives van ser expressades com mitja  $\pm$  desviació estàndard (DS) si seguien una distribució normal, i com mitjana (rang interquartil) si no seguien una distribució normal. Les variables categòriques van ser expressades com percentatge i freqüències. Les diferències entre dos grups es van analitzar mitjançant el test de la U de Mann-Whitney i les de entre tres grups mitjançant l'anàlisi de la varianza (ANOVA). La comparació de dues variables relacionades es va realitzar mitjançant la prova de rangs amb signe de Wilcoxon. Les diferències en les proporcions es van analitzar mitjançant el test de la Chi quadrada. Les relacions entre variables quantitatives foren analitzades mitjançant el càlcul dels coeficients de correlació de Spearman. Es va utilitzar la prova de regressió logística per predir el resultat d'una variable categòrica en funció de vàries variables independents. La significació estadística es va considerar per una  $p < 0,05$ .

## **7. INVESTIGACIÓ I RESULTATS**

**Estudis publicats (en ordre cronològic)**

## 7.1. PRIMER ESTUDI

*A prospective study of T- and B-lymphocytes subpopulations, CD81 expression levels in B cells and regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment.*

Estudi prospectiu de les subpoblacions de limfòcits T i B, de l'expressió de CD81 en les cèl·lules B i de les cèl·lules T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> en pacients amb infecció crònica pel VHC durant el tractament amb interferó-alfa2a pegilat i ribavirina.

B. Soldevila, N. Alonso, M.J. Martínez-Arconada, R.M. Morillas, R. Planas, A.M. Sanmartí, E.M. Martínez-Cáceres.

*Journal of Viral Hepatitis 2010; 18 (6): 384-392*

(factor d'impacte 2010: 3,502 )



# A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment

B. Soldevila,<sup>1,4</sup> N. Alonso,<sup>1,4</sup> M. J. Martínez-Arconada,<sup>2</sup> R. M. Morillas,<sup>3,4</sup> R. Planas,<sup>3,4</sup> A. M. Sanmartí<sup>1,4</sup> and E. M. Martínez-Cáceres<sup>2,4</sup> <sup>1</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Immunology, Laboratory of Immunobiology for Research and Application to Diagnosis (LIRAD)-Blood and Tissue Bank (BST), Health Science Research Institute 'Germans Trias i Pujol', Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, CIBEREHD, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; and <sup>4</sup>Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain

Received December 2009; accepted for publication February 2010

**SUMMARY.** Resolution of hepatitis C virus (HCV) infection requires a complex interplay between innate and adaptive immune responses. The role of lymphocyte subpopulations during combined antiviral treatment remains to be defined. This study was conducted to assess the effect of pegylated interferon-alpha2a (pegIFN- $\alpha$ 2a) and ribavirin treatment on peripheral blood lymphocytes, mainly on CD81 expression on B cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) in patients with chronic HCV infection. Thirty-five patients with chronic HCV infection who started pegIFN- $\alpha$ 2a and ribavirin treatment were enrolled. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained at baseline before treatment (BT), mid-treatment (MT), the end of treatment (ET) and 24 weeks post-treatment (PT). During combined antiviral treatment, a significant decrease in the percentage of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>gamma/delta ( $\gamma\delta$ )<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> lymphocyte

subpopulations and Tregs was observed. There was also a significant increase in the percentage of the CD4<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation and in CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B cells when BT was compared with ET (all  $P < 0.05$ ). Seventeen patients were nonresponders (NR) and 18 had a sustained virological response (SVR). At baseline, NR patients had higher CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B cells ( $P = 0.017$ ) and a higher Tregs percentage ( $P = 0.025$ ) than SVR patients. Our results suggest that immunomodulation fluctuates during antiviral treatment and that percentage CD81 expression levels on B cells and Tregs might be useful as an immunological prognostic factor for pegIFN- $\alpha$ 2a and ribavirin treatment response in chronic HCV infection.

**Keywords:** CD81, FoxP3, HCV, interferon-alpha treatment, lymphocyte subpopulations, tregs.

Abbreviations: APC, allophycocyanin; BT, before treatment; E2, envelope 2; ET, end of treatment; FITC, fluorescein isothiocyanate; FSC, forward scatter; HCV, hepatitis C virus; iTregs, inducible Tregs; MFI, geometrical mean fluorescence intensity; MT, mid-treatment; NR, nonresponders; nTregs, natural Tregs; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; pegIFN- $\alpha$ 2a, pegylated interferon-alpha2a; PT, 24 weeks post-treatment; SSC, side scatter; SVR, sustained virological response; Tregs, regulatory T cells.

Correspondence: Berta Soldevila, Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari 'Germans Trias i Pujol', Carretera del Canyet s/n, Badalona 08916, Spain. E-mail: bsoldevila.germanstrias@gencat.cat

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease worldwide, affecting 1.5–2.2% of the Western population [1]. In more than 70% of infected individuals, HCV may become chronic and lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2]. The current standard therapy for chronic HCV infection consists of pegylated interferon-alpha (pegIFN- $\alpha$ ) and ribavirin [3].

Resolution of HCV infection requires a complex and coordinated interplay between innate and adaptive immune responses [4]. On the other hand, HCV infection persistence

has been associated with a narrowly focused and/or delayed response of T lymphocytes and limited B-lymphocyte activation [4–6]. HCV-RNA has been detected in peripheral blood lymphocytes, mainly CD8<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> B cells, suggesting that HCV is a lymphotropic virus [7,8], and this lymphotropism may be responsible for a specific immune response [9–12]. CD81 is a member of the tetraspanin family of membrane proteins, which contain four transmembrane domains, short intracellular domains and two extracellular loops [13]. Tetraspanins have been shown to be involved in multiple physiological functions as well as in numerous processes, such as infectious diseases [13]. CD81 is expressed on the surface of a variety of cell types and has a diverse spectrum of biological activity. The second extracellular loop of CD81 has recently been shown to interact with the HCV envelope 2 (E2) glycoprotein *in vitro* [9]. In B cells, CD81 is a component of the CD19-CD21-CD81-Leu 13 molecular complex, which plays a role in B-cell activation [14]. Recently, CD81 has been identified as one of the HCV receptor candidates in B lymphocytes [9], facilitating their HCV infection. CD81 expression on B lymphocytes of patients with HCV infection has been evaluated in a few studies with reduced numbers of patients, with conflicting results [11,12,15–17]. In the last few years, regulatory T cells (Tregs) have been shown to play an important role in the suppression of immune response to self as well as foreign antigens [18], including infections by nonself pathogens, such as viruses [19]. CD4<sup>+</sup>-Tregs are divided into two major subtypes, thymus-derived natural Tregs (nTregs) and peripherally inducible Tregs (iTregs), and can be identified by CD25 (interleukin-2 receptor alpha chain) expression [20] and low or absent CD127 (interleukin-7 receptor alpha chain) expression [21]. The key marker of Tregs is currently the expression of the forkhead/winged helix family transcription factor gene (FoxP3) [22]. Indeed, several authors have suggested the relevance of Tregs in the natural course of HCV infection [23–26]. However, their role in relation to patient response to antiviral treatment remains to be determined.

This study was conducted to assess the effect of combined antiviral treatment on peripheral blood lymphocyte subpopulations, mainly CD81 expression on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes and Tregs, defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells, in patients with HCV infection and to analyse their relationship with therapeutic outcome.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Thirty-five treatment-naïve patients (24 men, 11 women; mean age: 44.8 ± 10 years) with chronic HCV infection receiving antiviral treatment consisting of pegIFN- $\alpha$ 2a and ribavirin were enrolled in this study. HCV genotype percentages were distributed as follows: genotype 1 or 4: 77.1%, genotype 2 or 3: 22.9%. Median baseline HCV-RNA

was 700 000 (657 750–1 953 246) IU/mL. The diagnosis of chronic HCV infection was based on the detection of HCV-RNA for more than 6 months and positive anti-HCV measured by third-generation enzyme immunoassay (Vitros ECI<sup>®</sup>; Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). All patients were negative for hepatitis B surface antigen and antibodies to the human immunodeficiency viruses types 1 and 2. Those with liver disease of different origin, consumption of more than 20 g/day alcohol and past or present intravenous drug abuse were excluded. Patients were recruited from the outpatient clinic of the Department of Gastroenterology and Liver Unit of University Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). The study was approved by the local ethical committee, and written informed consent was obtained from all patients.

### Antiviral treatment

Patients with HCV genotypes 1 or 4 received 180  $\mu$ g once weekly of pegIFN- $\alpha$ 2a (Pegasys<sup>®</sup>; Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) combined with 1000–1200 mg daily of ribavirin (Copegus<sup>®</sup>; Hoffman-La Roche) for 48 weeks. Patients with HCV genotypes 2 or 3 received 180  $\mu$ g once weekly of pegIFN- $\alpha$ 2a combined with 800 mg daily of ribavirin for 24 weeks.

### Definition of response to therapy

Sustained virological response (SVR) was defined as undetectable HCV-RNA in serum at 24 weeks post-treatment.

### HCV quantification and genotyping

Serum HCV-RNA concentration was measured by real-time PCR (Abbott RealTime HCV<sup>®</sup>; Abbott Park, IL, USA; limits of HCV-RNA titres were 30–10<sup>8</sup> IU/mL). HCV genotyping was assayed using a commercial assay (Abbott RealTime HCV Genotype II<sup>®</sup>; Abbot Park, IL, USA).

### Stage of liver disease

Liver biopsy was performed in 63% of patients with genotype 1 or 4. However, the APRI index [27] was calculated in all the patients of the study ( $n = 35$ ) to know the degree of liver fibrosis before receiving combined antiviral treatment.

### Flow cytometry analysis

Immunological studies were performed at baseline before treatment (BT), mid-treatment (MT), end of treatment (ET) and 24 weeks post-treatment (PT). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and cryopreserved in 90% FCS and 10% DMSO and kept in liquid nitrogen until use.

Peripheral blood mononuclear cells were stained after thawing following standard protocols. Briefly, cells were stained with surface molecules with several combinations of the following monoclonal antibodies: CD3-phycoerythrin cychrome (PECy5), CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD8-phycoerythrin (PE), CD3<sup>+</sup>-gamma/delta ( $\gamma\delta$ )-allophycocyanin (APC) and CD19-PECy5, CD81-PE (all from Becton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA, USA) for 30 min at 4 °C and protected from light. After incubation, cells were washed and resuspended in flow cytometry staining buffer.

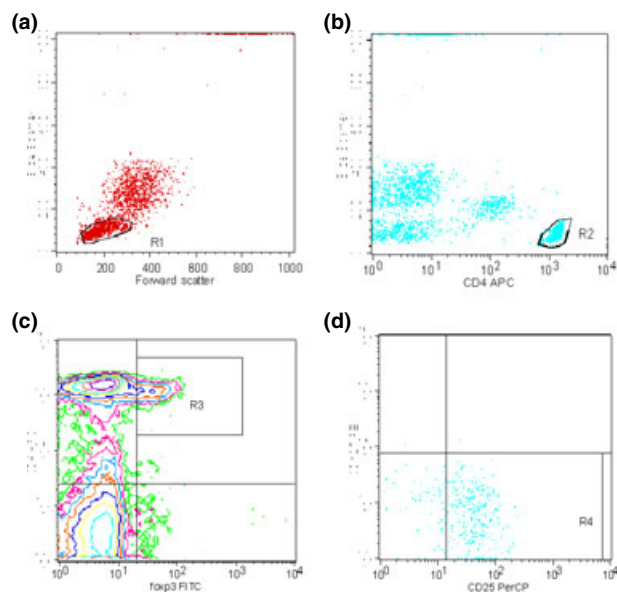
Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) staining was performed as follows: cells were stained with CD4-APC, CD127-PE and CD25-PECy5 for 30 min at 4 °C. After incubation, cells were washed and fixed/permeabilized (fixation/permeabilization buffer; eBiosciences Inc., San Diego, CA, USA) for 45 min in the dark and washed twice with permeabilization buffer (eBiosciences Inc.). After centrifugation, a blocking step was performed with 2% normal rat serum in a permeabilization buffer, at 4 °C for 15 min, after which 20  $\mu$ L of FITC-conjugated anti-human FoxP3 antibody (PCH101; eBiosciences) or isotype control were added and incubated for 45 min at 4 °C in the dark. Cells were then

washed twice in permeabilization buffer and resuspended in flow cytometry staining buffer.

Samples were acquired in a four-colour multiparameter flow cytometer (FACScalibur<sup>®</sup>; BD Biosciences). The percentages of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> and Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) (Fig. 1) lymphocyte subpopulations as well as geometric mean fluorescence intensity (MFI) of CD81 on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes were studied. Data were analysed with CellQuest software<sup>®</sup> (BD Biosciences). All samples of the longitudinal study of each patient were processed in the same experiment by the same blinded researcher to avoid interassay variability.

### Statistical analysis

Quantitative results were expressed as mean  $\pm$  SD or medians (interquartile range). Departure from normality was assessed by the Kolmogorov–Smirnov distribution test. Differences between groups were tested by the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Pair-wise comparisons were based on the signed rank test. Relationships among variables were tested with the Spearman's correlation coefficient. To explore factors predicting the response to combined antiviral treatment, a logistic regression analysis was performed with presence/absence of response to antiviral treatment as dependent variable. Qualitative results were expressed as proportions, and differences between nonresponders (NR) and SVR groups of patients were tested by the chi-square test. Two-tailed *P* values of 0.05 or less were considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS/Windows version 12.0; SPSS Inc.; Chicago IL, USA) and the software program GraphPad Prism (4.0b version; GraphPad, La Jolla, CA, USA).



**Fig. 1** Flow cytometric analysis of peripheral blood Tregs. Cells were stained with anti-CD4-allophycocyanin (APC), FoxP3-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD127-PE and CD25-PE Cy5 as specified in Patients and Methods. For the flow cytometric analysis, the lymphocyte subpopulation from peripheral blood cells on the basis of forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) was selected (see R1, a). CD4<sup>+</sup> lymphocytes were gated by positive staining of CD4<sup>+</sup> cells and SSC (R2, b). From CD4<sup>+</sup> cells, those that were FoxP3<sup>+</sup> were selected (upper right quadrant, c). From CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells, those that were CD127<sup>low/-</sup> and CD25<sup>+</sup> were selected (lower right d).

## RESULTS

### Patient characteristics

Eighteen of the 35 patients who received combined antiviral treatment achieved SVR, while 17 were NR (13 relapsed after the end of the treatment, three were early NR and in one patient antiviral treatment was stopped before the 24th week owing to side effects of the treatment). NR patients had higher viral load and higher APRI index than SVR patients before receiving treatment. Baseline clinical characteristics of the patients are shown in Table 1.

### Effect of combined antiviral treatment on lymphocyte subpopulations

The effect of combined antiviral treatment on peripheral blood lymphocyte subpopulations was assessed. The dynamics of lymphocyte subpopulations studied during the treatment are summarized in Table 2. A statistically

	NR	SVR	P value
N	17	18	
Sex (M/F)	12/5	12/6	NS
Age (years, mean $\pm$ SD)	46.41 $\pm$ 8.5	43.39 $\pm$ 11.28	NS
ALT (U/L)	103.69 $\pm$ 87.22	87.94 $\pm$ 45.85	NS
HCV genotypes (1 or 4/2 or 3)	14/3	13/5	NS
HCV-RNA [IU/mL, median (p25–p75)]	1 710 000 (700 000–5 291 722)	700 000 (439 327–700 000)	<0.001
APRI index (mean $\pm$ SD)	1.27 $\pm$ 1.20	0.74 $\pm$ 0.36	NS

**Table 1** Baseline patient characteristics

NR, nonresponder patients; SVR, sustained virological response patients; NS, not significant.

**Table 2** Effect of combined antiviral treatment on lymphocyte subpopulations

	BT	MT	ET	PT
CD3 <sup>+</sup> (%)	65.62 $\pm$ 14.50	62.89 $\pm$ 13.75	55.73 $\pm$ 11.90*	60.62 $\pm$ 13.6***
CD4 <sup>+</sup> (%)	48.76 $\pm$ 14.55	52.76 $\pm$ 15.01*	53.58 $\pm$ 15.04*	47.57 $\pm$ 13.34**
CD8 <sup>+</sup> (%)	40.11 $\pm$ 12	36.96 $\pm$ 11.87*	36.57 $\pm$ 11.17*	41.73 $\pm$ 11.10**
CD3 $\gamma$ $\delta$ <sup>+</sup> (%)	5.78 $\pm$ 3.5	5.09 $\pm$ 2.89*	4.04 $\pm$ 2.73*	4.73 $\pm$ 3.39**
CD19 <sup>+</sup> (%)	15.62 $\pm$ 6.79	10.55 $\pm$ 12.78*	9.80 $\pm$ 6.63*	17.06 $\pm$ 8.56**
CD81 on CD19 <sup>+</sup> B lymphocytes (MFI)	41.52 $\pm$ 21.5	47.81 $\pm$ 30.25	49.24 $\pm$ 26.23*	59.24 $\pm$ 29.66*
Tregs (%)	2.95 $\pm$ 2.29	4.06 $\pm$ 2.15*	4.87 $\pm$ 2.58*	3.93 $\pm$ 1.82***

BT, before treatment; MT, mid-treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks post-treatment; MFI, geometrical mean fluorescence intensity. \* $P < 0.05$  with respect to BT. \*\* $P < 0.05$  with respect to ET.

significant decrease in CD3, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations was observed during the combined antiviral treatment (BT vs ET), with a significant increase at PT compared with ET. However, the dynamics of the CD4<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation differed, with a significant increase during treatment (BT vs ET) and a statistically significant decrease at PT compared with ET. CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes rose significantly during treatment (BT vs ET) and remained increased at PT compared with ET. On the other hand, during antiviral treatment, a statistically significant rise in the Tregs percentage was observed (BT vs ET), which decreased at PT compared with ET, although it remained significantly higher than BT.

*The percentages of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations did not differ in relation to virological outcome*

The effects of combined antiviral treatment on these lymphocyte subpopulations in relation to virological outcome

are depicted in Fig. 2. The NR and SVR groups had a similar pattern on longitudinal analysis of the different lymphocyte subpopulations. When the two groups studied were compared at BT, MT, ET and PT, no differences were observed in the percentages of these lymphocyte subpopulations (data not shown). SVR ( $n = 18$ ) and early NR ( $n = 3$ ) patients, excluding relapse subjects, were also compared at baseline. No differences were observed in the percentages of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations between the two groups (data not shown).

*CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes were increased in nonresponder patients*

The effect of combined antiviral treatment on peripheral CD19<sup>+</sup> B-cell CD81 expression levels in relation to virological outcome was assessed (Fig. 3). A similar pattern was observed in the NR and SVR groups. Thus, an increase in CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes was observed during combined antiviral treatment (BT vs ET)



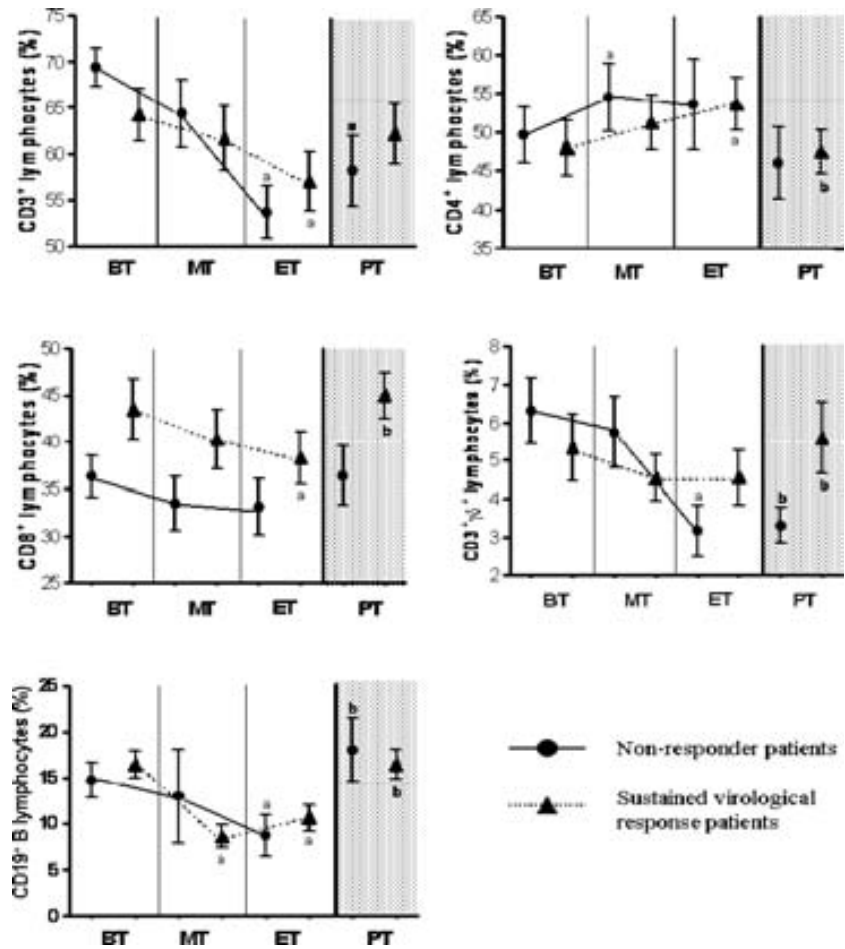


Fig. 2 Lymphocyte subpopulations during antiviral treatment in relation to virological outcome. BT, before treatment; MT, mid-treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks after post-treatment; MFI, geometrical mean fluorescence intensity. <sup>a</sup>*P* < 0.05 with respect to BT. <sup>b</sup>*P* < 0.05 with respect to ET.

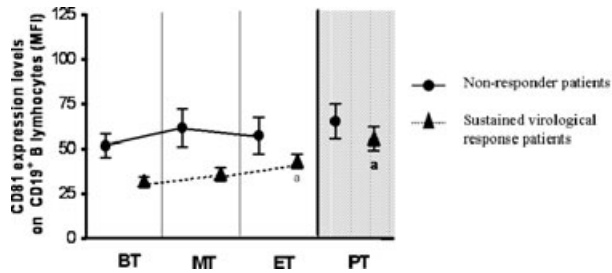


Fig. 3 CD81 expression levels on B lymphocytes in relation to virological outcome throughout antiviral treatment. BT, before treatment; MT, mid-treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks post-treatment; MFI, geometrical mean fluorescence intensity. <sup>a</sup>*P* < 0.05 with respect to BT.

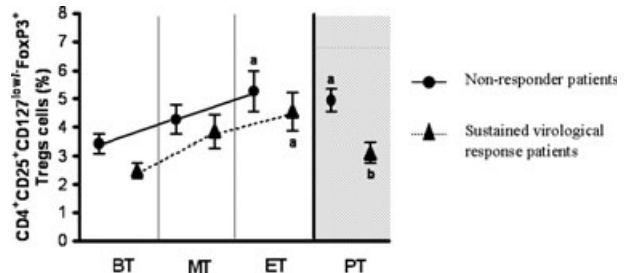


Fig. 4 Tregs percentage in relation to virological outcome throughout antiviral treatment. BT, before treatment; MT, mid of treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks post-treatment. <sup>a</sup>*P* < 0.05 with respect to BT. <sup>b</sup>*P* < 0.05 with respect to ET.

that remained increased at PT, although differences were statistically significant only in patients with SVR.

Subsequently, both groups were compared at BT, MT, ET and PT. The NR patients showed significantly higher CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes than the SVR patients BT (51.57 ± 25.94 MFI vs 32.13 ± 9.02 MFI; *P* = 0.017). No significant differences were observed between the groups at MT (61.63 ± 37.86 MFI vs 35.84 ± 14.35 MFI; *P* = ns), ET (57.29 ± 74.40 MFI vs

43.20 ± 15.90 MFI; *P* = ns) and PT (65.16 ± 32.79 MFI vs 55.61 ± 27.92 MFI; *P* = ns), although CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes were higher in NR than in SVR patients at each time point studied. Early NR patients (*n* = 3) also had higher CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes than SVR patients (*n* = 18) BT, although the differences were not statistically significant (data not shown).

*The percentage of regulatory T cells was higher in nonresponder patients*

The effect of the combined antiviral treatment on the percentage of Tregs in relation to virological outcome is presented in Fig. 4. An increase in the percentage of Tregs during antiviral treatment was observed in both NR and SVR patients. At PT, this decreased in comparison with ET in SVR patients ( $3.11 \pm 1.49\%$  PT vs  $4.56 \pm 2.68\%$  at ET;  $P < 0.01$ ), whereas no differences were observed in NR patients.

The comparison of NR vs SVR at BT, MT, ET and PT showed that NR had a significantly higher percentage of Tregs BT (NR:  $3.42 \pm 1.33\%$  vs SVR:  $2.49 \pm 1.1\%$ ;  $P = 0.025$ ) and at PT (NR:  $5.28 \pm 1.52\%$  vs SVR:  $3.10 \pm 1.41\%$ ;  $P = 0.002$ ) (Fig. 5). The percentage of Tregs was also higher in NR compared with SVR at MT (NR:  $4.28 \pm 1.95\%$  vs SVR:  $3.86 \pm 2.35\%$ ) and at ET (NR:  $5.27 \pm 2.50\%$  vs SVR:  $4.56 \pm 2.68\%$ ), although the differences were not statistically significant. When early NR ( $n = 3$ ) were compared with those with SVR ( $n = 18$ ) at baseline, early NR had a higher the percentage of Tregs than SVR, although the differences were not statistically significant (data not shown).

*Lymphocyte subpopulation patterns in nonresponders and in sustained virological response patients were not related to genotypes*

The virological outcome was also studied in relation to the different genotypes. Thirteen of the 27 patients with HCV genotype 1 or 4 achieved SVR, while 14 were NR. Five of the eight patients with HCV genotype 2 or 3 had SVR, while three were NR.

The effect of combined antiviral treatment on different lymphocyte subpopulations in relation to virological outcome and to different HCV genotypes (genotype 1 or 4 and genotype 2 or 3) was assessed. In the two genotype groups studied (genotype 1 or 4 and genotype 2 or 3), the NR and SVR patients had a similar longitudinal pattern of different lymphocyte subpopulations (data not shown).

The NR and SVR patients were compared at BT, MT, ET and PT in the two genotype groups (genotype 1 or 4 and genotype 2 or 3). No differences were observed in the percentages of  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD3\gamma\delta^+$  and  $CD19^+$  lymphocyte subpopulations (data not shown).

No significant differences were observed in CD81 expression levels on  $CD19^+$  B lymphocytes in relation to virological outcome in each genotype group studied, although CD81 expression levels on  $CD19^+$  B lymphocytes were higher in NR than in SVR patients at each time point studied (data not shown).

The comparison of NR vs SVR at BT, MT, ET and PT in the genotype 1 or 4 group showed that NR had a significantly higher percentage of Tregs BT (NR:  $3.16 \pm 1.25\%$  vs SVR:  $2.29 \pm 0.67\%$ ;  $P = 0.04$ ) and at PT (NR:  $5.01 \pm 1.47\%$  vs SVR:  $3.08 \pm 1.41\%$ ;  $P = 0.017$ ). The Tregs percentage was also higher in NR compared with SVR at MT and at ET, although the differences were not statistically significant (data not shown). No significant differences in the percentage of Tregs were observed when NR patients were compared with SVR patients in the genotype 2 or 3 group, although the percentage of Tregs was higher in NR than in SVR patients at BT, MT, ET and PT (data not shown).

*Relationship between baseline HCV-RNA and baseline lymphocyte subpopulations*

Baseline HCV-RNA correlated positively with baseline  $CD4^+$  lymphocyte percentage ( $r = 0.361$ ;  $P = 0.039$ ) and negatively with baseline  $CD8^+$  lymphocyte percentage ( $r = -0.449$ ;  $P = 0.009$ ). A trend towards a positive correlation between HCV-RNA level and CD81 expression levels on  $CD19^+$  B lymphocytes was observed at baseline ( $r = 0.332$ ,  $P = 0.063$ ). The percentage of Tregs at baseline did not correlate with either baseline HCV-RNA levels or baseline CD81 expression on  $CD19^+$  B lymphocytes. No other correlation was observed between the baseline HCV-RNA titre and the other parameters studied.

In the logistic regression model, including HCV-RNA, the percentage of Tregs and CD81 expression levels on  $CD19^+$  B

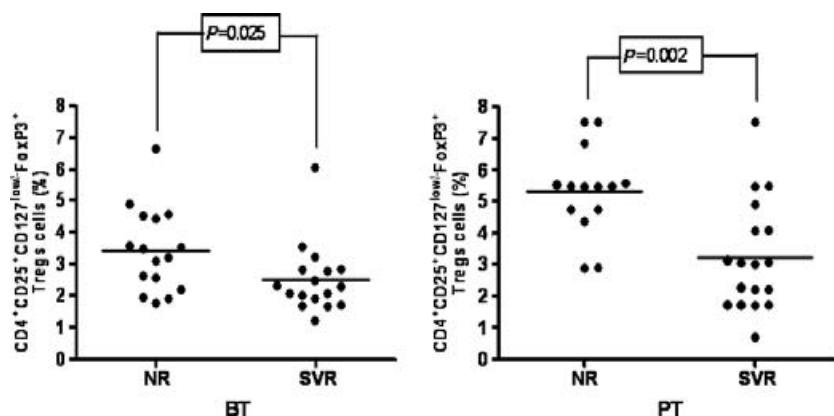


Fig. 5 Differences in the percentage of Tregs between nonresponder patients and patients with sustained virological response. NR, nonresponder patients; SVR, sustained virological response patients; BT, before treatment; PT, 24 weeks post-treatment.

lymphocytes at baseline, the main predictor factor of virological response to combined antiviral treatment was baseline HCV-RNA. However, the percentage of Tregs and CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes at baseline retained their prognostic significance after the inclusion in the model of baseline HCV-RNA ( $P = 0.020$  for Tregs;  $P = 0.034$  for CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes). Covariability among variables was not significant for baseline HCV-RNA vs the percentage of Tregs and CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes at baseline.

## DISCUSSION

Resolution of HCV infection requires a complex and coordinated interplay between innate and adaptive immune responses which in many cases are not effective and HCV infection persists [28]. Combined treatment with pegIFN- $\alpha$ 2a and ribavirin is effective in chronic HCV infection owing to its immunomodulatory and antiviral action, although the definitive mechanisms are not fully established. In this study, a prospective follow-up of different lymphocyte subpopulations in patients with chronic HCV infection who started combined antiviral treatment was analysed. In addition, we attempted to identify pretreatment immunological factors associated with response to therapy to improve our understanding of successful immune responses and future therapy in HCV infection.

Previous reports identified imbalances between T-cell subsets, B and NKT cells in peripheral blood of patients with chronic HCV infection patients compared with healthy subjects [29–32], thereby demonstrating the importance of these lymphocyte subpopulations in HCV infection. In this study, the dynamics of different lymphocyte subpopulations throughout treatment and 24 weeks thereafter were analysed. A decrease in CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cells was observed during treatment with an increase at 24 weeks post-treatment. However, the CD4<sup>+</sup> T-cell percentage had a different dynamic pattern, with an increase during treatment and a decrease during follow-up. These findings on dynamics of lymphocyte subpopulations are similar to those reported by other authors [30], although they have not been confirmed in other studies [16,29,33]. In relation to virological outcome, no differences were found in T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) and NKT (CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>) lymphocyte subpopulations at baseline, during treatment or during follow-up between NR and SVR patients, in agreement with findings of other authors [30]. Early NR and SVR patients, excluding relapse subjects, were also compared at baseline, to exclude a possible influence of relapse patients. No differences were observed in the percentages of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations. Regarding viral load, a negative relationship was observed between viral load and CD8<sup>+</sup> T cells at baseline. However, although NR patients had a higher baseline viral load than

SVR patients, no differences in CD8<sup>+</sup> T cells were observed between groups before the start of treatment.

Like other leucocyte-expressed tetraspanins, CD81 plays a role in modulating immune cell function [34,35]. Recently, CD81 has been reported to interact with HCV glycoprotein E2, and it has been hypothesized that this interaction could modify immune responses in HCV-infected individuals [13]. In this work, we studied the effects of pegIFN $\alpha$ 2a and ribavirin on CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B cells in patients with chronic HCV infection and their relationship with virological outcome. Combined antiviral treatment increased CD81 expression on CD19<sup>+</sup> B cells, and this increase was maintained 24 weeks after the treatment was completed. On the other hand, with respect to virological outcome, no different dynamics of CD81 expression levels on B cells were observed throughout the treatment period. Kronenberger *et al.* [16] reported a transient increase in CD81 levels with maximum expression at week 12, with comparable dynamics throughout treatment between SVR and NR patients, which supports our results. However, other authors described a decrease in expression levels of CD81 on B cells in responder patients and invariable expression levels in NR patients during antiviral treatment [11,15]. The reasons for these discrepancies might be the use of fresh or frozen PBMC, a different phenotype of B-cell definition and the different number and clinical characteristics of the patients studied.

One of the major findings of this study was that at baseline, NR patients had significantly higher expression levels of CD81 on CD19<sup>+</sup> B cells than SVR patients. Early NR, excluding relapsed patients, also had higher expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes than SVR patients. However, these differences were not statistically significant, probably because of the low number of early NR patients. These results suggest that CD81 expression on B cells could play a role in antiviral treatment response, although other studies did not report similar results at baseline [11,15,16]. In this study, the trend towards a positive correlation between HCV-RNA level and CD81 expression levels on CD19<sup>+</sup> B cells observed at baseline was consistent with other series [12] and could explain the higher CD81 expression levels in NR patients at baseline.

Another lymphocyte subpopulation studied in patients with HCV infection is the CD4<sup>+</sup> Treg cells. The percentage of Tregs in peripheral blood in patients with chronic HCV infection is either similar [28,36] or increased [37–39] compared with recovered HCV patients or with healthy individuals. However, comparison of results among the different studies is complicated owing to the different phenotypical Tregs subpopulation used. Some authors analysed the total CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell population [37,38], while only a few groups have examined the most specific marker of Tregs, FoxP3 [28,36,39], with conflicting results. However, the recent finding that FoxP3 expression is transiently

induced upon activation of human CD4<sup>+</sup> T cells [40] lead to the search for new markers that would more specifically define the Tregs subpopulation and differentiate it from activated CD4<sup>+</sup> lymphocytes that also express high levels of CD25. In this context, the finding that human Tregs express low levels or are negative for CD127, the interleukin-7 receptor, in contrast to other CD4<sup>+</sup>-nonregulatory T cells, permitted more specific definition of the Tregs phenotype [41].

The current study was conducted to assess the effect of combined antiviral treatment on the percentage of Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs cells) in patients with HCV infection and the relationship of Tregs with therapeutic outcome. The percentage of Tregs increased both in NR and SVR patients during combined pegIFN $\alpha$ 2a and ribavirin treatment. This fact might be explained by the immunomodulatory effects of antiviral therapy. Interestingly, the percentage of Tregs was higher in NR than in SVR patients before and at 24 weeks post-treatment and in early NR than in SVR patients at baseline, thereby suggesting a possible role of Tregs in virological response to combined antiviral treatment. To our knowledge, only one longitudinal study has examined the effect of combined antiviral treatment in Tregs frequency, finding no differences on the percentage of Tregs before, during or after treatment or between NR and SVR patients [28]. Tregs were phenotypically characterized by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells expressing FoxP3, whereas in the current study, as specified above, Tregs were defined by the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. This fact could explain the different results obtained between the two longitudinal studies. We analysed the correlation between baseline Tregs levels and baseline viral load. Conflicting results have been reported in the literature, with a positive correlation in some studies [37] and no correlation in others [28,36]. In this study, no correlation was found at baseline, probably because of the low number of patients studied. However, NR patients had a higher viral load and a higher the percentage of Tregs than the SVR group at baseline.

In relation to Tregs, it could be argued that functional assays were not performed to test differences in Tregs' function between NR and SVR patients. Studies of Tregs were undertaken with cryopreserved cells, and we did not include proliferation and functional assays owing to the inherent limitations of this technique, particularly with frozen/thawed PBMC. Furthermore, *ex vivo* functional studies on Tregs are not standardized, and correlation with their *in vivo* function has not been fully established [42]. A limitation of the current study was that the patients analysed had different HCV genotypes, and the duration of combined antiviral treatment differed, being 24 or 48 weeks depending on HCV genotype. However, no differences in HCV genotype proportions were shown between the two groups studied (NR and SVR patients), thereby allowing for inter-group comparison.

Moreover, patterns of lymphocyte subpopulations during the treatment and differences in relation to virological outcome have been analysed in two different HCV genotype groups, depending on their duration of combined antiviral treatment, finding similar results between the two groups.

In summary, we describe here different dynamics of lymphocyte subpopulations during combined antiviral treatment in chronic patients with HCV infection and in relation to virological outcome. Our findings concur with the concept that immunomodulation fluctuates during antiviral treatment and is not a constant phenomenon [31]. Moreover, at baseline, NR patients had a higher percentage of Tregs and higher levels of CD81 expression on B cells than SVR patients, which would suggest that these markers might be useful as immunological prognostic factors for pegIFN- $\alpha$ 2a and ribavirin treatment response in chronic HCV infection.

#### ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

The authors thank Y. Alba for technical assistance, M. L. Granada for statistical assistance, M. Cuadrado, I. Ordóñez and C. Pérez for interested nursing care and Christine O'Hara for valuable help with the English version of the manuscript. This work was supported by the Instituto de Investigación Carlos III, grant FIS PI05/0150 to Dr A. Sanmartí.

#### REFERENCES

- 1 Bellentani W, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lessons from the Dionysos study. *J Hepatol* 2001; 75: 531–537.
- 2 Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S21–S29.
- 3 Strader DB, Wright T, Thomaw DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147–1171.
- 4 Spengler U, Nattermann J. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clin Sci* 2007; 112: 141–155.
- 5 Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 89–105.
- 6 Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; 436: 946–952.
- 7 Ducoulombier D, Roque-Alfonso AM, Di Liberto G *et al.* Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 2004; 39: 817–825.
- 8 Roque-Alfonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G *et al.* Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005; 79: 6349–6357.
- 9 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938–941.
- 10 Wack A, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E3 to CD81



- provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 166–175.
- 11 Zuckerman E. Expansion of CD5 B-cell overexpressing CD81 in HCV infection: towards better understanding the link between HCV infection, B-cell activation and lymphoproliferation. *J Hepatol* 2003; 38: 674–677.
  - 12 Zuckerman E, Slobodin G, Kessel A *et al.* Peripheral B-cell CD5 expansion and CD81 overexpression and their association with disease severity and autoimmune markers in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 353–358.
  - 13 Martin F, Roth DM, Jans DA *et al.* Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? *J Virol* 2005; 79(17): 10839–10851.
  - 14 Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 127–149.
  - 15 Kronenberger B, Rüster B, Elez R *et al.* Interferon alfa down-regulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33(6): 1518–1526.
  - 16 Kronenberger B, Herrmann E, Hofmann P *et al.* Dynamics of CD81 expression on lymphocyte subsets during interferon- $\alpha$ -based antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Leukoc Biol* 2006; 80(298): 298–308.
  - 17 Chang LL, Cheng PN, Chel JS, Young KC. CD81 down-regulation on B cells is associated with the response to interferon-alpha-based treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res* 2007; 75: 43–51.
  - 18 Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195–201.
  - 19 Rouse BT, Sarabgi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* 2006; 212: 270–286.
  - 20 Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(4): 758–762.
  - 21 Liu V, Putnam AM, Xu-Yu Z *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells. *J Exp Med* 2006; 7: 1701–1711.
  - 22 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057–1061.
  - 23 Alatrakchi N, Kozziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. *J Viral Hepat* 2009; 16(4): 223–229.
  - 24 Chang KM. Regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 2007; 37: S327–S330.
  - 25 Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 804–813.
  - 26 Dolganiuc A, Szabo G. T cells with regulatory activity in hepatitis C virus infection: what we know and what we don't. *J Leukoc Biol* 2008; 84(3): 614–622.
  - 27 Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518–526.
  - 28 Burton Jr JR, Klarquist J, Im K *et al.* Prospective analysis of effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in chronic HCV patients undergoing combination antiviral therapy. *J Hepatol* 2008; 49(3): 329–338.
  - 29 Marinho RT, Pinto RM, Santos ML, de Moura MC. Lymphocyte T helper-specific reactivity in sustained responders to interferon and ribavirin with negativization (seroconversion) of anti-hepatitis C virus. *Liver Int* 2004; 24: 413–418.
  - 30 Trapero-Marugán M, García-Buey L, Muñoz C *et al.* Sustained virological response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C genotype 1 patients associated a persistent Th1 immune response. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24(1): 117–128.
  - 31 Barnes E, Harcourt G, Brown D *et al.* The dynamics of T-lymphocyte responses during combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002; 36(3): 743–754.
  - 32 Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S *et al.* CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2004; 137(2): 408–416.
  - 33 Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J. Immunological response in chronic hepatitis C virus infection during interferon alpha therapy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51(58): 1088–1092.
  - 34 Cherukuri A, Carter RH, Brooks S *et al.* B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31973–31982.
  - 35 Maecker HT. Human CD81 directly enhances Th1 and Th2 cell activation, but preferentially induces proliferation of Th2 cells upon long-term stimulation. *BMC Immunol* 2003; 4: 1.
  - 36 Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J *et al.* Functional suppression by FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2008; 197(1): 46–57.
  - 37 Cabrera R, Tt Z, Xu Y *et al.* An immunomodulatory role for CD4 (+) CD25 (+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40(5): 1062–1071.
  - 38 Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C *et al.* T cells with a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7860–7867.
  - 39 Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y *et al.* Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008; 82(10): 5043–5053.
  - 40 Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Hugizinga TW, Toes RE. Transient expression of FoxP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 129–138.
  - 41 Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J *et al.* Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203(7): 1693–1700.
  - 42 Shevach EM. Mechanisms of FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30(5): 636–645.

## 7.2. SEGON ESTUDI

*A prospective study of lymphocyte subpopulations and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection developing interferon-induced thyroiditis.*

Estudi prospectiu de les subpoblacions limfocitàries i les cèl·lules T reguladores en pacients amb infecció crònica pel virus de l'hepatitis C que desenvolupen tiroïditis induïda per interferó.

*B. Soldevila, N. Alonso, M.J. Martínez-Arconada, M.L. Granada, D. Baía, V. Vallejos, M. Fraile, R.M. Morillas, R. Planas, R. Pujol-Borrell, E.M. Martínez-Cáceres, A.M. Sanmartí.*

*Clinical of Endocrinology 2011; 75 (4): 535-543.*

(factor d'impacte 2011: 3,168)

## ORIGINAL ARTICLE

# A prospective study of lymphocyte subpopulations and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection developing interferon-induced thyroiditis

Berta Soldevila\*†, Núria Alonso\*†, Maria J. Martínez-Arconada‡, Maria L. Granada§, Diogo Baía‡, Virginia Vallejos¶, Manuel Fraile¶, Rosa M. Morillas\*\*\*, Ramon Planas\*\*\*, Ricardo Pujol-Borrell\*‡, Eva M. Martínez-Cáceres\*‡<sup>1</sup> and Anna M. Sanmartí\*†<sup>1</sup>

\*Department of Medicine, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona; †Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol; ‡Department of Immunology, Laboratory of Immunobiology for Research and Application to Diagnosis (LIRAD)-Blood and Tissue Bank (BST), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol; §Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol; ¶Department of Nuclear Medicine, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol; \*\*\*Department of Gastroenterology and Hepatology, CIBERHED, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

## Summary

**Objective** One of the side effects of interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) therapy is interferon-induced thyroiditis (IIT). The role of lymphocyte subpopulations in IIT remains to be defined. The aim of this study was to assess different peripheral blood lymphocyte subpopulations, mainly CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127low/-FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs), in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection who developed IIT.

**Design, patients and methods** From 120 patients with chronic HCV who started antiviral treatment, those who developed IIT (IIT patients) were selected and compared with patients who did not develop IIT (Co-HCV). Peripheral blood mononuclear cells were obtained before treatment (BT), mid-treatment (MT), end of treatment (ET), 24 weeks post-treatment (PT) and at appearance of IIT (TT).

**Results** Eleven patients developed IIT: three Hashimoto's thyroiditis, one Graves' disease, one positive antithyroidal antibodies, one nonautoimmune hypothyroidism and five destructive thyroiditis. During antiviral treatment, an increase in CD8<sup>+</sup> and in Tregs was observed in both groups. A decrease in CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> and NKT lymphocyte subpopulations was also observed (all  $P < 0.05$ ). However, no changes were observed in the percentage of CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup> and iNKT lymphocytes, Th1/Th2 balance and Bcl2 expression on B cells when BT was compared with ET. At the appearance of IIT (TT), IIT patients had a higher Th1 response (CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) ( $P < 0.01$ ) and a higher Tregs percentage ( $P < 0.05$ ) than Co-HCV.

**Conclusions** Our results point to the immunomodulatory effects of IFN- $\alpha$  on different lymphocyte subpopulations and a possible role of Th1 response and Tregs in patients with HCV who developed IIT.

(Received 18 January 2011; returned for revision 27 April 2011; finally revised 11 May 2011; accepted 16 May 2011)

## Introduction

Autoimmune thyroid disease (AITD) is the most common organ-specific autoimmune disorder, affecting 1–2% of the population.<sup>1</sup> The aetiology of AITD remains unclear, although patient susceptibility to it appears to be multifactorial, including genetic<sup>2</sup> and environmental factors, and medications such as interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ).<sup>3,4</sup> Interferon- $\alpha$  is a cytokine with immunomodulatory activity used as a therapeutic agent in current therapy for chronic hepatitis C virus (HCV) infection consisting of pegylated interferon-alpha (pegIFN- $\alpha$ ) and ribavirin (RBV).<sup>5</sup> One of the commonest side effects of IFN- $\alpha$  therapy is thyroid disease. Prior to the recent description of interferon-induced thyroiditis (IIT),<sup>6</sup> several studies had reported a high incidence of thyroid disease, occurring in 1.9–40% of patients treated with IFN- $\alpha$ .<sup>7,8</sup>

Interferon- $\alpha$  exerts different immune effects, including switch of the immune response to a T-helper (Th) 1 pattern<sup>9</sup> and enhanced activity of T and B lymphocytes, macrophages and natural killer (NK) cells.<sup>10,11</sup> Interferon- $\alpha$  also upregulates the expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), an apoptosis regulator protein.<sup>12</sup> It has been proposed that IIT could be induced by both immune stimulatory effects and direct thyroid toxic effects of IFN- $\alpha$  combined with a genetic predisposition;<sup>4</sup> however, few studies have analysed immune responses in patients with chronic HCV infection and IIT during antiviral treatment.<sup>13</sup> RBV is a synthetic guanosine analogue

Correspondence: Bert Soldevila, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol – Endocrinology and Nutrition, Carretera del Canyet s/n Badalona, Barcelona 08916, Spain. Tel.: +34934978860; Fax: +34934978843; E-mail: bsoldevila.germanstrias@gencat.cat

<sup>1</sup>Shared senior co-authorship.

that exerts immunomodulatory effects by inducing Th1 cytokines in the immune response, suggesting that this drug, as well as IFN- $\alpha$ , could trigger autoimmune phenomena in predisposed patients.<sup>14</sup>

In recent years, regulatory T cells (Tregs) have been shown to play an important role in the maintenance of peripheral self-tolerance.<sup>15</sup> CD4<sup>+</sup>-Tregs can be identified by CD25 (interleukin-2 receptor alpha chain) expression<sup>16</sup> and low or absent CD127 (interleukin-7 receptor alpha chain) expression.<sup>17</sup> The key marker of Tregs is currently the expression of the forkhead/winged helix family transcription factor gene (FoxP3).<sup>18</sup>

Several authors have suggested that Tregs may play a role in AITD<sup>19–22</sup>; however, their role in relation to IIT development remains to be determined. Our group recently described an increase in Tregs percentage during pegIFN- $\alpha$  and RBV treatment in patients with chronic HCV.<sup>23</sup> In this regard, we hypothesized that Tregs could play an important role in IIT. Therefore, the aim of this study was to assess different lymphocyte subpopulations, mainly Tregs defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>, in patients with chronic HCV infection who developed IIT during treatment and evaluate their possible involvement in the appearance of this disease.

## Subjects and methods

### Subjects

We studied 120 treatment-naïve patients with chronic HCV infection receiving antiviral treatment, consisting of pegIFN- $\alpha$ 2a and RBV, and selected those who developed IIT. The study group (IIT patients) included 11 patients with chronic HCV infection who developed thyroid disease. Eleven age- and sex-matched subjects with chronic HCV infection who did not develop thyroid disease served as control group (Co-HCV). No patient of previous studies was evaluated in this study. All patients were without thyroid disease, defined as normal thyroid function and negative thyroid antibodies, prior to the antiviral treatment. Familiar predisposition to thyroid disease was not investigated.

Diagnosis of chronic HCV infection was based on the presence of HCV-RNA for more than 6 months and positive anti-HCV antibodies measured by a third-generation enzyme immunoassay (Vitros ECI<sup>®</sup>; Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA). All patients were negative for hepatitis B surface antigen and antibodies to the human immunodeficiency viruses types 1 and 2. Those with liver disease of different aetiology, consumption of more than 20 g/day alcohol, viruses and past or present intravenous drug abuse were excluded. Patients were recruited from the outpatient clinic of the Department of Gastroenterology and Liver Unit of the University Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). The study was approved by the local Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all patients.

### Antiviral treatment, HCV quantification, genotyping and definition of response to therapy

Patients with HCV genotypes 1 or 4 received 180  $\mu$ g once weekly of pegIFN- $\alpha$ 2a (Pegasys<sup>®</sup>; Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) combined with 1000–1200 mg daily of RBV (Copegus<sup>®</sup>; Hoffman-

La Roche) for 48 weeks. Patients with HCV genotypes 2 or 3 received 180  $\mu$ g once weekly of pegIFN- $\alpha$ 2a combined with 800 mg daily of RBV for 24 weeks.

Serum HCV-RNA concentration was measured by real-time PCR (Abbott RealTime HCV<sup>®</sup>, Champaign, IL, USA; limits of HCV-RNA titres were 30–10<sup>8</sup> IU/ml). HCV genotyping was assayed using a commercial assay (Abbott RealTime HCV Genotype II<sup>®</sup>). Sustained virological response (SVR) was defined as undetectable HCV-RNA in serum at 24 weeks post-treatment (PT).

### Stage of liver disease

Liver biopsy was performed in 57% of patients with genotype 1 or 4. However, the APRI index<sup>24</sup> was calculated in all the patients of the study to know the degree of liver fibrosis before receiving combined antiviral treatment.

### Detection of interferon-induced thyroiditis

Thyroid function [serum thyrotrophin (TSH), free thyroxine (FT4) and total 3, 5, 3'-triiodothyronine (TT3)] and autoantibodies [serum thyroglobulin (TgAb), thyroperoxidase (TPOAb) and TSH receptor antibodies (TSHRab)] were evaluated at baseline and every 4–6 weeks until the end of treatment (ET) and once 24 weeks PT. Serum TSH, FT4 and TT3 were measured by an automated chemoluminescence immunoassay with a Modular Analytics E-170 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Serum TgAb and TPOAb were measured by DPC Immulite<sup>®</sup> (Siemens, Deerfield, IL, USA); and TSHRab by Iasontrab<sup>®</sup> e. 3rd generation (Iason, Graz-Seiersberg, Austria). Normal ranges are shown in Table 1. Nonorgan-specific autoimmunity was not evaluated.

Patients developing IIT (11 cases) were selected on the basis of appearance of thyroid autoantibodies and/or thyroid dysfunction. A thyroid radioactive iodine uptake scan (RAIU) was performed in patients with suppressed TSH. IIT included Hashimoto's thyroiditis (HT) defined as hypothyroidism or the presence of TgAb and/or TPOAb; Graves' disease (GD) defined as hyperthyroidism with positive TSHRab and diffusely increased thyroid RAIU; and destructive thyroiditis defined as thyrotoxicosis with negative TSHRab and low thyroid RAIU.

### Flow cytometry analysis

Immunological studies were performed at baseline before treatment (BT), mid-treatment (MT), ET, 24 weeks PT and at appearance of IIT (TT), and results were compared between the groups at each point. Immunological evaluations at TT were made on frozen samples acquired at the appearance of IIT in IIT patients and compared with frozen samples acquired at MT (3–6 months of antiviral treatment) in Co-HCV. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), cryopreserved in 90% FCS and 10% DMSO and kept in liquid nitrogen until use. PBMC were stained after thawing following standard protocols. Cells were stained with surface molecules with several combinations of the following monoclonal antibodies: CD3-phycoerythrin

Table 1. Baseline patient characteristics

	IIT	Co-HCV	
<i>n</i>	11	11	NS
Sex (M/F)	5/6	5/6	NS
Age (years, mean ± SD)	42.73 ± 12.5	42.73 ± 12.56	NS
ALT (U/l, mean ± SD, nr: 5–33)	86.35 ± 62.81	62.36 ± 25.76	NS
HCV genotypes (1 or 4/2 or 3)	9/2	6/5	NS
HCV-RNA [IU/ml, median (p25–p75)]	700 000 (389 999–1 710 000)	700 000 (436 000–3 751 670)	NS
APRI index (mean ± SD)	0.81 ± 0.37	0.64 ± 0.34	NS
Response to antiviral treatment (NR/SVR)	3/8	4/7	NS
TSH (mu.int/l, mean ± SD, nr: 0.27–4.2)	2.14 ± 0.95	1.8 ± 1.05	NS
FT4 (ng/dl, mean ± SD, nr: 0.82–1.77)	1.22 ± 0.20	1.15 ± 0.25	NS
TT3 (ng/ml, mean ± SD, nr: 0.8–2)	1.55 ± 0.30	1.68 ± 0.31	NS
Positive baseline TgAb (%; nr: 0–40)	0	0	NS
Positive baseline TPOAb (%; nr: 0–35)	0	0	NS
Positive baseline TSHRab (%; nr: 0–0.7)	0	0	NS

IIT, interferon-induced thyroiditis patients; Co-HCV, control subjects with chronic hepatitis C virus infection; NS, not significant; HCV, hepatitis C virus infection; nr: normal range; NR, nonresponders patients; SVR, sustained virological response patients; TSH, thyrotrophin; FT4, free thyroxine; TT3, total triiodothyronine; TgAb, thyroglobulin antibodies; TPOAb, thyroperoxidase antibodies; TSHRab, thyrotrophin receptor antibodies.

cychrome (PECy5), CD4-allophycocyanin (APC), CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC), invariant NKT (iNKT)-phycoerythrin (PE), CD19-PECy5, CD4-FITC, CCR7-PE, CCR5-PECy5, CRTH2-APC, CD3-FITC, CD16/56-PE and CD3<sup>+</sup>-gamma/delta ( $\gamma\delta$ )-APC [all from Becton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA, USA] for 30 min at 4 °C and protected from light. After incubation, cells were washed and resuspended in flow cytometry staining buffer.

Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) staining was performed as follows: cells were stained with CD4-APC, CD127-PE and CD25-PECy5 for 30 min at 4 °C. After incubation, cells were washed and fixed/permeabilized (fixation/permeabilization buffer; eBiosciences Inc., San Diego, CA, USA) for 45 min in the dark and washed twice with permeabilization buffer (eBiosciences Inc.). After centrifugation, a blocking step was performed with 2% normal rat serum in a permeabilization buffer, at 4 °C for 15 min after which, 20 µl of FITC-conjugated anti-human FoxP3 antibody (PCH101; eBiosciences) or isotype control was added and incubated for 45 min at 4 °C in the dark. Cells were then washed twice in permeabilization buffer and resuspended in flow cytometry staining buffer.

Cytoplasmic staining of Bcl-2 on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes was performed in a similar manner to FoxP3<sup>+</sup> staining, i.e. after surface staining of CD19<sup>+</sup> cells, cells were fixed/permeabilized, stained with Bcl-2 or isotype control and incubated for 45 min at 4 °C in the dark. Cells were then washed twice in permeabilization buffer and resuspended in flow cytometry staining buffer.

Samples were acquired in a four-colour multiparameter flow cytometer (FACScalibur<sup>®</sup>; BD Biosciences). The percentage of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>), iNKT, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CRTH2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> and Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) (Fig. 1) lymphocyte subpopulations as well as median fluorescence intensity (MFI) of

Bcl-2 on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes were studied. Data were analysed with CellQuest software<sup>®</sup> (BD Biosciences). All samples of the longitudinal study of each patient were processed in the same experiment by the same blinded researcher to avoid interassay variability.

### Statistical analysis

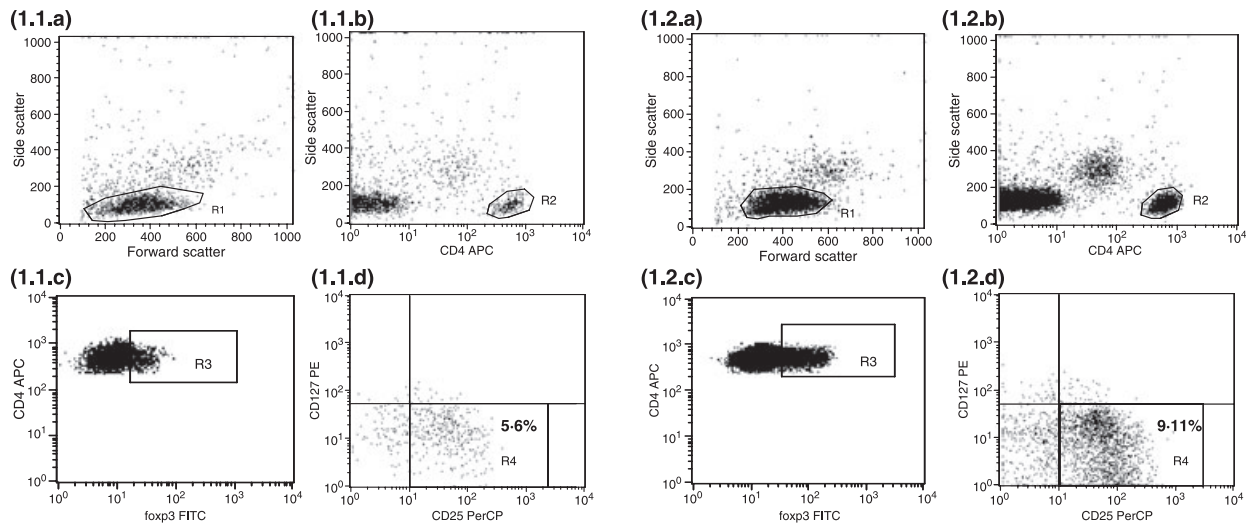
Quantitative results were expressed as mean ± SD or medians (interquartile range). Because of the small sample size, only non-parametric tests were used. Differences between groups were tested by the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Pairwise comparisons were based on the signed rank test. Qualitative results were expressed as proportions, and differences between IIT and Co-HCV groups of patients were tested by the chi-square test. Relationships between independent variables were tested by a logistic regression test. Two-tailed *P* values of 0.05 or less were considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (spss/Windows version 12.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and the software program GraphPad Prism (4.0b version; GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## Results

### Patient characteristics

Baseline clinical characteristics of the two groups studied are shown in Table 1. Eleven patients developed IIT (9.16%). Individual hormonal, immunological and thyroid RAIU data of IIT patients at the appearance of thyroid disease are shown in Table 2. Thyroid disease appeared during the first 6 months of antiviral treatment in most IIT patients. Five of the 11 IIT patients presented HT: three





**Fig. 1** Flow cytometry analysis of peripheral blood regulatory T cells ( $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}FoxP3^+$ ) (Tregs) from a representative patient who developed destructive thyroiditis. (1.1) Baseline flow cytometry analysis of peripheral blood Tregs from a representative patient who developed destructive thyroiditis. Cells were stained with anti-CD4-allophycocyanin, FoxP3-fluorescein isothiocyanate, CD127-PE and CD25-PE Cy5 as specified in Subjects and methods. For the flow cytometry analysis, the lymphocyte subpopulation from peripheral blood cells on the basis of forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) was selected (R1, 1.1.a).  $CD4^+$  lymphocytes were gated from R1 by positive staining of  $CD4^+$  cells and SSC gated (R2, 1.1.b). From  $CD4^+$  cells (R1+R2), those that were  $FoxP3^+$  were selected (R3, 1.1.c). From  $CD4^+FoxP3^+$  cells (R1 + R2 + R3), those that were  $CD127^{low/-}$  and  $CD25^+$  were selected (Tregs, R4, 1.1.d). (1.2) Flow cytometry analysis of peripheral blood Tregs from the same representative patient at the appearance of destructive thyroiditis. Tregs percentage is specified in (1.1.d) and (1.2.d), respectively.

**Table 2.** Characteristics of patients at the appearance of interferon-induced thyroiditis

	Sex (M/F)	Age (years)	Time (month)	TSH (mu.int/l)	FT4 (ng/dl)	TT3 (ng/ml)	TgAb (IU/ml)	TPOAb (IU/ml)	TSHRab (U/l)	Thyroid RAIU
1	F	63	6	49.90	0.30	0.40	1634.19	590.34	0	—
2	F	48	3	25.12	0.36	0.97	198	1000	0	—
3	M	36	6	75.39	0.32	0.50	3000	102	0	—
4	F	41	12	0.01	1.37	1.82	376	1215	40.14	↑
5	F	60	7	3.66	1.31	1.68	54.30	104.43	0	—
6	F	42	5	30.00	0.73	0.96	0	0	0	—
7	M	32	3	0.06	1.42	1.56	0	0	0	↓
8	F	56	6	0.12	1.25	1.88	0	376	0	↓
9	M	34	7	0.01	2.28	1.82	0	0	0	↓
10	M	33	5	0.01	2.91	2.50	67.20	40.40	0	↓
11	M	25	3	0.03	2.96	2.53	3000	16.50	0	↓

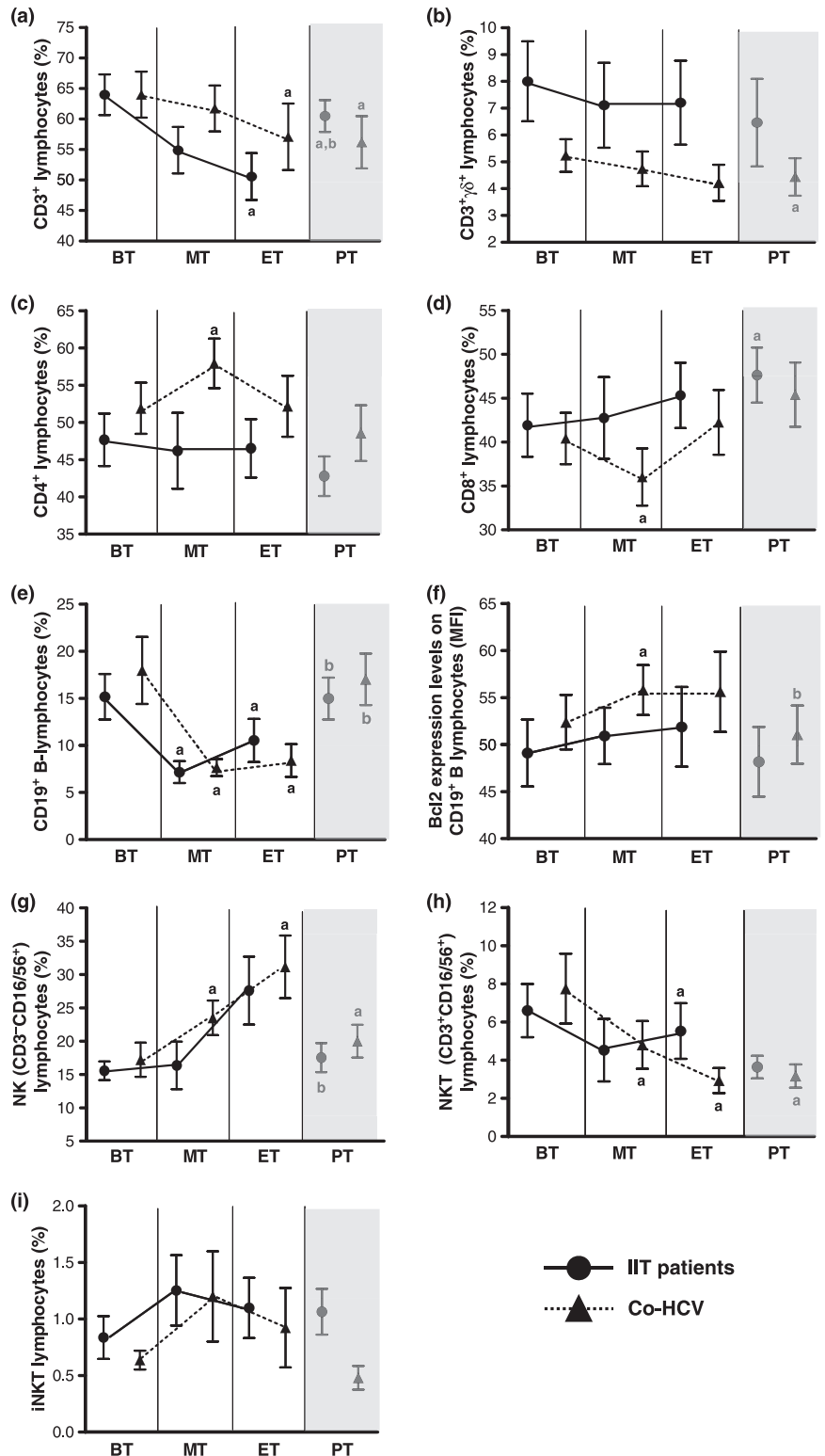
M, male; F, female; TSH, thyrotrophin; FT4, free thyroxine; TT3, total triiodothyronine; TgAb, thyroglobulin antibody titres; TPOAb, thyroperoxidase antibody titres; TSHRab, thyrotrophin receptor antibody titres; Thyroid RAIU, thyroid radioactive iodine uptake scan; IIT, interferon-induced thyroiditis.

with clinical hypothyroidism and positive TgAb and TPOAb, one with clinical hypothyroidism with negative TgAb and TPOAb and one with positive TgAb and TPOAb with a euthyroidal function; one presented GD with subclinical hyperthyroidism, positive TSH-Rab and an increased thyroid RAIU, and five presented destructive thyroiditis with thyrotoxicosis, negative TSHRab and a low thyroid RAIU.

The four patients with hypothyroidism required therapy with levothyroxine that continued at PT. All patients with destructive thyroiditis developed hypothyroidism during antiviral treatment and required therapy with levothyroxine that continued at PT. The patient with Graves' disease required antithyroid drugs that contin-

ued at PT, and the patient with positive thyroid antibodies persisted with a normal thyroid function.

To study whether the duration of treatment was a determining factor in the IIT development, a binary logistic regression analysis with IIT appearance as a dependent variable and the duration of antiviral treatment as an independent variable was performed. The duration of treatment was not related to the IIT appearance ( $P = 0.181$ ). In relation to the correlation between the appearance of IIT and the response to antiviral treatment, a binary logistic regression analysis with SVR as a dependent variable and IIT appearance as an independent variable was performed. The response to antiviral treatment was not related to the development of IIT ( $P = 0.666$ ).



**Fig. 2** Lymphocyte subpopulations throughout antiviral treatment in relation to IIT development. (a) CD3<sup>+</sup> lymphocytes. (b) CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>) lymphocytes. (c) CD4<sup>+</sup> lymphocytes. (d) CD8<sup>+</sup> lymphocytes. (e) CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. (f) B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) expression levels in CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. (g) Natural killer (NK) lymphocytes (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>). (h) Natural killer T (NKT) lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>). (i) Invariant NKT (iNKT) lymphocytes. BT, before treatment; MT, mid-treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks post-treatment; MFI, mean fluorescence intensity; IIT patients, interferon-induced thyroiditis patients; Co-HCV, control subjects with chronic hepatitis C virus infection; <sup>a</sup>P < 0.05 compared with BT; <sup>b</sup>P < 0.05 compared with ET.

**Effect of combined antiviral treatment on lymphocyte subpopulations in the two groups studied**

The dynamics of lymphocyte subpopulations studied during the combined antiviral treatment in the two groups are depicted in Fig. 2. A statistically significant decrease in CD19<sup>+</sup>, NKT and CD3<sup>+</sup>

lymphocyte subpopulations was observed in IIT and Co-HCV groups during treatment (BT vs ET). The dynamics of these lymphocyte subpopulations differed at PT compared with ET. While CD19<sup>+</sup> lymphocytes significantly increased at PT compared with ET, the NKT lymphocyte subpopulation remained low at PT compared with ET in both IIT and Co-HCV groups. In IIT patients,

CD3<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation significantly increased at PT compared with ET, while in Co-HCV remained unchanged. Moreover, the dynamics of the CD8<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation differed, with a significant increase during the treatment (BT vs ET) and with no changes at PT compared with ET in either group. The NK lymphocyte subpopulation percentage did not change during the treatment (BT vs ET) but significantly decreased at PT compared with ET in both groups. On the other hand, no changes were observed in CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> and iNKT lymphocyte subpopulations or in Bcl2 expression on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes during the treatment (BT vs ET) and at PT compared with ET.

#### IIT did not induce changes in the different lymphocyte subpopulations studied

Differences in relation to CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3γδ<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, NK, NKT, iNKT lymphocyte subpopulations and Bcl-2 expression levels on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes between IIT and Co-HCV groups during treatment and at PT were assessed. When the two groups were compared at BT, MT, ET, PT and TT, no differences were observed in the percentages of these lymphocyte subpopulations (data not shown).

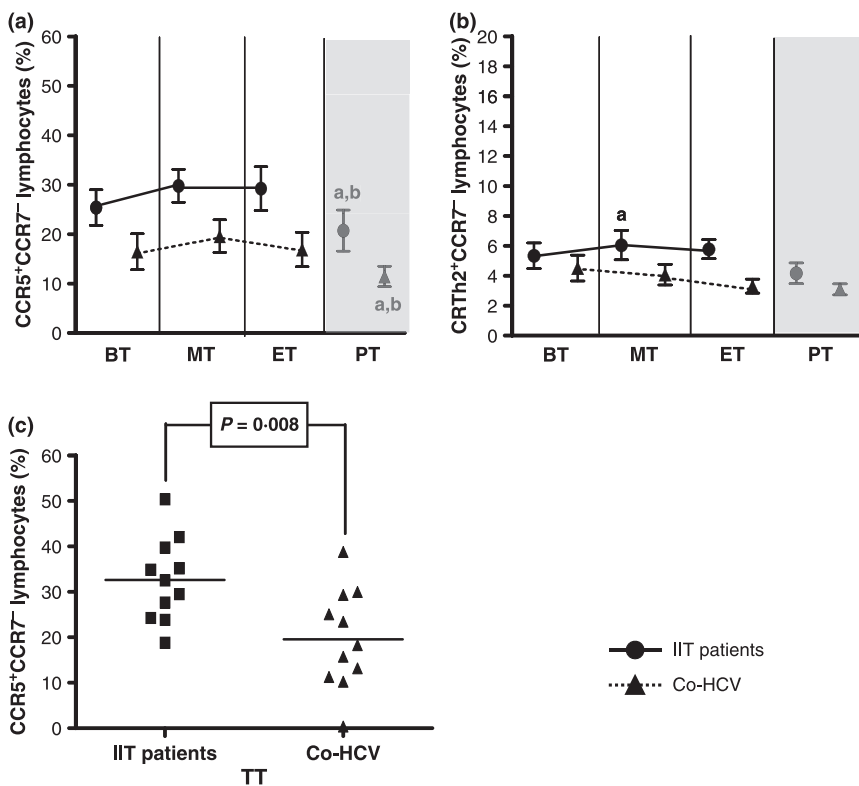
#### An increase in Th1 response (CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) was observed in IIT patients

The effect of combined antiviral treatment on Th1/Th2 balance, measured by CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (Th1) and CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (Th2) cell percentages, was assessed in both the groups (Fig. 3). A similar pattern was observed in the IIT and Co-HCV groups. Thus, no

changes in CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> percentage were observed during treatment (BT vs ET) in the two groups, although a significant decrease was observed at PT compared with ET in IIT (ET: 29.21 ± 13.31% vs PT: 20.73 ± 13.81%;  $P < 0.05$ ) and Co-HCV groups (ET: 16.90 ± 10.96% vs PT: 11.44 ± 6.83%;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3a). No significant differences were observed in CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> percentage either during treatment (BT vs ET) or at PT compared with ET in both groups studied. However, a significant increase in CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> percentage in IIT patients was observed at MT compared with BT (BT: 5.33 ± 2.56% vs 6.05 ± 2.95%;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3b).

Subsequently, both groups were compared at BT, MT, ET, PT and TT. The IIT patients showed a significantly higher CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> percentage than Co-HCV at the appearance of thyroid disease (TT) (IIT: 32.64 ± 9.15% vs Co-HCV: 19.6 ± 10.95%;  $P = 0.008$ ) (Fig. 3c). No significant differences were observed between the groups at BT (IIT: 25.38 ± 10.86% vs Co-HCV: 18.38 ± 11.2%;  $P = \text{NS}$ ), MT (IIT: 29.8 ± 10% vs Co-HCV: 19.6 ± 10.95%;  $P = \text{NS}$ ), ET (IIT: 29.21 ± 13.31% vs Co-HCV: 16.9 ± 10.96%;  $P = \text{NS}$ ) and PT (IIT: 20.73 ± 13.82% vs Co-HCV: 11.44 ± 6.83%;  $P = \text{NS}$ ), although CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> percentage was higher in IIT patients than in the Co-HCV group at each time point studied.

No significant differences were observed in CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> percentage between the two groups at BT (IIT: 5.33 ± 2.56% vs Co-HCV: 4.52 ± 2.88%;  $P = \text{NS}$ ), MT (IIT: 5.78 ± 1.90% vs Co-HCV: 3.31 ± 1.47%;  $P = \text{NS}$ ), ET (IIT: 6.05 ± 2.95% vs Co-HCV: 4.08 ± 2.29%;  $P = \text{NS}$ ), PT (IIT: 4.16 ± 2.28% vs Co-HCV: 3.09 ± 1.24%;  $P = \text{NS}$ ) and TT (IIT: 5.80 ± 3.06% vs Co-HCV: 4.08 ± 2.29%;  $P = \text{NS}$ ).



**Fig. 3** Th1 pattern (CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> lymphocyte subpopulation) and Th2 pattern (CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> lymphocyte subpopulation) in relation to IIT development. (a) Th1 pattern (CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> lymphocyte subpopulation) throughout antiviral treatment in relation to IIT development. (b) Th2 pattern (CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> lymphocyte subpopulation) throughout antiviral treatment in relation to IIT development. (c) Th1 pattern (CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> lymphocyte subpopulation) at the appearance of IIT (TT). BT, before treatment; MT, mid-treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks post-treatment; TT, appearance of interferon-induced thyroiditis; IIT, interferon-induced thyroiditis patients; Co-HCV, control subjects with chronic hepatitis C virus infection; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with BT; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared with ET.



### The percentage of regulatory T cells was higher in IIT patients

The effect of the combined antiviral treatment on Tregs percentage in the two groups is presented in Fig. 4. A significant increase in Tregs percentage during treatment was observed in both IIT patients and Co-HCV. At PT, the Tregs percentage decreased in comparison with at ET in both the groups, although differences were only statistically significant in Co-HCV group.

Comparison of IIT vs Co-HCV at BT, MT, ET, PT and TT showed that IIT patients had a significantly higher percentage of Tregs at the appearance of IIT (TT) (IIT:  $5.42 \pm 2.16\%$  vs Co-HCV:  $3.79 \pm 1.33\%$ ;  $P = 0.04$ ) (Fig. 4). The Tregs percentage was also higher in IIT compared with Co-HCV at BT (IIT:  $3.20 \pm 1.19\%$  vs Co-HCV:  $2.82 \pm 1.24\%$ ), MT (IIT:  $4.99 \pm 2.41\%$  vs Co-HCV:  $3.79 \pm 1.33\%$ ), ET (IIT:  $5.4 \pm 2.07\%$  vs Co-HCV:  $5.02 \pm 1.73\%$ ) and PT (IIT:  $4.44 \pm 1.29\%$  vs Co-HCV:  $3.87 \pm 1.45\%$ ), although the differences were not statistically significant.

### Effect of combined antiviral treatment on lymphocyte subpopulations in the different types of IIT patients

The effect of antiviral treatment on lymphocyte subpopulations studied was similar, independently whether the patient had HT, GD or destructive thyroiditis (data not shown). However, the low number of patients did not allow investigating whether differences in immune response may occur among different types of IIT.

### Discussion

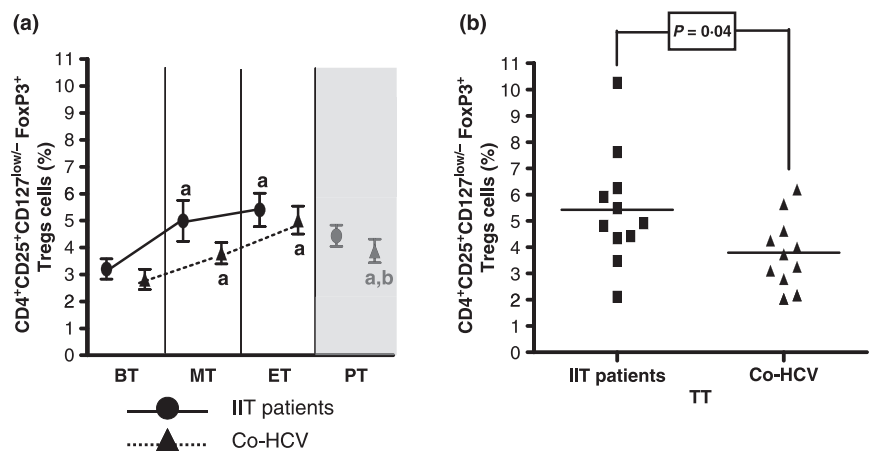
In this prospective study, we assessed the dynamics of different lymphocyte subpopulations in 11 HCV-infected patients who developed IIT during antiviral treatment with pegIFN- $\alpha$  and RBV and at 24 weeks of follow-up from a population of 120 patients with HCV. The percentage of IIT development in our study was 9.16%, similar to the prevalence described previously.<sup>7,8</sup>

The effects of IFN- $\alpha$  on the immune system<sup>9–12</sup> and dynamics of different lymphocyte subpopulations in patients with HCV during IFN- $\alpha$  treatment have been reported in several studies.<sup>23,25</sup>

However, data on studies of lymphocyte subpopulations related to IIT development are scant.<sup>13</sup> In the present study, the dynamics of innate and acquired immune subpopulations throughout antiviral treatment in patients with HCV who developed IIT were analysed. No differences were observed in CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, NK, NKT or iNKT cells between IIT patients and Co-HCV, probably due to immunomodulatory effects of IFN- $\alpha$ . It has been reported that IFN- $\alpha$  also upregulates the expression of Bcl-2 by interfering with apoptosis<sup>14</sup> and that an inappropriate expression of Bcl-2 is a recognized cause of the development of autoantibodies.<sup>26</sup> In this respect, no differences in Bcl-2 expression in B cells were observed between IIT patients and Co-HCV in the present study, probably due to the heterogeneity of IIT.

The main effect of IFN- $\alpha$  on the immune system is the increase in cell toxicity, sustained by suppression of Th2 and an increase in Th1 immune response.<sup>9,14,27</sup> As a predominance of Th1 activity has been demonstrated in organ-specific autoimmune diseases,<sup>28,29</sup> one hypothesis is that organ-specific autoimmunity triggered by IFN- $\alpha$ , including thyroid autoimmunity,<sup>30</sup> may be attributed to an imbalance towards a T-helper 1-mediated response. RBV also exerts immunomodulatory effects by inducing Th1 cytokines in the immune response.<sup>14</sup> However, the addition of RBV to IFN- $\alpha$  therapy in patients with chronic HCV infection does not modify the thyroid autoantibody pattern but increases the risk of developing hypothyroidism.<sup>31</sup> In our study, combined antiviral treatment increased, although not significantly, the Th1 response during treatment in both IIT and Co-HCV groups. Interestingly, IIT patients presented a higher Th1 response than Co-HCV at each point studied, although differences were only significant at the appearance of IIT (TT). On the other hand, Th2 response did not change during antiviral treatment and at PT in either group, except for an increase in Th2 response during the first months of treatment in IIT patients, as described by Mazziotti *et al.*,<sup>13</sup> although a different approach was used in the present study.<sup>32</sup>

Another lymphocyte subpopulation that could be implicated in IIT appearance is Tregs cells. Several reports identified a close association between the pathogenesis of autoimmune diseases, including AITD, and Tregs.<sup>19–21,33</sup> However, to our knowledge, there are no previous reports on Tregs in IIT patients. Recently, our group described a significant increase in Tregs percentage in patients with



**Fig. 4** Tregs percentage in relation to IIT development. (a) Tregs percentage throughout antiviral treatment in relation to IIT development. (b) Tregs percentage at the appearance of IIT (TT). BT, before treatment; MT, mid-treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks post-treatment; TT, appearance of interferon-induced thyroiditis; IIT, interferon-induced thyroiditis patients; Co-HCV, control subjects with chronic hepatitis C virus infection; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with BT; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared with ET.

chronic HCV during antiviral treatment with a decrease at 24 weeks PT compared with the ET.<sup>23</sup> In our study, both IIT patients and HCV controls presented a similar pattern of Tregs during treatment and PT, which might be explained by the immunomodulatory effects of antiviral therapy.

Currently, the key marker of Tregs is FoxP3 expression.<sup>17</sup> Since the recent discovery that FoxP3 expression is transiently induced upon activation of human CD4<sup>+</sup> T cells,<sup>34</sup> the finding that human Tregs express low levels or are negative for CD127, the interleukin-7 receptor, permits more specific definition of the Tregs phenotype.<sup>35</sup> In the present study, Tregs were defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. Interestingly, IIT patients showed a higher Tregs percentage than HCV controls throughout the study, although differences were only significant at TT. These results are in line with the increased Tregs observed in AITD by Marazuela *et al.*,<sup>19</sup> although they have not been confirmed by others,<sup>20,21</sup> suggesting that Tregs could be present in AITD in an adequate or increased number but their function could be deficient.<sup>19</sup> In relation to Tregs, it could be argued that functional assays were not performed to test differences in Tregs function between IIT patients and Co-HCV. Studies on Tregs were undertaken with cryopreserved cells, and we did not include proliferation and functional assays owing to the inherent limitations of this technique, particularly with frozen/thawed PBMC. Furthermore, *ex vivo* functional studies on Tregs are not standardized, and correlation with their *in vivo* function has not been fully established.<sup>36</sup>

We did not analyse lymphocyte subpopulations in thyroid tissue owing to the absence of goitre in all IIT patients and the resulting impossibility to realize a thyroid fine-needle aspiration. Therefore, the analysis of peripheral lymphocytes could be the easiest way to study the immunological status of these patients. Further studies will be needed to clarify the exact role of peripheral lymphocytes in IIT patients and whether they could provide a reliable marker of thyroid immune involvement.

In the literature, data regarding the correlation between the appearance of thyroid autoimmunity and the response to antiviral treatment are controversial.<sup>37,38</sup> In relation to this issue, in our study, the response to antiviral treatment was not related to the development of IIT.

A limitation of our study was that the duration of antiviral treatment differed among patients included in the study owing to HCV genotype. However, no differences in HCV genotype proportions were shown between the two groups, thereby allowing for intergroup comparison. Indeed, the duration of treatment was not related to the IIT appearance. Another weakness of our study was the limited number of patients, although it is clear that there are difficulties in the availability of patients for prospective studies of this nature, which did not allow investigating whether differences in immune response may occur between patients with different type of IIT.

In summary, we describe the different dynamics of lymphocyte subpopulations in patients with HCV who developed IIT during combined antiviral treatment. IIT patients showed a higher Th1 response than Co-HCV controls, similar to findings described previously.<sup>14</sup> Indeed, this is the first study to analyse Tregs in patients with chronic HCV who develop IIT during antiviral treatment, and a

higher Tregs percentage was found in IIT patients than in Co-HCV. Although the precise role of Tregs in IIT development remains to be determined, our data suggest that the compensatory increase in Tregs does not prevent the development of IIT. Furthermore, it is likely that Tregs analysis could provide complementary information to assess IIT development in patients with chronic HCV.

## Acknowledgements

The authors thank Yolanda Alba for technical assistance, Maribel Cuadrado, Isabel Ordóñez and Carme Pérez for nursing care and Christine O'Hara for valuable help with the English version of the manuscript. This work was supported by the Instituto de Investigación Carlos III, grant FIS PI05/0150 to Anna Sanmartí, M.D., Ph.D.

## Conflicting interest/financial disclosure

Nothing to declare.

## References

- 1 Wang, S.H. & Baker Jr, J.R. (2007) The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. *Thyroid*, **17**, 1–5.
- 2 Tomer, Y. (2010) Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present and future. *Thyroid*, **20**, 715–725.
- 3 Tomer, Y. & Huber, A. (2009) The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *Journal of Autoimmunity*, **32**, 231–239.
- 4 Tomer, Y. (2010) Hepatitis C and interferon induced thyroiditis. *Journal of Autoimmunity*, **34**, 322–326.
- 5 Strader, D.B., Wright, T., Thomaw, D.L. *et al.* (2004) Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, **39**, 1147–1171.
- 6 Mandac, J.C., Chaundhry, S., Sherman, K.E. *et al.* (2006) The clinical and physiological spectrum of interferon-alpha induced thyroiditis: toward a new classification. *Hepatology*, **43**, 661–672.
- 7 Koh, L.K.H., Greenspan, F.S. & Yeo, P.P.B. (1997) Interferon- $\alpha$ -induced thyroid dysfunction: three clinical presentations and review of the literature. *Thyroid*, **7**, 891–896.
- 8 Doi, F., Kakizaki, S., Takagi, H. *et al.* (2005) Long-term outcome of interferon-alpha-induced autoimmune thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Liver International*, **25**, 242–246.
- 9 Farrar, J.D. & Murphy, K.M. (2000) Type I interferons and T helper development. *Immunology Today*, **21**, 484–489.
- 10 Pfeffer, L.M., Dinarello, C.A., Herberman, R.B. *et al.* (1998) Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40<sup>th</sup> anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Research*, **58**, 2489–2499.
- 11 Corssmit, E.P., de Metz, J., Sauerwein, H.P. *et al.* (2000) Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **20**, 1039–1047.
- 12 Jewell, A.P., Worman, C.P., Lydyard, P.M. *et al.* (1994) Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL from apoptosis in vitro and in vivo. *British Journal of Haematology*, **88**, 268–274.
- 13 Mazziotti, G., Sorvillo, F., Piscopo, M. *et al.* (2005) Innate and acquired immune system in patients developing interferon-alpha-related autoimmune thyroiditis: a prospective study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**, 4138–4144.

- 14 Tam, R.C., Pai, B., Bard, J. *et al.* (1999) Ribavirin polarizes human T cell responses toward a type 1 cytokine profile. *Journal of Hepatology*, **30**, 376–382.
- 15 Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2003) Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease. *Current Molecular Medicine*, **3**, 693–706.
- 16 Létourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G. *et al.* (2009) IL-2 and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **123**, 758–762.
- 17 Liu, W., Putman, A.M., Xu-Yu, Z. *et al.* (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Tregs cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **203**, 1701–1711.
- 18 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, **299**, 1057–1061.
- 19 Marazuela, M., García-López, M.A., Figueroa-Vega, N. *et al.* (2006) Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **91**, 3639–3646.
- 20 Nakano, A., Watanabe, M., Iida, T. *et al.* (2007) Apoptosis-induced decrease of intrathyroidal CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid*, **17**, 25–31.
- 21 Pan, D., Shin, Y.H., Gopalakrishnan, G. *et al.* (2009) Regulatory T cells in Graves' disease. *Clinical Endocrinology*, **71**, 587–593.
- 22 Morris, G.P., Brown, N.K. & Kong, Y.C. (2009) Naturally-existing CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells are required for tolerance to experimental autoimmune thyroiditis induced by either exogenous or endogenous autoantigen. *Journal of Autoimmunity*, **33**, 68–76.
- 23 Soldevila, B., Alonso, N., Martínez-Arconada, M.J. *et al.* (2011) A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4+CD25+CD127low/-FoxP3+ T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. *Journal of Viral Hepatitis*, **18**, 384–392.
- 24 Wai, C.T., Greenon, J.K., Fontana, K.J. *et al.* (2003) A simple non-invasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, **38**, 518–526.
- 25 Trapero-Marugán, M., García-Buey, L., Muñoz, C. *et al.* (2006) Sustained virological response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C genotype 1 patients associated a persistent Th1 immune response. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **24**, 117–128.
- 26 Lang, J., Arnold, B., Hammerling, G. *et al.* (1997) Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **186**, 1513–1522.
- 27 Sreenarasimhaiah, J., Jaramillo, A., Crippin, J. *et al.* (2003) Concomitant augmentation of type 1 CD4+ and CD8+ T-cell responses during successful interferon- $\alpha$  and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Human Immunology*, **64**, 497–504.
- 28 De Carli, M., D'Elia, M.M., Mariotti, S. *et al.* (1993) Cytolytic T cells with Th1-like cytokine profile predominate in retroorbital lymphocytic infiltrates of Graves' ophthalmopathy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **77**, 1120–1124.
- 29 Katz, J.D., Benoist, C. & Mathis, D. (1995) T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science*, **268**, 1185–1188.
- 30 Gisslinger, H., Gilly, B., Woloszczuk, W. *et al.* (1992) Thyroid autoimmunity and hypothyroidism during long-term treatment with recombinant interferon- $\alpha$ . *Clinical & Experimental Immunology*, **90**, 363–367.
- 31 Carella, C., Mazziotti, G., Morisco, F. *et al.* (2002) The addition of ribavirin to interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis does not modify the thyroid autoantibody pattern but increases the risk of developing hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology*, **146**, 743–749.
- 32 Appay, V., van Lier, R.A.W., Sallusto, F. *et al.* (2008) Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry*, **73**, 975–983.
- 33 Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N. (2005) Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *International Reviews of Immunology*, **24**, 211–226.
- 34 Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E.I. *et al.* (2007) Transient expression of FoxP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, **37**, 129–138.
- 35 Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J. *et al.* (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **203**, 1693–1700.
- 36 Shevach, E.M. (2009) Mechanisms of FoxP3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, **30**, 636–645.
- 37 Saracco, G., Touscoz, A., Durazzo, M. *et al.* (1990) Autoantibodies and response to alpha-interferon in patients with chronic viral hepatitis. *Journal of Hepatology*, **11**, 339–343.
- 38 Morisco, F., Mazziotti, G., Rotondi, M. *et al.* (2001) Interferon-related thyroid autoimmunity and long-term clinical outcome of chronic hepatitis C. *Digestive and Liver Disease*, **33**, 247–253.

### 7.3. TERCER ESTUDI

*Regulatory T cells and other lymphocyte subpopulations in patients with melanoma developing interferon-induced thyroiditis during high-dose interferon- $\alpha$ 2b treatment.*

Cèl·lules T reguladores i altres subpoblacions limfocitàries en pacients amb melanoma que desenvolupen tiroïditis induïda per interferó durant el tractament amb altes dosis d' interferó- $\alpha$ 2b.

B. Soldevila, N. Alonso, M.J. Martínez-Arconada, M.L. Granada, A. Boada, V. Vallejos, M. A. Fernández-Sanmartín, R. Pujol-Borell, M. Puig-Domingo, A. Sanmartí, E.M. Martínez- Cáceres.

*Clinical of Endocrinology 2013. 78 (4): 621-628.*

(factor d'impacte 2013: 3,168)

## ORIGINAL ARTICLE

# Regulatory T cells and other lymphocyte subpopulations in patients with melanoma developing interferon-induced thyroiditis during high-dose interferon- $\alpha$ 2b treatment

Berta Soldevila<sup>\*†‡</sup>, Núria Alonso<sup>\*†‡</sup>, Maria J. Martínez-Arconada<sup>‡§</sup>, Maria L. Granada<sup>¶</sup>, Aram Boada<sup>\*\*</sup>, Virginia Vallejos<sup>††</sup>, Manuel Fraile<sup>††</sup>, Marco A. Fernández-Sanmartín<sup>‡‡</sup>, Ricardo Pujol-Borrell<sup>‡§§</sup>, Manel Puig-Domingo<sup>\*†‡</sup>, Anna Sanmartí<sup>\*†‡</sup><sup>1</sup> and Eva M. Martínez-Cáceres<sup>‡§§</sup><sup>1</sup>

<sup>\*</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, <sup>†</sup>Department of Medicine, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, <sup>‡</sup>Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, <sup>§</sup>Department of Immunology, Laboratory of Immunobiology for Research and Diagnosis (LIRAD), Blood and Tissue Bank, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, <sup>¶</sup>Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, <sup>\*\*</sup>Department of Dermatology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, <sup>††</sup>Department of Nuclear Medicine, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, <sup>‡‡</sup>Cytometry Platform, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, and <sup>§§</sup>Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

## Summary

**Context** One of the side effects of interferon-alpha therapy is interferon-induced thyroiditis (IIT). The role of lymphocyte subpopulations in IIT melanoma patients remains to be defined.

**Objective** Our objective was to assess different peripheral blood lymphocyte subpopulations, mainly regulatory T cells (Tregs), in melanoma patients who developed IIT.

**Design, patients and methods** From 30 melanoma patients receiving high-dose interferon (HDI)-alpha 2b (IFN- $\alpha$ 2b) treatment, those who developed IIT (IIT patients) were selected and compared with patients who did not develop IIT (Co-MM) and healthy controls (Co-H). Peripheral blood mononuclear cells were obtained before treatment (BT), mid-treatment (MT), end of treatment (ET), 24 weeks post-treatment and at appearance of IIT (TT).

**Results** Nine patients developed IIT (30%): four Hashimoto's thyroiditis and five destructive thyroiditis. An increase in Tregs was observed in both melanoma groups during HDI treatment. A decrease in CD3<sup>+</sup>, NKT lymphocyte subpopulations and Bcl2 expression on B cells was also observed in both groups. However, no changes were observed in the percentage of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, transitional B cells (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), natural killer (NK), invariant NKT (iNKT) lymphocytes and Th1/Th2 balance when BT was compared with ET.

At TT, IIT patients had a higher Tregs percentage than Co-MM ( $P = 0.012$ ) and Co-H ( $P = 0.004$ ), a higher iNKT percentage than Co-MM ( $P = 0.011$ ), a higher transitional B cells percentage than Co-H ( $P = 0.015$ ), a lower CD3<sup>+</sup> percentage than Co-H ( $P = 0.001$ ) and a lower Bcl2 expression on B cells than Co-H ( $P < 0.001$ ).

**Conclusions** Our results point to the immunomodulatory effects of IFN- $\alpha$  on different lymphocyte subpopulations and a possible role of Tregs in melanoma patients who developed IIT.

(Received 23 April 2012; returned for revision 3 June 2012; finally revised 16 July 2012; accepted 1 September 2012)

## Introduction

High-dose interferon (HDI)-alpha2b (IFN- $\alpha$ 2b) is the only FDA-approved adjuvant therapy for patients with a high risk of recurrence of melanoma. Numerous studies have suggested that the mechanism of action of IFN- $\alpha$ 2b in melanoma is due to its immunomodulatory activity.<sup>1–3</sup> Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) exerts different immune effects, including a switch of the immune response to a T-helper (Th) 1 pattern<sup>4</sup> and enhanced activity of T and B lymphocytes, macrophages and natural killer (NK) cells.<sup>5,6</sup> Interferon- $\alpha$  also up-regulates the expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), an apoptosis regulator protein.<sup>7</sup> One of the most common side effects of IFN- $\alpha$  therapy is thyroid disease, which has been mainly studied in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. In this sense, the term interferon-induced thyroiditis (IIT) has recently been established.<sup>8</sup> To our knowledge, few studies have described thyroid disease induced by IFN- $\alpha$  in melanoma patients,<sup>9,10,11</sup> occurring in 14.9–37.8% of the patients, and, to date, no study has analysed immune responses in IIT melanoma patients during IFN- $\alpha$ 2b treatment.

Correspondence: Berta Soldevila, Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel.: +34934978860; Fax: +34934978843; E-mail: bsoldevila.germanstrias@gencat.cat

<sup>1</sup>Shared senior co-authorship.



In recent years, regulatory T cells (Tregs) have been shown to play an important role in the maintenance of peripheral self-tolerance.<sup>12</sup> The key marker of Tregs is currently the expression of the forkhead/winged helix family transcription factor gene (FOXP3).<sup>13</sup> Several authors have studied Tregs in patients with autoimmune thyroid disease (AITD).<sup>14–16</sup> Our group described an increase in Tregs percentage in patients with chronic HCV infection who developed IIT during pegIFN- $\alpha$ 2a and ribavirin treatment.<sup>17</sup> Due to the description of HCV infection itself as a risk factor for the development of thyroiditis,<sup>18</sup> the aim of this study was to assess different lymphocyte subpopulations, mainly Tregs, in patients with melanoma and without HCV infection who developed IIT during IFN- $\alpha$ 2b treatment and evaluate their possible involvement in the appearance of this disease.

## Subjects and methods

### Subjects

We studied 30 high-risk melanoma patients [American Joint Committee on Cancer (AJCC) stages IIB-C, IIIA-B-C<sup>19</sup>] who had completed IFN- $\alpha$ 2b treatment after surgery, and selected those who developed IIT. The study group (IIT patients) included nine patients with melanoma who developed thyroid disease. Nine age- and sex-matched subjects with melanoma who did not develop thyroid disease during treatment served as a melanoma control group (Co-MM) and nine age- and sex-matched healthy subjects served as a healthy control group (Co-H). None of the patients had thyroid disease, defined as normal thyroid function and negative thyroid antibodies, prior to IFN- $\alpha$ 2b treatment.

Patients with melanoma were recruited from the outpatient clinic of the Department of Dermatology of the University Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). Exclusion criteria for IFN- $\alpha$ 2b treatment were: underlying autoimmune disease, liver disease, cardiac disease, severe kidney disease, epilepsy, psychiatric illness and depression, HCV infection, positive antibodies to the human immunodeficiency viruses type 1 and 2 and immunocompromised patients receiving organ transplant. Healthy control subjects were recruited from healthy medical staff of the University Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). The study was approved by the local Ethics Committee and written informed consent was obtained from all patients.

### Interferon- $\alpha$ 2b treatment

Prior to administration of the first dose of IFN- $\alpha$ 2b, a normal blood examination and electrocardiography were required. Patients with melanoma received HDI regimen consisting in an induction phase [20  $\times$  10<sup>6</sup> U/m<sup>2</sup> intravenous of IFN- $\alpha$ 2b (Intron-A<sup>®</sup>; Merck & Co.; Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) daily from day 1 to day 5 for four consecutive weeks] and in a maintenance phase [10  $\times$  10<sup>6</sup> U/m<sup>2</sup> subcutaneous of IFN- $\alpha$ 2b (Intron-A<sup>®</sup>; Merck & Co.; Inc) three times per week for 48 weeks].

### Detection of interferon-induced thyroiditis

Thyroid function [serum thyrotropin (TSH), free thyroxine (FT4) and total 3, 5, 3'-triiodothyronine (TT3)] and autoantibodies [serum thyroglobulin (TgAb), thyroperoxidase (TPOAb) and TSH receptor antibodies (TSHRab)] were evaluated at baseline, and every 4–6 weeks until the end of treatment (ET) and once at 24 weeks post-treatment (PT). Serum TSH, FT4 and TT3 were measured by an automated chemoluminescent immunoassay with a Modular Analytics E-170 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Serum TgAb and TPOAb were measured by DPC Immulite<sup>®</sup> (Siemens, Deerfield, IL, USA), and TSHRab by Iasontrab<sup>®</sup> e. 3rd generation (Iason, Graz-Seiersberg, Austria).

Patients developing IIT ( $n = 9$ ) were selected on the basis of the appearance of thyroid autoantibodies and/or thyroid dysfunction. A thyroid radioactive iodine uptake scan (RAIU) was performed in patients with suppressed TSH. IIT included Hashimoto's thyroiditis (HT), defined as hypothyroidism or the presence of TgAb and/or TPOAb; Graves' disease (GD) defined as hyperthyroidism with positive TSHRab and diffusely increased thyroid RAIU; and destructive thyroiditis (DT), defined as thyrotoxicosis with negative TSHRab and low thyroid RAIU.

### Flow cytometry analysis

Immunological studies were performed at baseline before treatment (BT), mid-treatment (MT), ET, 24 weeks PT and at appearance of IIT (TT). Results were compared between both melanoma groups (IIT, Co-MM) at each point. Immunological evaluations at TT were made on samples acquired at the appearance of IIT in IIT patients and compared with samples acquired at MT (24 weeks of HDI treatment) in Co-MM patients.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and cryopreserved as previously described.<sup>17</sup> Cells were stained with surface molecules with several combinations of the following monoclonal antibodies: CD3-phycoerythrin cychrome (PECy5), CD4-allophycocyanin (APC), CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC), invariant NKT (iNKT)-phycoerythrin (PE), CD19-PECy5, CD4-FITC, CCR7-PE, CCR5-PECy5, CRTh2-APC, CD3-FITC, CD16/56-PE, CD3<sup>+</sup>-gamma/delta ( $\gamma\delta$ )-APC, CD24-FITC, CD38-PE, CD27-APC, [all from Becton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA, USA] for 30 min at 4 °C and protected from light. After incubation, cells were washed and resuspended in flow cytometry staining buffer. Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>/FoxP3<sup>+</sup>) staining was performed as previously described.<sup>17</sup> Cytoplasmic staining of Bcl-2 on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes was performed in a similar manner to FoxP3<sup>+</sup> staining, that is, after surface staining of CD19<sup>+</sup> cells, cells were fixed/permeabilized and stained with Bcl-2 or isotype control and incubated for 45 min at 4 °C in the dark. Cells were then washed twice in permeabilization buffer and resuspended in flow cytometry staining buffer.

Samples were acquired in a four-colour multiparameter flow cytometer (FACScalibur<sup>®</sup>; BD Biosciences). The percentage of

CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>), iNKT, CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, transitional B cells (CD24<sup>high</sup>CD28<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> and Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>) lymphocyte subpopulations as well as median fluorescence intensity (MFI) of Bcl-2 on CD19<sup>+</sup> B lymphocytes were studied. Data were analysed with CELLQUEST software<sup>®</sup> (BD Biosciences). All samples of the longitudinal study of each patient were processed in the same experiment by the same blinded researcher to avoid interassay variability.

### Statistical analysis

Quantitative results were expressed as mean ± SD or medians (interquartile range). Differences between two groups were tested by the nonparametric Mann–Whitney *U* test and among three groups were tested by the ANOVA test. Pair-wise comparisons were based on the Signed Rank test. Differences between two qualitative variables were tested by the chi-square test. Two-tailed *P* values of 0.05 or less were considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS/Windows version 12.0; SPSS Inc., Chicago IL, USA) and the software program GRAPHPAD PRISM (4.0b version; GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## Results

### Patient characteristics

Baseline characteristics of the three groups studied (IIT, Co-MM, Co-H) are shown in Table 1. Nine patients developed IIT (30%). Individual hormonal, immunological and thyroid RAIU data of IIT patients at the appearance of thyroid disease are

shown in Table 2. Thyroid disease appeared during the first 6 months of anti-viral treatment in most IIT patients. Four of the nine IIT patients presented HT: one with clinical hypothyroidism and positive TgAb and TPOAb, one with positive TgAb and TPOAb with normal thyroid function and two with subclinical hypothyroidism and negative TgAb and TPOAb; and five presented DT with thyrotoxicosis, negative TSHRab and a low thyroid RAIU.

The three patients with hypothyroidism, either clinical or subclinical form, required substitutive levothyroxine therapy that needed to be continued at PT. All patients with DT developed hypothyroidism during IFN-α2b treatment and required substitutive levothyroxine therapy that needed to be continued at PT. The patient with positive thyroid autoantibodies persisted with a normal thyroid function at PT.

### The percentage of regulatory T cells was higher in IIT patients

The effect of IFN-α2b treatment on Tregs percentage in the two melanoma groups (IIT and Co-MM) is presented in Fig. 1a. A significant increase in Tregs percentage during treatment and a significant decrease at PT in comparison with at ET were observed in both IIT and Co-MM groups.

Comparison of IIT vs Co-MM at BT, MT, ET, PT showed that IIT patients had a higher Tregs percentage than Co-MM at MT (IIT: 7.84 ± 3.11% vs Co-MM: 4.23 ± 2.32%), ET (IIT: 7.93 ± 4.62% vs Co-MM: 5.26 ± 2.41%) and PT (IIT: 4.67 ± 4% vs Co-MM: 2.40 ± 1.67%), although the differences were not statistically significant (Fig. 1a).

At baseline, no significant differences in Tregs percentage were observed among IIT, Co-MM and Co-H groups (IIT: 3.70 ± 2.22%; Co-MM: 3.61 ± 1.62%; Co-H: 3.46 ± 1.11%;

**Table 1.** Patient characteristics

	IIT	Co-MM	Co-H	<i>P</i>
<i>n</i>	9	9	9	NS
Sex (M/F)	5/4	5/4	5/4	NS
Age (years, mean ± SD)	50.67 ± 12.24	47.56 ± 11.89	42.44 ± 16.39	NS
Melanoma stage ( <i>N</i> )				
II B-C	6	6	–	NS
III A-B-C	3	3	–	NS
Survival at present (survival/exitus)	8/1	7/2	–	NS
Progression of disease at present				
Free-disease	7	6	–	NS
Local skin recurrence	0	1	–	NS
Distant metastases	2	1	–	NS
Baseline TSH (mu.int/l, mean ± SD, nr: 0.27–4.2)	1.99 ± 1.10	2.48 ± 1.65	2.04 ± 1	NS
Baseline FT4 (ng/dl, mean ± SD, nr: 0.82–1.77)	1.34 ± 0.31	1.18 ± 0.18	1.21 ± 0.13	NS
Baseline TT3 (ng/ml, mean ± SD, nr: 0.8–2)	1.34 ± 0.34	1.24 ± 0.27	1.10 ± 0.10	NS
Positive baseline TgAb (%; nr: 0–40)	0	0	0	NS
Positive baseline TPOAb (%; nr: 0–35)	0	0	0	NS
Positive baseline TSHRab (%; nr: 0–0.7)	0	0	0	NS

IIT, interferon-induced thyroiditis patients; Co-MM, control subjects with melanoma; Co-H, control healthy subjects; M, male; F, female; NS, not significant; nr: normal range; SD, standard deviation; TSH, thyrotropin; FT4, free thyroxine; TT3, total triiodothyronine; TgAb, thyroglobulin antibodies; TPOAb, thyroperoxidase antibodies; TSHRab, thyrotropin receptor antibodies.

**Table 2.** Characteristics of patients at the appearance of IIT

	Sex (M/F)	Age (years)	Time (month)	TSH (mu.int/l)	FT4 (ng/dl)	TT3 (ng/ml)	TgAb (IU/ml)	TPOAb (IU/ml)	TSHRab (U/l)	Thyroid RAIU
1	F	23	3	173	0.35	0.85	386	1345	0	–
2	F	56	12	1.97	1.17	1.37	0	101	0	–
3	M	56	7	16.00	0.99	0.99	0	0	0	–
4	M	43	4	11.53	1.31	1.6	0	0	0	–
5	M	46	9	0.005	1.28	1.8	0	0	0	↓
6	F	52	3	0.05	1.12	1.25	750	513	0	↓
7	M	45	6	0.12	1.68	1.39	386	0	0	↓
8	M	42	6	0.012	1.75	1.6	516	2628	0	↓
9	F	43	4	0.007	2.33	2	66.6	373	0	↓

M, male; F, female; TSH, thyrotropin; FT4, free thyroxine; TT3, total triiodothyronine; TgAb, thyroglobulin antibody titres; TPOAb, thyroperoxidase antibody titres; TSHRab, thyrotropin receptor antibody titres; Thyroid RAIU, thyroid radioactive iodine uptake scan; IIT, interferon-induced thyroiditis.

$P = ns$ ) (Fig. 1b). However, at the time of IIT appearance (TT), IIT group presented higher Tregs percentage than Co-MM (IIT:  $8.93 \pm 4.89\%$  vs Co-MM:  $4.23 \pm 2.32$ ;  $P = 0.012$ ) and than Co-H groups (IIT:  $8.93 \pm 4.89\%$  vs Co-H:  $3.46 \pm 1.11\%$ ;  $P = 0.004$ ). No differences were observed between Co-MM and Co-H groups (Co-MM:  $4.23 \pm 2.32$  vs Co-H:  $3.46 \pm 1.11\%$ ;  $P = ns$ ) at TT (Fig. 1c).

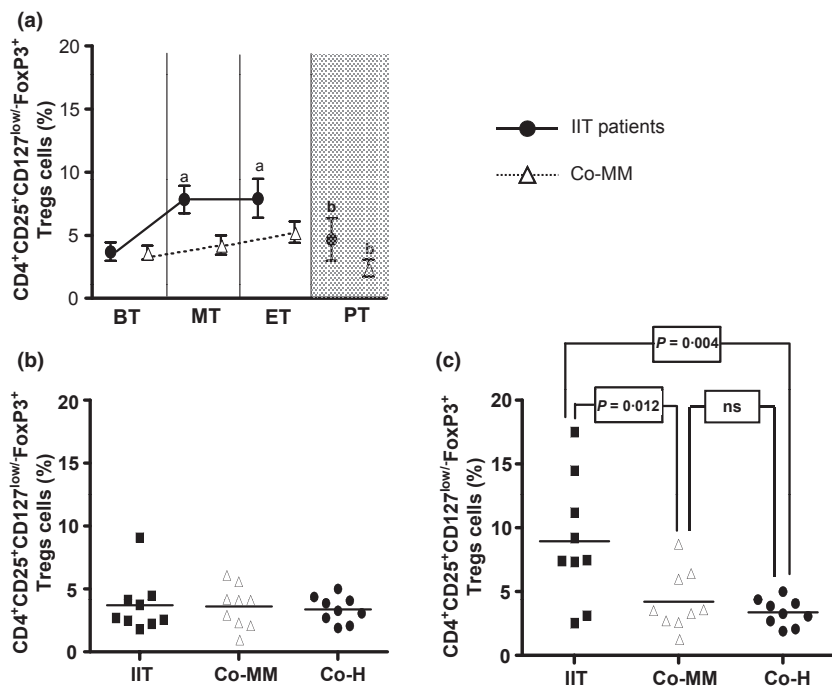
#### Effect of IFN- $\alpha 2b$ treatment on lymphocyte subpopulations in IIT and control melanoma groups (Co-MM)

The dynamics of the following lymphocyte subpopulations ( $CD3^+$ , NKT,  $CD4^+CCR5^+CCR7^-$  and  $CD4^+CRTh2^+CCR7^-$  lymphocytes and Bcl-2 expression on B cells) during IFN- $\alpha 2b$  treatment in the two groups are depicted in Fig. 2. On the other

hand, no changes were observed in other subpopulations analysed ( $CD19^+$ ,  $CD24^{high}CD38^{high}CD19^+CD27^-$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , NK, iNKT and  $CD3^+\gamma\delta^+$  lymphocytes) during the treatment (BT vs ET) and at PT compared with ET (data not shown). When the two groups were compared (IIT vs Co-MM) at BT, MT, ET and PT, no differences were observed in the percentages of these lymphocyte subpopulations analysed (data not shown).

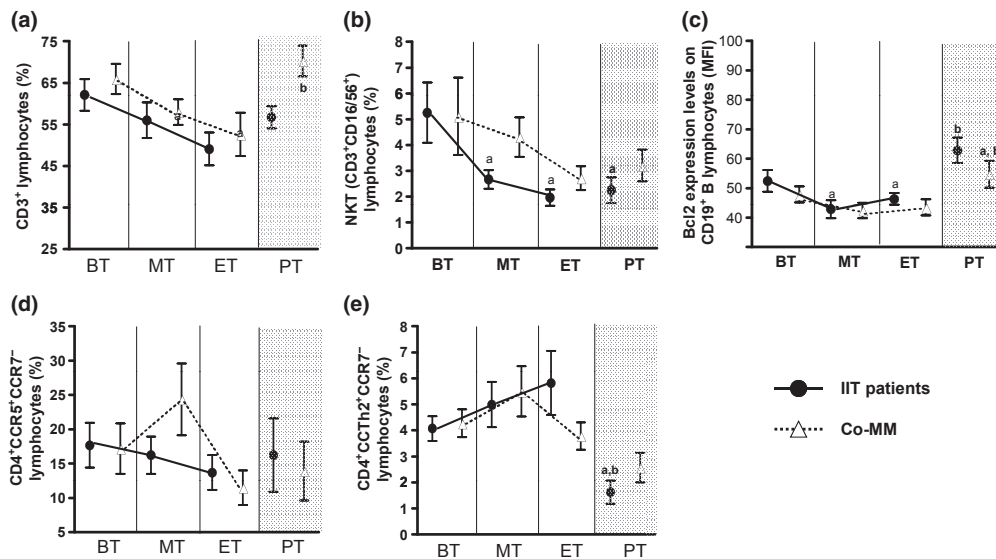
#### Differences on lymphocyte subpopulations among the three groups studied (IIT, Co-MM, Co-H) at IIT appearance

Differences in relation to different lymphocyte subpopulations among IIT, Co-MM and Co-H groups at the moment of IIT appearance were assessed. Healthy control group presented higher  $CD3^+$  percentage than IIT group (Co-H:  $67.16 \pm 4.75\%$



**Fig. 1** Tregs percentage in relation to the development of IIT. (a) Tregs percentage throughout IFN- $\alpha 2b$  treatment in relation to the development of IIT. (b) Tregs percentage at baseline. (c) Tregs percentage at appearance of IIT (TT). BT, before treatment; MT, mid-treatment; ET, end of treatment; PT, 24 weeks post-treatment; IIT, interferon-induced thyroiditis patients; Co-MM, control subjects with melanoma; Co-H, control healthy subjects; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with BT; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared with ET.





**Fig. 2** Lymphocyte subpopulations throughout IFN- $\alpha$ 2b treatment in relation to the development of IIT. (a) CD3<sup>+</sup> lymphocytes. (b) NKT lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>). (c) B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) expression levels in CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. (d) CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> lymphocytes (Th1 pattern). (e) CD4<sup>+</sup>CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> lymphocytes (Th2 pattern). BT, Before treatment; MT, Mid-treatment; ET, End of treatment; PT, 24 weeks post-treatment; MFI, mean fluorescence intensity; IIT patients, interferon-induced thyroiditis patients; Co-MM, melanoma control subjects; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with BT; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared with ET.

vs IIT:  $47.99 \pm 12.60\%$ ;  $P = 0.001$ ) and Co-MM group (Co-H:  $67.16 \pm 4.75\%$  vs Co-MM:  $57.99 \pm 9.15\%$ ;  $P = \text{ns}$ ), although differences were only significant when Co-H group was compared with IIT group. No differences in CD3<sup>+</sup> percentage were observed between IIT and Co-MM groups (Fig. 3a). Melanoma control group presented lower iNKT percentage than IIT (Co-MM:  $1.21 \pm 0.51\%$  vs IIT:  $2.32 \pm 1.06\%$ ;  $P = 0.011$ ) and Co-H groups (Co-H:  $2.35 \pm 0.53$  vs Co-MM:  $1.21 \pm 0.51\%$ ;  $P = 0.009$ ). No differences in iNKT percentage were observed between IIT and Co-H groups at TT (Fig. 3b). IIT patients (IIT:  $43.65 \pm 11.09\%$  vs Co-H:  $71.99 \pm 12.38\%$ ;  $P < 0.001$ ) and melanoma controls (Co-MM:  $42.44 \pm 7.86\%$  vs Co-H:  $71.99 \pm 12.38\%$ ;  $P < 0.001$ ) presented lower Bcl-2 expression on CD19<sup>+</sup> B cells than healthy subjects. No differences were observed between IIT and Co-MM groups (IIT:  $43.65 \pm 11.09\%$  vs Co-MM:  $42.44 \pm 7.86\%$ ;  $P = \text{ns}$ ) (Fig. 3c). IIT patients (IIT:  $3.74 \pm 2.40$  vs Co-H:  $0.90 \pm 0.65$ ;  $P = 0.015$ ) and melanoma control group (Co-MM:  $3.77 \pm 2.37$  vs Co-H:  $0.90 \pm 0.65$ ;  $P = 0.014$ ) presented a higher transitional B cells (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) percentage than healthy control group at the time of IIT appearance. No differences were observed between IIT patients and Co-MM at this point studied (Fig. 3d). No differences were observed among the three groups in the percentages of CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CRTh2<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, NK, NKT and CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> lymphocyte subpopulations (data not shown).

#### Effect of IFN- $\alpha$ 2b treatment on lymphocyte subpopulations in the different types of IIT

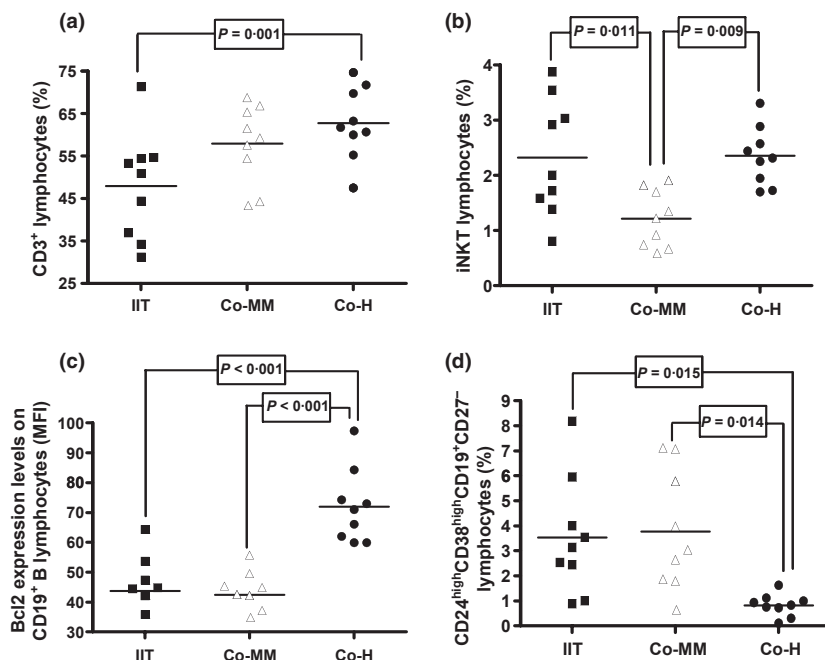
The effect of IFN- $\alpha$ 2b treatment on the lymphocyte subpopulations studied was similar, independently whether the patients

had HT or DT. Indeed, no differences were observed between the different types of IIT at all the time points studied (data not shown).

#### Discussion

In this prospective study, the dynamics of different lymphocyte subpopulations in nine melanoma patients who developed IIT during HDI treatment and at 24 weeks of follow-up, from a population of 30 melanoma patients who completed HDI treatment, were assessed. The percentage of IIT development was 30%, similar to the prevalence previously described.<sup>9,10</sup>

Several reports have associated regulatory T cells with the pathogenesis of autoimmune diseases, including AITD.<sup>14–17,20</sup> However, to our knowledge, there are no previous reports on Tregs in melanoma patients who developed IIT. In our study, both IIT and Co-MM patients presented a similar Tregs pattern throughout IFN- $\alpha$ 2b treatment, which might be explained by its immunomodulatory effects. These results concur with those recently published by our group in chronic HCV patients who developed IIT<sup>17</sup> but disagree with those described by Ascierio *et al.*<sup>21</sup> However, a different phenotypical characterization of Tregs was used in the two studies. Indeed, Tregs studies were realized during the intravenous induction phase of IFN- $\alpha$ 2b treatment in the study of Ascierio *et al.*, whereas in the current study, lymphocyte subpopulations studies were performed during the 48 weeks of IFN- $\alpha$ 2b treatment. These facts could explain the different results obtained between the two studies. In the present study, IIT patients showed a higher Tregs percentage than Co-MM throughout the study, being differences only significant at TT. These results are in line with those published by our group in IIT HCV patients<sup>17</sup> and with the increased



**Fig. 3** Lymphocyte subpopulations at interferon-induced thyroiditis appearance (TT). (a) CD3<sup>+</sup> lymphocytes. (b) Invariant NKT (iNKT) lymphocytes. (c) B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) expression levels in CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. (d) Transitional B cells (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> lymphocytes). IIT, interferon-induced thyroiditis patients; Co-MM, control subjects with melanoma; Co-H, control healthy subjects; MFI, mean fluorescence intensity.

Tregs observed in AITD by some authors,<sup>14</sup> although not confirmed by others,<sup>15,16</sup> suggesting that Tregs could be present in AITD in an adequate or increased number but their function could be deficient.<sup>14</sup> In any case, our data suggest that the compensatory increase of Tregs does not prevent the development of IIT.

The effects of IFN- $\alpha$ 2b on the immune system and different lymphocyte subpopulations in patients with melanoma during IFN treatment have been reported in several studies.<sup>2,22,23</sup> However, to our knowledge, there are no data about dynamics of different lymphocyte subpopulations related to melanoma patients who developed IIT during treatment. This is the first study to assess dynamics of innate and acquired immune subpopulations throughout HDI treatment in melanoma patients who developed IIT. No differences were observed in CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, NK, NKT, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, Th1/Th2 pattern, B cells pattern or transitional B cells between IIT patients and Co-MM throughout treatment, probably due to immunomodulatory effects of IFN- $\alpha$ . It has been reported that IFN- $\alpha$  also up-regulates the expression of Bcl-2 by interfering with apoptosis,<sup>7</sup> and that an inappropriate expression of Bcl-2 is a cause of the development of auto-antibodies.<sup>24</sup> In this respect, no differences in Bcl-2 expression on B cell between IIT patients and Co-MM were observed in the present study, probably due to the heterogeneity of IIT. On the other hand, conflicting results have been described in the role of iNKT in the pathogenesis of autoimmune disease.<sup>25,26</sup> In our study, Co-MM presented a lower iNKT percentage than IIT patients and Co-H at the appearance of IIT. Transitional B cells are another subpopulation related to autoimmunity development. Recent human studies have suggested that different autoimmune diseases may share a relaxation of the negative and positive selection, expanding transitional B cells, thereby leading to increased autoreactivity in the mature naïve compartment.<sup>27</sup> In our study,

IIT patients and Co-MM presented higher transitional B cells (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) percentage than Co-H at the time of IIT appearance (TT). Thus, the increase observed in this subpopulation might be more related to the immunomodulatory effect of IFN- $\alpha$ 2b treatment than to the induction of IIT.

The effect of IFN- $\alpha$ 2b on the lymphocyte subpopulations studied was similar, independently of the type of IIT. Probably, the influence of IFN- $\alpha$ 2b in modulating peripheral lymphocyte subpopulations behaviour overcomes any other influence, either genetic susceptibility to antibody development thus leading to a quite homogeneous subpopulation picture.

A limitation of this study is that we carried out a phenotypical evaluation of Tregs and we did not perform functional assays. Studies on Tregs in the present study were undertaken with cryopreserved cells. Owing to the inherent limitations of this technique, particularly with frozen/thawed PBMC, proliferation and functional assays were not included.<sup>28</sup> In animal models of several autoimmune diseases, the role of Tregs has been clearly demonstrated. In the experimental autoimmune thyroiditis (EAT) model, it has been shown that changes in Treg function markedly influence susceptibility and/or resistance to thyroiditis.<sup>29</sup> Also in this model, it has been demonstrated that Tregs depletion enables thyroiditis induction with mouse thyroglobulin (mTg) in both traditionally resistant mice and in mTg induced and in genetically-susceptible mice.<sup>30,31</sup> However, although a clear demonstration of the role of Tregs has been possible in animal models, to find similar evidence in humans is proved to be difficult because of the various Tregs phenotypes and functional status.

Lymphocyte subpopulations were not analysed in thyroid tissue owing to the absence of goitre in all IIT patients and the resulting impossibility to realize a thyroid fine-needle aspiration. This point represents a limitation of the study, as the distribution of

lymphocyte subpopulation in blood does not always reflect tissue conditions. In this sense, it has been proposed that IFN- $\alpha$  induces tissue-specific autoimmunity by immune recruitment mechanisms as well as by direct tissue toxic effects.<sup>32</sup> In the thyroid, it has been demonstrated that this first pathway involves the induction and release of Th1 cytokines/chemokines, such as CXCL10, from thyroid follicular cells, which mediate the recruitment of cytotoxic cells that induce autoimmune cell death.<sup>32,33</sup> The observation of thyroid cell death in vivo and in vitro<sup>32,34</sup> with IFN- $\alpha$  strongly suggests direct and independent thyroid toxicity.

Another limitation of our study was the limited number of patients, although it is clear that there are difficulties in the availability of patients for prospective studies of this nature. A restriction of our study was also the heterogeneity of IIT, although no differences on lymphocytes subpopulations studied were observed between the different types of IIT.

In summary, we describe the different dynamics of lymphocyte subpopulations in patients with melanoma during interferon- $\alpha$ 2b treatment. Our findings concur with the concept of immunomodulation of interferon treatment, described previously by our group in patients with hepatitis C virus infection.<sup>35</sup> Indeed, a higher regulatory T cells percentage was found in interferon-induced thyroiditis patients than in melanoma control group, mainly at the moment of interferon-induced thyroiditis appearance, similar to those described by our group in hepatitis C virus patients during interferon- $\alpha$ 2b treatment.<sup>17</sup> Our data suggest that the compensatory increase of regulatory T cells does not prevent the development of interferon-induced thyroiditis, although future studies would be useful to improve understanding of regulatory T cells in the pathogenesis of interferon-induced thyroiditis.

## Acknowledgements

The authors thank the members of the Cytometry Platform of IGTP for their continuous help and suggestions. The authors also thank Yolanda Alba for technical assistance, Maribel Cuadrado, Isabel Ordóñez and Carme Pérez for nursing care and Donna Pringle for valuable help with the English version of the manuscript.

## Funding

This work was supported in part by the Instituto de Investigación Carlos III, grant FIS PI05/0150 to Anna Sanmartí, M.D., Ph.D and by the Societat Catalana d'Endocrinologia i Nutrició, grant for research 2009 to Berta Soldevila, M.D.

## Conflict of interest

Nothing to declare.

## References

- 1 Ascierto, P.A. & Kirikwood, J.M. (2008) Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *Journal of Translational Medicine*, **6**, 62–72.

- 2 De la Salmonière, P., Grob, J.J., Dreno, B., *et al.* (2000) White blood cell count: a prognostic factor and possible subset indicator of optimal treatment with low-dose adjuvant interferon in primary melanoma. *Clinical Cancer Research*, **6**, 4713–4718.
- 3 Gogas, H., Ioannovich, J., Dafni, U., *et al.* (2006) Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *New England Journal of Medicine*, **354**, 709–718.
- 4 Farrar, J.D. & Murphy, K.M. (2000) Type I interferons and T helper development. *Immunology Today*, **21**, 484–489.
- 5 Pfeffer, L.M., Dinarello, C.A., Herberman, R.B., *et al.* (1998) Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Research*, **58**, 2489–2499.
- 6 Corssmit, E.P., de Metz, J., Sauerwein, H.P., *et al.* (2000) Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **20**, 1039–1047.
- 7 Jewell, A.P., Worman, C.P., Lydyard, P.M., *et al.* (1994) Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL from apoptosis in vitro and in vivo. *British Journal of Haematology*, **88**, 268–274.
- 8 Mandac, J.C., Chaundhry, S., Sherman, K.E., *et al.* (2006) The clinical and physiological spectrum of interferon-alpha induced thyroiditis: toward a new classification. *Hepatology*, **43**, 661–672.
- 9 Pichert, G., Jost, L.M., Fierz, W., *et al.* (1991) Clinical and immune modulatory effects of alternative weekly interferon alfa-2a in patients with advanced renal cell carcinoma and melanoma. *British Journal of Cancer*, **63**, 287–292.
- 10 Satger, I., Meier, A., Schenck, F., *et al.* (2007) Autoimmunity as a prognostic factor in melanoma patients treated with adjuvant low-dose interferon alpha. *International Journal of Cancer*, **121**, 2562–2566.
- 11 Loquai, C., Nashan, D., Hensen, P., *et al.* (2008) Safety of pegylated interferon-alpha-2a in adjuvant therapy of intermediate and high-risk melanomas. *European Journal of Dermatology*, **18**, 29–35.
- 12 Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2003) Naturally arising CD25+ CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease. *Current Molecular Medicine*, **3**, 693–706.
- 13 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, **299**, 1057–1061.
- 14 Marazuela, M., García-López, M.A., Figueroa-Vega, N., *et al.* (2006) Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **91**, 3639–3646.
- 15 Nakano, A., Watanabe, M., Iida, T., *et al.* (2007) Apoptosis-induced decrease of intrathyroidal CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid*, **17**, 25–31.
- 16 Pan, D., Shin, Y.H., Gopalakrishnan, G., *et al.* (2009) Regulatory T cells in Graves' disease. *Clinical Endocrinology*, **71**, 587–593.
- 17 Soldevila, B., Alonso, N., Martínez-Arconada, M.J., *et al.* (2011) A prospective study of lymphocyte subpopulations and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection developing interferon-induced thyroiditis. *Clinical Endocrinology*, **75**, 535–543.
- 18 Tomer, Y. & Menconi, F. (2009) Interferon induced thyroiditis. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, **23**, 703–712.
- 19 Balch, C.H., Buzaid, A.C., Soong, S.J., *et al.* (2001) Final Version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **19**, 3635–3648.

- 20 Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N. (2005) Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *International Reviews of Immunology*, **24**, 211–226.
- 21 Ascierto, P.A., Napolitano, M., Celentano, E., et al. (2010) Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulating effects of high-dose interferon-alpha 2b treatment. *Journal of Translational Medicine*, **8**, 76–88.
- 22 Kirkwood, J.M., Richards, T., Zarour, H.M., et al. (2002) Immunomodulatory effects of high-dose and low-dose interferon alpha2b in patients with high-risk resected melanoma: the E2690 laboratory corollary of intergroup adjuvant trial E1690. *Cancer*, **95**, 1101–1112.
- 23 Critchley-Thorne, R.J., Yan, N., Nacu, S., et al. (2007) Down-regulation of the interferon signalling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *Plos Medicine*, **4**, e176.
- 24 Lang, J., Arnold, B., Hammerling, G., et al. (1997) Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. *Journal of Experimental Medicine*, **186**, 1513–1522.
- 25 Furlan, R., Bergami, A., Cantarella, D., et al. (2003) Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *European Journal of Immunology*, **33**, 1830–1838.
- 26 Griseri, T., Beaudoin, L., Novak, J., et al. (2005) Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells. *Journal of Immunology*, **175**, 2091–2101.
- 27 Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., et al. (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, **301**, 1374–1377.
- 28 Shevach, E.M. (2009) Mechanisms of FoxP3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, **30**, 636–645.
- 29 Kong, Y.C., Morris, G.P., Brown, N.K., et al. (2009) Autoimmune thyroiditis: a model uniquely suited to probe regulatory T cell function. *Journal of Autoimmunity*, **33**, 239–246.
- 30 Morris, G.P., Brown, N.K. & Kong, Y.C. (2009) Naturally-existing CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells are required for tolerance to experimental autoimmune thyroiditis induced by either exogenous or endogenous autoantigen. *Journal of Autoimmunity*, **33**, 68–76.
- 31 Lewis, M., Grialdo, A.A. & Kong, Y.C. (1987) Resistance to experimental autoimmune thyroiditis induced by physiologic manipulation of thyroglobulin level. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **45**, 92–104.
- 32 Akeno, N., Smith, E.P., Stefan, M., et al. (2011) IFN- $\alpha$  mediates the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *Journal of Immunology*, **186**, 4693–4706.
- 33 Antonelli, A., Ferrari, S.M., Fallahi, P., et al. (2010) Interferon-alpha, -beta and -gamma induce CXCL9 and CXCL10 secretion by human thyrocytes: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Cytokine*, **50**, 260–267.
- 34 Caraccio, N., Cuccato, S., Pratesi, F., et al. (2009) Effect of type I interferon(s) on cell viability and apoptosis in primary human thyrocyte cultures. *Thyroid*, **19**, 149–155.
- 35 Soldevila, B., Alonso, N., Martínez-Arconada, M.J., et al. (2011) A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4(+)CD25(+)CD127(low/-)FoxP3(+) T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. *Journal of Viral Hepatitis*, **18**, 384–392.

## 7.4. RESUM DELS RESULTATS

En resum, els resultats més rellevants dels estudis són els següents:

### 7.4.1. Primer estudi

#### 7.4.1.1. Característiques dels pacients

- S'inclouen 35 pacients amb HC-C que inicien tractament antiviral amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV. Divuit pacients presenten una RVS i 17 són NR. D'aquests últims, 13 són NRP i s'atura el tractament abans de la setmana 24 en un pacient per efectes secundaris.
- Abans d'iniciar el tractament, els pacients NR presenten una càrrega viral i un índex APRI superior als pacients amb RVS.

#### 7.4.1.2. Efectes del tractament antiviral combinat amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV sobre les subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C

- S'observa un increment del percentatge de Tregs durant el tractament antiviral ( $p < 0,05$ ) amb una disminució a les 24 setmanes post-tractament ( $p < 0,05$ ).
- S'observa una disminució del percentatge de les subpoblacions limfocitàries de CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma\delta$ <sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup> durant el tractament antiviral (tots  $p < 0,05$ ) amb un increment durant les 24 setmanes post-tractament (tots  $p < 0,05$ ).

- S'observa una disminució del percentatge de la subpoblació CD4<sup>+</sup> durant el tractament antiviral ( $p < 0,05$ ) amb una disminució a les 24 setmanes post-tractament ( $p < 0,05$ ).
- S'observa un increment de l'expressió de CD81 en els limfòcits B durant el tractament antiviral ( $p < 0,05$ ) i aquesta expressió es manté elevada a les 24 setmanes post-tractament, persistint més elevada que abans de l'inici del tractament ( $p < 0,05$ ).

#### 7.4.1.3. Efectes del tractament antiviral combinat amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV sobre les subpoblacions limfocitàries en relació a la resposta al tractament en pacients amb HC-C

- El percentatge de Tregs augmenta durant el tractament antiviral combinat tant en els pacients amb RVS com en els NR. En canvi, a les 24 setmanes post-tractament, el percentatge de Tregs disminueix en els pacients amb RVS ( $p < 0,05$ ) i es manté elevat en els pacients NR (ns).
- Els pacients NR presenten un percentatge de Tregs superior que els pacients amb RVS en tots els punts estudiats del tractament, essent les diferències significatives a nivell basal ( $p < 0,05$ ) i a les 24 setmanes post-tractament ( $p < 0,05$ ).
- Basalment, els pacients NRP també presenten un percentatge de Tregs superior que els pacients amb RVS, tot i no ser la diferència significativa.

- Els efectes del tractament antiviral combinat són similars entre els pacients amb RVS i els NR en relació a les subpoblacions limfocitàries CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3γδ<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> i en l'expressió de CD81 en els limfòcits B.
- No s'observen diferències en el percentatge de les subpoblacions CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3γδ<sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup> en tots els temps avaluats de l'estudi entre els pacients amb RVS i els NR.
- No s'observen diferències en el percentatge de les subpoblacions CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3γδ<sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup> entre els pacients amb RVS i els NRP abans d'iniciar el tractament antiviral.
- Els pacients NR presenten una expressió més elevada de CD81 en els limfòcits B en comparació amb els pacients amb RVS en tots els temps avaluats durant l'estudi, essent aquesta només significativa abans d'iniciar el tractament ( $p < 0,05$ ).
- Basalment, els pacients NRP també presenten una expressió de CD81 en els limfòcits B superior que els pacients amb RVS, tot i no ser significativa.
- Tant en els pacients amb RVS com en els NR, els patrons de les subpoblacions limfocitàries al llarg del tractament antiviral no estan relacionats amb el tipus de genotip de VHC.

#### 7.4.1.4. Correlació entre la càrrega viral del VHC i les subpoblacions limfocitàries abans d'iniciar el tractament

- S'observa una correlació positiva entre la càrrega viral del VHC i el percentatge de CD4<sup>+</sup> a nivell basal ( $r = 0,361$ ,  $p = 0,039$ ).

- S'observa una correlació negativa entre la càrrega viral del VHC i el percentatge de CD8<sup>+</sup> a nivell basal ( $r = -0,449$ ,  $p = 0,009$ ).
- No s'observa cap correlació entre la càrrega viral del VHC i la resta de subpoblacions limfocitàries (CD3<sup>+</sup>, CD3 $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, expressió de CD81 en els limfòcits B, Tregs) a nivell basal.
- En el model de regressió logística, el principal factor predictor de la resposta al tractament és la càrrega viral de VHC inicial.
- EL percentatge de Tregs ( $p = 0,02$ ) i el grau d'expressió de CD81 en els limfòcits B ( $p = 0,034$ ) en sang perifèrica abans de l'inici del tractament també són factors predictors de la resposta al tractament.

#### 7.4.2. Segon estudi

##### 7.4.2.1. Prevalença i característiques de la tiroïditis induïda per interferó en pacients amb HC-C durant el tractament antiviral combinat amb IFN- $\alpha 2$ apeg i RBV

- S'estudien 120 pacients amb HC-C que inicien tractament antiviral amb IFN- $\alpha 2$ apeg i RBV. D'aquests, 11 pacients desenvolupen TII, sent la prevalença de TII en el nostre estudi del 9,16%.
- Dels 11 pacients que desenvolupen TII, 5 presenten TH, 1 MGB i 5 TD, és a dir, un 54% dels pacients presenta TII autoimmunitària i un 46% TII no autoimmunitària.



- No es relaciona ni la durada del tractament ni la resposta al tractament antiviral amb el desenvolupament de TII.

#### 7.4.2.2. Efectes del tractament antiviral combinat amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV sobre les subpoblacions limfocitàries en relació al desenvolupament o no de tiroïditis induïda per interferó en pacients amb HC-C

- S'observa un augment del percentatge de les Tregs durant el tractament antiviral tant en els pacients HC-C amb TII com en els pacients HC-C control (tots  $p < 0,05$ ). Durant les 24 setmanes post tractament, els pacients HC-C amb TII presenten una disminució del percentatge de Tregs ( $p < 0,05$ ); en canvi els pacients HC-C control no mostren canvis.
- Els pacients HC-C amb TII presenten un percentatge més elevat de Tregs que els pacients HC-C control en tots els punts avaluats de l'estudi, tot i que les diferències només són significatives en el moment d'aparició de la TII ( $p = 0,04$ ).
- S'observa una disminució del percentatge de les subpoblacions limfocitàries de CD3<sup>+</sup>, NKT i CD19<sup>+</sup> durant el tractament antiviral tant en els pacients HC-C amb TII com en els pacients HC-C control (tots  $p < 0,05$ ).
- S'observa un augment del percentatge de la subpoblació CD8<sup>+</sup> durant el tractament antiviral tant en els pacients HC-C amb TII com en els pacients HC-C control (tots  $p < 0,05$ ).
- No s'observen canvis en el percentatge de les subpoblacions limfocitàries CD4<sup>+</sup>, CD3 $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, NK, iNKT, en les respostes Th1 i Th2, i en l'expressió de

Bcl-2 en els limfòcits B durant el tractament antiviral ni en els pacients HC-C amb TII ni en els pacients HC-C control.

- No s'observen diferències en el percentatge de les subpoblacions CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3γδ<sup>+</sup>, NK, NKT, iNKT, CD19<sup>+</sup>, en la resposta Th2 i en l'expressió de Bcl-2 en els limfòcits B en cap dels temps avaluats de l'estudi entre els pacients HC-C amb IIT i els HC-C control.
- Els pacients amb HC-C que desenvolupen TII presenten una resposta Th1 superior als pacients HC-C control en tots els punts avaluats de l'estudi, essent les diferències significatives en el moment de l'aparició de la tiroïditis (p= 0,008).

#### 7.4.2.3. Efectes del tractament antiviral combinat amb IFN-α2apeg i RBV sobre les subpoblacions limfocitàries en relació als diferents tipus de tiroïditis induïda per interferó en pacients amb HC-C

- L'efecte del tractament antiviral en les subpoblacions limfocitàries estudiades és similar, independentment del tipus de TII.
- No es poden comparar les diferents subpoblacions limfocitàries en cadascun dels temps avaluats de l'estudi entre els diferents tipus de TII donat el limitat nombre de pacients que desenvolupen TII.

### 7.4.3. Tercer estudi

#### 7.4.3.1. Prevalença i característiques de la tiroïditis induïda per interferó en pacients amb MM durant el tractament amb altes dosis d'interferó

- S'estudien 30 pacients amb MM d'alt risc que inicien i completen el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b després de la cirurgia. D'aquests, 9 pacients desenvolupen TII, sent la prevalença de TII en pacients amb MM d'aquest estudi del 30%.
- Dels 9 pacients amb MM que desenvolupen TII, 4 presenten TH i 5 TD, és a dir, un 44% dels pacients presenten TII autoimmunitària i un 56% TII no autoimmunitària.

#### 7.4.3.2. Efectes del tractament amb IFN- $\alpha$ 2b sobre les subpoblacions limfocitàries en relació al desenvolupament o no de TII en pacients amb MM

- S'observa un increment del percentatge de Tregs durant el tractament (tots  $p < 0,05$ ) amb un increment posterior durant les 24 setmanes post-tractament (tots  $p < 0,05$ ) tant en el grup MM amb TII com en el MM control,
- Els pacients MM amb TII presenten un percentatge de Tregs superior als MM control en tots els punts avaluats de l'estudi, essent les diferències significatives en el moment de l'aparició de tiroïditis ( $p = 0,012$ ).

- Basalment no s'observen diferències en el percentatge de Tregs entre els pacients MM amb TII, els pacients MM control i els subjectes sans.
- En el moment d'aparició de tiroïditis els pacients MM amb TII presenten un percentatge de Tregs superior respecte als subjectes sans ( $p= 0,004$ ).
- No s'observen diferències en el percentatge de les subpoblacions limfocitàries CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>, NK, iNKT, CD19<sup>+</sup>, cèl·lules B transicionals, la resposta Th1/ Th2 durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b tant en el grup de pacients MM amb TII com en el grup de MM control.
- S'observa una disminució del percentatge de NKT i de l'expressió de Bcl-2 en els limfòcits B durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b en els pacients MM amb TII ( $p < 0,05$ ). Aquests canvis no s'observen en els pacients MM control.
- No s'observen diferències en el percentatge de les subpoblacions CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>, NK, NKT, CD19<sup>+</sup>, cèl·lules B transicionals i en la resposta Th1/Th2 en tots els temps avaluats de l'estudi entre els pacients MM amb TII i els MM control.
- Basalment, no s'observen diferències en el percentatge de totes les subpoblacions limfocitàries estudiades (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK, NKT, iNKT, CD3 $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, cèl·lules B transicionals, Tregs, resposta Th1/ Th2 i l'expressió de Bcl-2 en limfòcits B) entre els pacients MM amb IIT, els MM control i els subjectes sans.

- En el moment d'aparició de la tiroïditis, el grup de subjectes sans presenta un percentatge superior de CD3<sup>+</sup> que el grup MM amb TII (p= 0,001) i el grup MM control (ns). Així mateix el grup de MM control presenta un percentatge de iNKT inferior que el grup MM amb TII (p= 0,011) i el grup de subjectes sans (p= 0,009). Tant el grup MM amb TII (p< 0,001) com el grup amb MM control (p< 0,001) presenten una expressió més baixa de Bcl-2 en els limfòcits B en comparació amb el grup de subjectes sans. El grup MM amb IIT (p= 0,015) i el grup MM control (p= 0,014) presenten un percentatge superior de cèl·lules B transicionals en comparació amb el grup de subjectes sans. En el moment d'aparició de tiroïditis no s'observen diferències en el percentatge de CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3γδ<sup>+</sup>, NK, NKT, CD19<sup>+</sup> i la resposta Th1/Th2 entre els tres grups estudiats.

#### 7.4.3.3. Efectes del tractament amb IFN-α2b sobre les subpoblacions limfocitàries en relació als diferents tipus de TII en pacients amb MM

- L'efecte de l'IFN-α2b en les subpoblacions limfocitàries és similar independentment del tipus de TII.
- No s'observen diferències en les diferents subpoblacions limfocitàries estudiades en tots els temps avaluats de l'estudi entre els pacients amb MM amb diferents tipus de TII.



## 8. DISCUSSIÓ CONJUNTA

La resolució de la infecció pel VHC requereix una interacció complexa i coordinada entre la resposta immunològica innata i adaptativa, però en molts casos aquesta no és eficaç i la infecció pel VHC persisteix i es cronifica. El tractament combinat amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV és eficaç per la HC-C degut a la seva acció immunomoduladora i antiviral, tot i que els mecanismes d'acció concrets no estan plenament establerts. L'objectiu principal del primer dels treballs d'aquesta tesi ha estat realitzar un estudi prospectiu de diferents subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C que inicien el tractament antiviral combinat amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV i avaluar la seva relació amb la resposta al tractament. A més, també s'han volgut identificar factors immunològics basals associats a la resposta al tractament per tal de tenir més coneixements sobre els canvis immunològics que permeten l'eradicació de l'HC-C.

Varis estudis han mostrat diferències entre pacients amb HC-C i subjectes sans pel què fa als limfòcits T, B i cèl·lules NKT en sang perifèrica<sup>(131-134)</sup>, fet que remarca la importància d'aquestes subpoblacions limfocitàries en l'HC-C. En el primer estudi de la tesi, s'ha avaluat la dinàmica de diferents subpoblacions limfocitàries perifèriques durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV i s'ha observat una disminució dels limfòcits T CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup> i dels limfòcits B (CD19<sup>+</sup>) durant el tractament amb un augment a les 24 setmanes després de finalitzar-lo. En canvi, els limfòcits T CD4<sup>+</sup> mostren un patró dinàmic diferent, amb un augment durant el tractament i una disminució posterior. Aquestes troballes són similars a les descrites per altres autors<sup>(132)</sup>, tot i que no s'han confirmat en altres estudis<sup>(130, 131, 135)</sup>. En relació amb la resposta al tractament, no s'han trobat diferències entre els pacients NR i els pacients amb RVS pel què fa a



les subpoblacions de limfòcits T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>) i B (CD19<sup>+</sup>) tant a nivell basal, com durant el tractament i el post-tractament, de forma similar als resultats obtinguts per altres grups de treball<sup>(132)</sup>, fet que ens suggereix que aquests patrons poden ser deguts a l'efecte immunomodulador de l'IFN-α. Per tal d'excloure una possible influència dels pacients que responen i posteriorment recauen durant el tractament, s'han comparat els pacients NRP amb els pacients amb RVS a nivell basal, sense observar-se diferències en les subpoblacions limfocitàries. En relació a la càrrega viral basal, s'ha observat una relació negativa entre aquesta i els limfòcits T CD8<sup>+</sup>. Tot i així, encara que basalment els pacients NR tenen una major càrrega viral que els pacients amb RVS, no s'han observat diferències en els limfòcits T CD8<sup>+</sup> entre els dos grups abans d'iniciar el tractament.

Per altra banda, el CD81 té un paper important en la modulació de la funció immunològica cel·lular. Recentment, s'ha descrit que el CD81 interacciona amb la glicoproteïna E2 del VHC i s'ha suggerit que aquesta interacció pot modificar les respostes immunològiques en pacients amb infecció pel VHC<sup>(143)</sup>. En el primer treball de la tesi, s'han estudiat els efectes del tractament amb IFN-α2a peg i RBV sobre els nivells d'expressió de CD81 en els limfòcits B en sang perifèrica en pacients amb HC-C i la seva relació amb la resposta al tractament. El tractament antiviral combinat augmenta l'expressió de CD81 en els limfòcits B i aquest augment es manté en el post-tractament, no observant-se diferències en la dinàmica segons la resposta al tractament. Kronenberger i col·laboradors<sup>(130)</sup> ja van observar un augment transitori en l'expressió de CD81 durant el tractament antiviral amb una màxima expressió a la setmana 12, sent també les dinàmiques

entre els pacients NR i amb RVS molt similars, fet que recolza els nostres resultats. Tot i així, altres grups de treball descriuen una disminució de l'expressió de CD81 en els limfòcits B en pacients amb RVS i uns nivells invariables en els NR durant el tractament antiviral<sup>(146, 148)</sup>. Els resultats discrepans entre els diferents estudis es podrien explicar per l'ús de les PBMCs de mostres en fresc o criopreservades, l'ús de diferents fenotips per definir els limfòcits B, el diferent nombre de pacients estudiats i les diferents característiques clíniques d'aquests.

Una de les principals troballes d'aquest primer estudi de la tesi ha estat que, a nivell basal, els pacients NR presenten uns nivells d'expressió més alts de CD81 en els limfòcits B en comparació amb els pacients amb RVS. Els pacients NRP, excloent així els pacients amb una resposta virològica inicial, també presenten abans d'iniciar el tractament antiviral una expressió més alta de CD81 en els limfòcits B que els pacients amb RVS, tot i que les diferències no són estadísticament significatives, probablement a causa del limitat nombre de pacients NRP que hi ha a l'estudi, concretament 3. Aquests resultats suggereixen que l'expressió de CD81 en els limfòcits B podria tenir un paper en la resposta al tractament antiviral, tot i que altres estudis no confirmen aquests resultats a nivell basal<sup>(130, 146, 148)</sup>. En aquest primer estudi, també s'ha observat una tendència cap a la correlació positiva entre la càrrega viral inicial i els nivells d'expressió de CD81 en les cèl·lules B a nivell basal, similar a l'observada en altres estudis<sup>(146)</sup>, que es podria explicar per l'alta expressió de CD81 en els limfòcits B en els pacients NR a l'inici de l'estudi.

Les Tregs són una altra subpoblació limfocitària que s'ha estudiat en pacients amb infecció pel VHC. El percentatge de Tregs en sang perifèrica dels pacients amb HC-C és similar<sup>(149, 151)</sup> o superior<sup>(152, 154-158)</sup> en comparació amb els pacients recuperats de la infecció pel VHC o amb individus sans, segons els estudis. No obstant això, la comparació dels resultats dels diferents estudis és complicada a causa de les diferències en els fenotips utilitzats per definir les Tregs. Alguns autors han analitzat cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> total de la població de limfòcits T<sup>(152, 156)</sup> mentre que només un grup reduït d'autors han examinat la subpoblació de Tregs amb el seu marcador més específic, el FoxP3, sent els resultats contradictoris<sup>(149, 151, 155, 157, 158)</sup>. Recentment s'ha descrit que l'expressió de FoxP3 és induïda de forma transitòria per l'activació dels limfòcits CD4<sup>+</sup> en humans<sup>(333)</sup> i aquest fet ha propiciat la recerca de nous marcadors que defineixin de forma més específica la subpoblació de Tregs i que la diferenciïn dels limfòcits CD4<sup>+</sup> activats que també expressen alts nivells de CD25. En aquest sentit, la troballa que les Tregs humanes expressen nivells baixos de receptor de la IL-7 (CD127) o inclús en són negatives, al contrari que altres cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no reguladores, permet una definició més específica del fenotip de les Tregs<sup>(47)</sup>. En aquest sentit, els tres treballs d'aquesta tesi han definit les Tregs com aquelles cèl·lules que presenten el fenotip CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

Aquest primer treball de la tesi ha avaluat l'efecte del tractament antiviral combinat en el percentatge de Tregs en pacients amb HC-C i la relació de les Tregs amb la resposta al tractament. El tractament amb pegIFN- $\alpha$ 2a i RBV augmenta el percentatge de Tregs tant en pacients NR com en pacients amb RVS. Aquest fet es pot explicar pels efectes immunomoduladors del tractament. El

percentatge de Tregs ha estat superior en els pacients NR que en els pacients amb RVS tant a nivell basal com en el post tractament i també superior en els NRP que en els pacients amb RVS a nivell basal, fet que suggereix un possible paper de les Tregs en la resposta al tractament antiviral. Molts pocs estudis han avaluat prèviament l'efecte del tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV sobre les Tregs en pacients amb HC-C<sup>(151, 238, 239)</sup>. Burton i col·laboradors no van evidenciar canvis en les Tregs en sang perifèrica durant el tractament ni diferències en el percentatge de Tregs abans, durant o després de tractament entre pacients amb RVS i pacients sense RVS<sup>(151)</sup>. El grup de treball de Akiyama va obtenir resultats similars al grup de Burton<sup>(238)</sup>. En canvi, Kanto i col·laboradors descriuen un augment del percentatge de Tregs durant el tractament tant en pacients amb RVS com en pacients sense RVS, sent la ratio Tregs/ CD4<sup>+</sup> superior en els pacients amb RVS respecte als sense RVS, tant a la setmana 12 com a la 24 de tractament<sup>(239)</sup>. Aquestes diferències en els resultats es podrien explicar tant per la diferent definició fenotípica de les Tregs utilitzada com per si els estudis estan fets en mostres fresques o criopreservades. Burton i col·laboradors utilitzen, com en el nostre estudi, mostres criopreservades i caracteritzen fenotípicament les Tregs per limfòcits T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> que expressen FoxP3<sup>(151)</sup>, Akiyama i col·laboradors utilitzen mostres fresques i defineixen com a Tregs aquelles cèl·lules que són CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en sang fresca i finalment Kanto i col·laboradors utilitzen PBMCs fresques i defineixen les Tregs com a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> i en un subgrup de pocs pacients com a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>neg</sup>FoxP3<sup>+</sup><sup>(239)</sup>. En canvi, en aquest primer treball de tesi, s'han utilitzat PBMCs criopreservades i s'han definit

les Tregs, tal i com s'ha especificat anteriorment, pel percentatge de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

També s'ha analitzat la correlació entre els nivells basals de Tregs i la càrrega viral basal. Revisant la literatura, els resultats són contradictoris, ja que alguns estudis mostren una correlació positiva<sup>(152)</sup> i altres no mostren cap tipus de correlació<sup>(149, 151)</sup>. En aquest estudi no s'ha trobat cap correlació entre les Tregs i la càrrega viral basal. No obstant això, els pacients NR presentaven una càrrega viral més alta i un major percentatge de Tregs que el grup amb RVS abans d'iniciar el tractament.

Una limitació d'aquest primer treball de la tesi ha estat que els pacients analitzats tenien diferents genotips del VHC i la durada del tractament antiviral combinat diferent, essent 24 o 48 setmanes depenent del genotip del VHC. No obstant això, no hi ha diferències en les proporcions de genotips del VHC entre els dos grups estudiats (NR i pacients SVR), permetent d'aquesta manera la comparació entre grups. A més, s'han analitzat els patrons de les subpoblacions limfocitàries durant el tractament i la seva relació amb la resposta al tractament en dos grups amb genotip del VHC diferent en funció de la durada del tractament antiviral combinada (d'una banda genotips 1 i 4 i de l'altra genotip 2 i 3), trobant resultats similars entre els dos grups.

En resum, els resultats del primer treball de la tesi mostren canvis en les subpoblacions limfocitàries perifèriques durant el tractament antiviral combinat en pacients amb HC-C coincidint amb el concepte de que la immunomodulació no és un fenomen constant i que fluctua amb el tractament<sup>(133)</sup>. D'altra banda, abans d'iniciar el tractament, els pacients NR presenten un percentatge superior

de Tregs i una major expressió de CD81 en els limfòcits B en sang perifèrica que els pacients amb RVS, fet que suggereix que aquests marcadors podrien ser útils com a factors pronòstics immunològics de la resposta al tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV en pacients amb HC-C.

El segon treball d'aquesta tesi avalua les dinàmiques de diferents subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C que desenvolupen TII durant el tractament antiviral amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV, partint d'una població de 120 pacients. D'aquesta població, 11 pacients desenvolupen TII, essent la prevalença del 9,2%, similar a la descrita en altres estudis<sup>(174, 293)</sup>. D'aquests 11 pacients, 5 van presentar TH, 1 MGB i 5 TD, és a dir, un 54% dels pacients va presentar TII autoimmunitària i un 46% TII no autoimmunitària, sent aquestes proporcions similars a les descrites a la literatura<sup>(318)</sup>. La majoria d'aquest 11 pacients desenvolupa la TII durant els primers 6 mesos de tractament, de forma similar a altres estudis<sup>(298)</sup>.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, varis estudis han descrit els efectes de l'IFN- $\alpha$  en el sistema immunitari<sup>(218-220, 223)</sup> i sobre diferents subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C durant el tractament antiviral<sup>(130-133, 135)</sup>. En canvi, hi ha poques dades sobre les subpoblacions limfocitàries relacionades amb el desenvolupament de la TII<sup>(298)</sup>. En aquest segon treball s'han avaluat subpoblacions de la immunitat innata i adaptativa en pacients amb HC-C que desenvolupen TII. No s'han observat diferències en les subpoblacions CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, cèl·lules NK, NKT i iNKT entre els pacients HC-C amb IIT i els HC-C control, probablement a causa dels efectes immunomoduladors de l'IFN- $\alpha$ . L'IFN- $\alpha$  també regula l'expressió de la molècula

antiapoptòtica Bcl-2. Donat que s'ha descrit l'expressió inadequada de Bcl-2 com una causa del desenvolupament d'autoanticossos<sup>(334)</sup>, en aquest segon treball també s'ha valorat l'expressió de Bcl-2 en els limfòcits B, no trobant-se diferències entre els pacients HC-C amb TII i els pacients HC-C control, probablement a causa de l'heterogeneïtat de la TII.

Un dels principals efectes de l'IFN- $\alpha$  sobre el sistema immunològic és l'augment de la toxicitat cel·lular, mitjançant un desequilibri Th1/Th2, augmentant la resposta Th1 i suprimint la Th2<sup>(223, 242)</sup>. Donat que s'ha demostrat un predomini de la resposta Th1 en les malalties autoimmunitàries òrgan-específiques<sup>(335, 336)</sup>, s'ha suggerit que l'autoimmunitat òrgan-específica provocada per l'IFN- $\alpha$ , incloent l'autoimmunitat tiroïdal, podria ser atribuïda a un desequilibri a favor d'una resposta Th1. A més, els efectes immunomoduladors de la RBV també es produeixen mitjançant una resposta Th1<sup>(242)</sup>. Tot i que l'associació de RBV al tractament amb IFN en pacients amb HC-C no modifica el patró d'anticossos antiroïdals, sí que augmenta el risc de desenvolupar hipotiroïdisme<sup>(325)</sup>. En aquest estudi, el tractament antiviral combinat amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV augmenta, encara que no de forma significativa, la resposta Th1 tant en els pacients amb HC-C amb TII com en els pacients HC-C control. Tot i així, els pacients amb HC-C i TII presenten una resposta Th1 superior als pacients HC-C control en tots els punts estudiats, encara que les diferències només són significatives en el moment de l'aparició de TII. D'altra banda, la resposta Th2 no es modifica ni durant el tractament antiviral ni en el post-tractament en cap dels dos grups, a excepció d'un augment de la resposta Th2 durant els primers mesos de tractament en els pacients amb TII, de forma

similar als resultats descrits per Mazziotti i col·laboradors<sup>(298)</sup>, encara que en el nostre estudi s'ha utilitzat una diferent caracterització fenotípica<sup>(337)</sup>.

Una altra subpoblació limfocitària que podria estar implicada en l'aparició de TII són les Tregs ja que varis estudis han mostrat una associació entre la patogènia de malalties autoimmunitàries, entre les que s'inclou la MAT, i les Tregs<sup>(72-74)</sup>. En models animals de diverses malalties autoimmunitàries, el paper de les Tregs s'ha demostrat clarament. Per exemple, en el model de la tiroïditis autoimmunitària experimental (EAT), s'ha demostrat que canvis en la funcionalitat de les Tregs poden influir de forma marcada en la susceptibilitat i/o resistència a la tiroïditis<sup>(69)</sup>. A més, en aquest mateix model, s'ha demostrat que la deplecció de les Tregs permet la inducció de tiroïditis amb tiroglobulina de ratolí tant en els ratolins tradicionalment resistents com en els induïts per tiroglobulina de ratolí i en els genèticament susceptibles<sup>(70, 71)</sup>. No obstant això, en referència al paper de les Tregs en pacients amb TII, a data d'avui, no existeix cap estudi previ a la literatura que avaluï el paper de les Tregs en pacients amb TII. És per aquesta raó, que en aquest segon treball de tesi s'ha volgut també analitzar les Tregs en pacients amb HC-C que desenvolupen TII. En aquest estudi, tant els pacients amb HC-C i TII com els pacients amb HC-C control presenten un augment de les Tregs durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2apeg i RBV i una disminució a les 24 setmanes de finalitzar-lo. Aquesta dinàmica de les Tregs és molt similar a la que presenten els pacients del primer treball de la tesi, fet que suggereix que aquests canvis es poden justificar pels efectes immunomoduladors del tractament antiviral. Cal remarcar, però, que els pacients amb HC-C i TII presenten un percentatge superior de Tregs que els HC-C control durant en tots els punts



avaluats durant el tractament, encara que les diferències només són significatives en el moment de presentar la tiroïditis (TT). Aquests resultats concorden amb els del grup de Marazuela i col·laboradors<sup>(72)</sup>, tot i que no s'han confirmat per altres grups<sup>(73, 74)</sup>, probablement per les diferents definicions fenotípiques de Tregs utilitzades i per l'avaluació dels pacients en diferents estats evolutius de la MAT. Aquests resultats suggereixen que les Tregs en la MAT podrien estar incrementades o en un nombre inadequat però que la seva funció podria ser deficient<sup>(72)</sup>.

L'efecte del tractament antiviral sobre les subpoblacions limfocitàries estudiades és similar, independentment del tipus de TII. Tanmateix, aquests subpoblacions no s'han comparat entre els diferents tipus de TII donat el nombre limitat de pacients estudiats.

Revisant la literatura, les dades en relació a la correlació entre l'aparició d'autoimmunitat tiroïdal i la resposta al tractament antiviral són controvertides<sup>(319, 320)</sup>. En relació a aquest punt, en aquest segon treball el desenvolupament de la TII es relaciona amb la resposta al tractament antiviral.

Una limitació d'aquest segon treball de la tesi és que la durada del tractament antiviral dels pacients inclosos a l'estudi és diferent segons el genotip de VHC que presentaven. Tot i així, no existeixen diferències en les proporcions dels diferents genotips de VHC entre els dos grups estudiats (HC-C TII i HC-C control), permetent així la comparació entre ambdós grups. A més, s'ha analitzat si la durada del tractament s'associa a l'aparició de TII, essent aquesta relació negativa.

En resum, en aquest segon treball es descriuen les dinàmiques de diferents subpoblacions limfocitàries en pacients amb HC-C que desenvolupen TII durant el tractament amb IFN- $\alpha$  i RBV. Els pacients amb TII mostren un augment de la resposta Th1 que els pacients HC-C control, de forma similar a la descrita en altres estudis<sup>(298)</sup>. Aquest és el primer estudi que analitza les Tregs en pacients amb HC-C que desenvolupen TII, mostrant un percentatge superior de Tregs en sang perifèrica en aquests pacients en comparació amb els pacients HC-C control. Encara que el paper exacte de les Tregs en el desenvolupament de TII s'ha d'acabar de determinar, les nostres dades suggereixen que l'increment compensatori de les Tregs no impedeix el desenvolupament de la TII. Seria interessant en un futur estudiar la funcionalitat de les Tregs en aquests pacients.

Donat que s'ha descrit que la pròpia infecció pel VHC és un factor de risc pel desenvolupament de tiroïditis<sup>(185-189, 295)</sup>, en el tercer treball d'aquesta tesi s'ha volgut avaluar les subpoblacions limfocitàries en pacients amb TII que no presentessin infecció pel VHC, com és el cas dels pacients amb MM, per tal d'evitar qualsevol possible interacció de la infecció viral. La TII és una entitat poc avaluada en pacients amb MM<sup>(326-328)</sup> i fins ara, cap estudi ha analitzat la resposta del sistema immunitari en els pacients amb MM que desenvolupen TII durant el tractament amb IFN-a2b. El tercer treball de la tesi és un estudi prospectiu on s'avalua la dinàmica de diferents subpoblacions limfocitàries en 9 pacients amb MM que desenvolupen TII a partir d'una població estudiada de 30 pacients amb MM que completen el tractament amb HDI. En aquest estudi, la prevalença de TII és del 30%, similar a la descrita en estudis previs, que oscil·la entre el 14,9 i el 37,8%<sup>(326-328)</sup>. D'aquests 9 pacients amb MM que desenvolupen TII, 4 presenten

TH i 5 TD, és a dir, un 44% dels pacients presenten TII autoimmunitària i un 56% TII no autoimmunitària, en una proporció comparable als pacients amb HC-C i TII del segon treball d'aquesta tesi. Així mateix, la majoria dels pacients també desenvolupen TII durant els 6 primers mesos de tractament.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, diversos estudis associen alteracions de les Tregs amb la patogènia de la MAT<sup>(72-74)</sup>. No obstant això, revisant la literatura, no consta cap estudi que hagi valorat el paper de les Tregs en pacients amb MM que desenvolupen TII durant el tractament amb IFN. En el nostre estudi, tant els pacients amb MM i TII com els pacients MM control presenten un patró similar, amb un augment de les Tregs durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b i una disminució a les 24 setmanes de finalitzar-lo. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el segon treball d'aquesta tesi, on s'avaluen pacients amb HC-C que desenvolupen TII i pacients HC-C control, i es podrien explicar pels efectes immunomoduladors de l'IFN- $\alpha$ . Tot i així, aquests resultats no concorden amb els descrits per Ascierro i col·laboradors<sup>(263)</sup> ni per Mozzillo i col·laboradors<sup>(264)</sup>, on les Tregs presenten una tendència a disminuir durant el tractament. Les diferències entre els estudis es podrien explicar per la diferent caracterització fenotípica de les Tregs utilitzada i pel fet que tant els estudis de Tregs del treball d'Ascierro i col·laboradors com els del treball de Mozzillo i col·laboradors es realitzen només durant la fase d'inducció endovenosa d'IFN- $\alpha$ 2b mentre que en el nostre treball, els estudis de les subpoblacions limfocitàries s'han realitzat durant les 48 setmanes de tractament i posteriorment a les 24 setmanes d'haver-lo finalitzat.

Varis estudis han mostrat un augment de Tregs en sang perifèrica en pacients amb MM en comparació amb controls sans<sup>(259-264)</sup> però en aquest treball, no s'observen diferències significatives entre els pacients MM amb TII, els MM control i els subjectes sans a nivell basal, probablement degut al limitat nombre de pacients estudiats. Els pacients amb MM que desenvolupen TII presenten un percentatge superior de Tregs que els pacients MM control al llarg de tot l'estudi, tot i que les diferències només són significatives en el moment de l'aparició de TII (TT). Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en el segon treball d'aquesta tesi on s'avaluen pacients amb HC-C que desenvolupen TII i amb l'augment de les Tregs en la MAT observat per alguns autors<sup>(72)</sup>, tot i que no s'ha confirmat per altres<sup>(73, 74)</sup>. Tot i així, aquests resultats juntament amb els obtinguts en el segon treball suggereixen que l'augment compensatori de les Tregs no impedeix el desenvolupament de la TII, probablement degut a una funcionalitat deficient.

Els efectes de l'IFN $\alpha$ 2b sobre el sistema immunològic, concretament sobre diferents subpoblacions limfocitàries, en pacients amb MM s'han avaluat en diferents estudis<sup>(273, 277, 278, 280)</sup> però actualment no existeixen dades sobre la dinàmiques de diferents subpoblacions limfocitàries relacionades amb pacients amb MM que desenvolupen TII. El tercer treball d'aquesta tesi és el primer estudi que avalua les dinàmiques de subpoblacions de la immunitat innata i adaptativa en aquest tipus de pacients. Durant el tractament, no s'han observat diferències en les subpoblacions CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, NK, NKT, el patró Th1/Th2, els limfòcits B o les cèl·lules transicionals entre pacients amb MM i TII i els MM control, probablement pels efectes immunomoduladors de l'IFN- $\alpha$ . En aquest

tercer treball també s'ha valorat l'expressió de la molècula antiapoptòtica Bcl-2 en limfòcits B ja que s'ha relacionat una alteració d'aquesta amb l'aparició d'autoanticossos, no trobant diferències entre els pacient amb MM i TII i els pacients MM control, probablement a causa de l'heterogeneïtat de la TII.

Per altra banda, s'han descrit resultats contradictoris pel què fa al paper de les iNKT en la patogènia de les malalties autoimmunitàries<sup>(338, 339)</sup>. En aquest treball només s'han trobat diferències en el moment d'aparició de la tiroïditis, concretament, tant els pacients amb MM i TII com els controls sans presentaven un percentatge superior de iNKT respecte els pacients MM control.

Les cèl·lules B transicionals són una altra subpoblació limfocitària que s'ha relacionat amb el desenvolupament de l'autoimmunitat. Estudis recents en humans han suggerit que les malalties autoimmunitàries poden tenir una relaxació de la selecció negativa i positiva, expandint-se així les cèl·lules B transicionals i permetent un augment de l'autoreactivitat en el compartiment madur *naïve*<sup>(106-108)</sup>. En el nostre estudi, tant els pacients amb MM i TII com els pacients MM control presenten un percentatge superior de cèl·lules B transicionals en comparació amb els subjectes sans en el moment de l'aparició de la TII (TT). Per tant, l'augment observat en aquesta subpoblació, podria estar més relacionat amb l'efecte immunomodulador del tractament amb IFN- $\alpha$  que per la inducció de TII.

L'efecte de l'IFN- $\alpha$ 2b en les subpoblacions limfocitàries és similar independentment del tipus de TII, probablement per l'efecte del tractament amb IFN en la modulació del comportament de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica.

En resum, en aquest tercer treball de la tesi es descriuen les diferents dinàmiques de les subpoblacions limfocitàries perifèriques en pacients amb MM que desenvolupen TII durant el tractament amb altes dosis d' IFN- $\alpha$ 2b deguts als efectes immunomoduladors de l'IFN. Els pacients amb MM i TII presenten un percentatge major de Tregs durant tot el tractament que els MM control, de forma més marcada en el moment de l'aparició de la TII, de forma similar als pacients amb HC-C que també desenvolupen TII del segon treball. Les nostres dades suggereixen que l'augment compensatori de les Tregs no impedeix el desenvolupament de la TII. Probablement es requeriran més estudis per millorar la comprensió del paper de les Tregs en la patogènesi de la TII.

En relació a tots els estudis de les Tregs realitzats en els tres treballs d'aquesta tesi doctoral, es podria criticar la manca d'assajos funcionals. Tot i així, cal remarcar que els estudis s'han realitzat amb cèl·lules criopreservades i per tant, no s'han inclòs assajos funcionals i de proliferació a causa de les limitacions inherents d'aquesta tècnica, en particular amb les PBMCs criopreservades/descongelades. A més, encara que hagi estat possible una clara demostració de la funcionalitat de les Tregs en models experimentals, és molt difícil trobar evidències similars en humans a causa de les diferents caracteritzacions fenotípiques de les Tregs utilitzades, de la manca d'estandardització del estudis funcionals *ex vivo* en Tregs i que la seva correlació amb la funció *in vivo* no s'ha establert completament<sup>(340)</sup>.

Tant en el segon com en el tercer treball, que són on s'avalua la TII en pacients amb HC-C i pacients amb MM respectivament, hauria estat interessant haver realitzat l'avaluació de les subpoblacions limfocitàries en teixit tiroïdal i

comparar-les amb les de sang perifèrica. La raó per la que aquest tipus d'estudi no s'ha realitzat és que cap pacient amb TII ha presentat goll i per tant, no s'ha realitzat una punció tiroïdal amb agulla fina. Aquest punt representa una limitació de l'estudi ja que la distribució de les subpoblacions limfocitàries no sempre reflecteix les condicions del teixit. En aquest sentit, s'ha descrit que l'IFN- $\alpha$  pot induir l'autoimmunitat específica de teixit tant per mecanismes de reclutament immunològic com per efectes tòxics directes al teixit<sup>(302)</sup>. A nivell tiroïdal, s'ha demostrat que la primera via implicada és la de la inducció de citocines i quimiocines Th1, com ara el CXCL10, des de les cèl·lules fol·liculars tiroïdals i que mitjançant el reclutament de cèl·lules citotòxiques, indueix la mort cel·lular autoimmunitària<sup>(302, 341)</sup>. A més, l'observació de la mort de cèl·lules tiroïdals amb IFN tant *in vivo* com *in vitro*<sup>(301, 302)</sup> suggereix una toxicitat tiroïdal directa i independent. Probablement es requereixen més estudis per aclarir el paper exacte de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica en pacients amb TII i si poden ser un indicador fiable del paper del sistema immunològic a nivell tiroïdal.

Un altre punt feble del segon i tercer treball és el nombre limitat de pacients avaluats, però cal tenir en compte la dificultat d'obtenir pacients d'aquest tipus en estudis prospectius d'aquesta naturalesa ja que s'estudia un nombre de pacients i es preveu que un percentatge acabarà desenvolupant TII, fet que pot ocórrer o no. En aquest cas, la prevalença de TII tant en pacients amb HC-C (9,2%) com en pacients amb MM (30%) és similar a la descrita amb altres sèries, però la seva heterogeneïtat no ha permès comparar les subpoblacions limfocitàries entre els diferents tipus de TII.





## 9. CONCLUSIONS

- Els canvis en les subpoblacions limfocitàries durant el tractament amb pegIFN- $\alpha$ 2a i RBV en pacients amb HC-C, independentment de la resposta al tractament, poden ser deguts als efectes immunomoduladors del tractament antiviral.
- L'alta expressió de CD81 en els limfòcits B a nivell basal podria ser un factor predictiu d'una mala resposta al tractament amb pegIFN- $\alpha$ 2a i RBV en pacients amb HC-C.
- L'alt percentatge de Tregs a nivell basal podria ser un factor predictiu d'una mala resposta al tractament amb pegIFN- $\alpha$ 2a i RBV en pacients amb HC-C.
- La dosi i el tipus d'IFN utilitzat pel tractament de la HC-C així com pel tractament del MM no influeix en el tipus de TII.
- Els canvis en les subpoblacions limfocitàries durant el tractament amb pegIFN- $\alpha$ 2a i RBV en pacients amb HC-C, independentment de l'aparició o no de TII, poden ser deguts als efectes immunomoduladors del tractament antiviral.
- Els canvis en les subpoblacions limfocitàries durant el tractament amb IFN- $\alpha$ 2b en pacients amb MM, independentment al desenvolupament o no de TII, poden ser deguts als efectes immunomoduladors del tractament.

- Els pacients amb HC-C que desenvolupen TII presenten una major resposta de tipus Th1 que els pacients HC-C control. Aquest fet podria estar implicat en l'aparició de TII ja que són coneguts els efectes afavoridors de la resposta tipus Th1 tant per part de l'IFN- $\alpha$  com de la RBV.
- Tant els pacients amb HC-C i TII com els pacients amb MM i TII presenten un major percentatge de Tregs que els seus respectius controls en el moment de l'aparició de la TII. Per tant, l'augment compensatori de les Tregs no és capaç d'evitar el desenvolupament de la TII en aquests pacients, probablement degut a una funcionalitat deficient d'aquestes cèl·lules.



## **10. BIBLIOGRAFIA**

1. Wang SH, Baker Jr JR. The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. *Thyroid*. 2007; 17: 975-979.
2. Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 195-204.
3. Fountoulakis S, Tsatsoulis A. On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. *Clin Endocrinol*. 2004; 60: 397-409.
4. Ruwhof C, Drexhage A. Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. *Thyroid*. 2001; 11: 427-436.
5. Jacobson EM, Huber A, Tomer Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to biology. *J Autoimm*. 2008; 30: 58-62.
6. Ban Y, Davies TG, Greenberg DA, Concepcion ES, Osman R, Oashi T, Tomer Y. Arginine at position 74 of the HLA-DRb1 chain is associated with Graves' disease. *Genes Immun*. 2004; 5: 203-208.
7. Menconi F, Monti MC, Greenberg DA, Osman R, Davies TF, Ban Y, Jacobson EM, Concepcion ES, Li CW, Tomer Y. Molecular amino acid signatures in the MHC class II peptide-binding pocket predispose to autoimmune thyroiditis in humans and mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 14034-14039.
8. Petrone A, Giorgi G, Mesturino CA, Capizzi M, Cascino I, Nistico L, Osborn J, Di Mario U, Buzzetti R. Association of DRB1\*04-DQB1\*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. *Thyroid* 2001; 11: 171-175.
9. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 1997; 46: 551-554.
10. Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, Concepcion E, Davies TF. CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1687-1693.
11. Zaletel K, Krhin B, Gaberscek S, Hojker S. Thyroid autoantibody production is influenced by exon 1 and promoter CTLA-4 polymorphisms in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Int J Immunogenet*. 2006; 33: 87-91.
12. Vieland VJ, Huang Y, Bartlett C, Davies TF, Tomer Y. A multilocus model of the genetic architecture of autoimmune thyroid disorder, with clinical implications. *Am J Hum Genet*. 2008; 82: 1349-1356.
13. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA. A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid*. 2002; 12: 1129-1135.
14. Kurylowicz A, Kula D, Ploski R, Skorka A, Jurecka-Lubieniecka B, Zebracka J, Steinhof-Radwanska K, Hasse-Lazar K, Hiromatsu Y, Jarzab B, Bednarczyk T.

- Association of CD40 gene polymorphysm (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. *Thyroid*. 2005; 15: 1119-1124.
15. Elaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, Ball SG, James RA, Quinton R, Perros P, Pearce SH. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 5862-5865.
  16. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, Moser KL, Begovich AB, Carlton VE, Li W, Lee AT, Ortmann W, Behrens TW, Gregersen PK. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620 W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2005; 76: 561-571.
  17. Tomer Y, Greenberg DA, Concepcion E, Ban Y, Davies TF. Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 404-407.
  18. Hsiao JY, Hsieh MC, Tien KJ, Hsu SC, Lin SR, Ke DS. Exon 33 T7T genotype of the thyroglobulin gene is a susceptibility gene for graves' disease in Taiwanese and exon 12 C/C genotype protects against it. *Clin Exp Med*. 2008; 8: 17-21.
  19. Dechairo BM, Zabaneh D, Collins J, Brand O, Dawson GJ, Green AP, Mackay I, Franklyn JA, Connell JM, Wass JA, Wiersinga WM, Hegedus L, Brix T, Robinson BG, Hunt PJ, Weetman AP, Carey AH, Gough SC. Association of the TSHR gene with graves' disease: the first disease specific locus. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13: 1223-1230.
  20. Yin X, Latif R, Bahn R, Tomer Y, Davies TF. Influence of the TSH receptor gene on susceptibility to Graves' disease and Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*. 2008; 18: 1201-1206.
  21. Hansen PS, Brix TH, Iachin I, Kyvik KO, Hegedüs L. The relative importance of genetic and environmental effects for the early stages of thyroid autoimmunity: a study of healthy Danish twins, *Eur J Endocrinol*. 2006; 154: 29-38.
  22. Brent GA. Environmental exposures and autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2010; 20 : 755-761.
  23. Weetman AP. Autoimmunity and endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999; 107: S63-S66.
  24. Prummel MF, Streider T, Wiersinga WM. The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol*. 2004; 150: 605-618.
  25. Murphy K. *Janeway's Immunobiology* 8th Edition. 2012. New York and Abingdon. Garland Science.
  26. André I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 2260-2263.

27. Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell*. 2007; 130: 25-35.
28. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science*. 1990; 248: 1342-1347.
29. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 305-334.
30. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1166-1176.
31. Pujol Borrell R, Sabater Baudet L. El timó: vieja glándula, nuevas ideas. *Med Clin*. 2003; 120: 216-218.
32. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 139-176.
33. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol*. 1990; 2: 3-12.
34. Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2005; 204: 195-207.
35. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995; 155: 1151-1164.
36. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh Morse SS, Sakaguchi N. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: Its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 1996; 9: 211-220.
37. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory T cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001; 167: 1245-1253.
38. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2004; 16: 89-98.
39. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*. 2007; 8: 359-68.
40. Bennett CL, Christies J, Ramsdell F, Brunlow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Salusbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001; 27: 20-21.
41. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*. 2002; 39: 537-545.



42. d’Hennezel E, Ben-Shoshan M, Ochs HD, Torgerson TR, Russell LJ, Lejtenyi C, Noya FJ, Jabado N, Mazer B, Piccirillo CA. FOXP3 forkhead domain mutation and regulatory T cells in the IPEX syndrome. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1710-1713.
43. Beccetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Mathes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, Roncalo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1713-1722.
44. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induced a scurfy-like disease. *J Exp Med.* 2007; 204: 57-63.
45. Serrano-Hernández A. Células colaboradoras (TH1, TH2m TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica.* 2009; 5(S1): 1-5.
46. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Tregs cells. *J Exp Med.* 2006; 203: 1701-1711.
47. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zauders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006; 203: 1693-1700.
48. Klein S, Kretz CC, Krammwe OH, Kuhn A. CD127 (low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory-Tcell populations in human peripheral blood. *J Invest Dermatol.* 2010; 130: 492-499.
49. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunologic self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002; 3: 135-142.
50. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science.* 2007; 317: 627-629.
51. Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS ONE.* 2008; 3: e1612.
52. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3 regulatory cells. *J Immunol.* 2010; 184: 3433-3441.
53. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299: 1057-1061.
54. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol.* 2009; 21: 1105-1111.

55. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10: 549-859.
56. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, Haller M, Rockell J, Gottlieb P, Clare-Salzler M, Atkinson M. No alterations in the frequency of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007; 56: 604-612.
57. Feger U, Luther C, Poeschel S, Melms A, Tolosa E, Wiendl H. Increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*. 2007; 147: 418-418.
58. Suen J, Li HT, Jong YJ, Chiang BL, Yen JH. Altered homeostasis of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology*. 2009; 127: 196-205.
59. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2005; 128: 1868-1878.
60. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008; 253: 92-101.
61. Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 215-223.
62. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66: 2603-2622.
63. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Adorini L. Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J Immunol*. 2003; 171: 4040-4047.
64. D'Alise AM, Auyeung V, Feuerer M, Nishio J, Fontenot J, Benoist C, Mathis D. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 19857-19862.
65. Clough LE, Wang CJ, Schmidt EM, Booth G, Hou TZ, Ryan GA, Walker LS. Release from regulatory T cell-mediated suppression during the onset of tissue-specific autoimmunity is associated with elevated IL-21. *J Immunol*. 2008; 180: 5393-5401.
66. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*. 2007; 13: 423-431.

67. Monk CR, Spachidou M, Rovis F, Leung E, Botto M, Lechler RI, Garden OA. MRL/Mp CD4<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup> T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> regulatory T cells *Kin vitro*: a defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1180-1184.
68. Walker LS. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology.* 2009; 126: 466-474.
69. Kong YC, Morris GP, Brown NK, Yan Y, Flynn JC, David CS. Autoimmune thyroiditis: a model uniquely suited to probe regulatory T cell function. *J Autoimmun.* 2009; 33: 239-246.
70. Morris GP, Brown NK, Kong YC. Naturally- existing CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells are required for tolerance to experimental autoimmune thyroiditis induced by either exogenous or endogenous autoantigen. *J Autoimmun.* 2009; 33: 68-76.
71. Lewis M, Grialdo AA, Kong YC. Resistance to experimental autoimmune thyroiditis induced by physiologic manipulation of thyroglobulin level. *Clin Immunol Immunopath.* 1987; 45: 92-104.
72. Marazuela M, García-López MA, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sánchez B, Monsiváis-Urenda A, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 3639-3646.
73. Nakano A, Watanabe M, Iida T, Kuroda S, Matsuzuka F, Miyauchi A, Iwatani Y. Apoptosis-induced decrease of intrathyroid CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid.* 2007; 17: 25-31.
74. Pan D, Shin YH, Gopalakrishnan G, Hennessey J, De Groot LJ. Regulatory T cells in Graves' disease. *Clin Endocrinol.* 2009; 71: 587-593.
75. Sevach EM. From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.* 2006; 25: 195-201.
76. Tsai S, Clemente-Casares X, Santamaria P. CD8<sup>+</sup> Tregs in autoimmunity: learning "self"-control from experience. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68: 3781-3795.
77. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suci-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(s) cells: The crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002; 3: 237-243.
78. Matsuda JL, Mallewaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 358-368.
79. Mauri C, Ehrenstein MR. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 2008; 29: 34-40.

80. Tischner D, Woess C, Ottina E, Villunger A. Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e48.
81. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science.* 1997; 275: 960-963.
82. Giordano C, Richiusa P, Bagnasco M, Pizzolanti G, Di Blasi F, Sbriglia MS, Mattina A, Pesce G, Montagna P, Capone F, Misiano G, Scorsone A, Pugliese A, Galluzzo A. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 2001; 11: 233-244.
83. Baker JR Jr. Autoimmune endocrine disease. *JAMA.* 1997; 278: 1931-1937.
84. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity.* 1995; 20: 231-236.
85. Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, Hayakawa N, Ota Z. Apoptosis in thyroid disease: a histochemical study. *Endocr J.* 1995; 42: 193-201.
86. Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* 2004; 25: 323-327.
87. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T lymphocyte subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996; 17: 138-146.
88. Blüher M, Krohn K, Wallaschofski H, Braverman LE, Paschke R. Cytokine gene expression in autoimmune thyroiditis in Bio-Breeding/Worcester rats. *Thyroid.* 1999; 9: 1049-1055.
89. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996; 383: 787-793.
90. Lanzavecchia A, Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol.* 2001; 2: 487-492.
91. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol.* 2000; 156: 6107-6115
92. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19: 652-657.
93. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 2007; 51: 1139-1147.
94. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007; 8: 1390-1397.

95. Gakewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. *Immunol Rev.* 1989; 111: 79-110.
96. Roura-Mir C, Catálfamo M, Sospedra M, Alcalde L, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D. Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur J Immunol.* 1997; 27: 3290-3302.
97. Stassi G, Di Liberto D, Todaro M, Zeuner A, Ricci-Vitiani L, Stoppacciaro A, Ruco L, Farina F, Zummo G, De Maria R. Control of target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nat Immunol.* 2000; 1:483-488.
98. Kawakami A, Matsuoka N, Tsuboi M, Koji T, Urayama S, Sera N, Hida A, Usa T, Kimura H, Yokoyama N, Nakashima T, Ishikawa N, Ito K, Kawabe Y, Eguchi K. CD4+ T cell-mediated cytotoxicity toward thyrocytes: the importance of Fas/fas ligand interaction inducing apoptosis of thyrocytes and the inhibitory effect of thyroid-stimulating hormone. *Lab Invest.* 2000; 80: 471-484.
99. Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades CS, Koutras DA, Chrousos GP. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12: 384-390.
100. Nagayama Y, Mizuguchi H, Hayakawa T, Niwa M, McLachlan SM, Rapoport B. Prevention of auto-antibody-mediated Graves'like hyperthyroidism in mice with IL-4, a Th2 cytokine. *J Immunol.* 2003; 170: 3522-3527.
101. Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, Benedicto I, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela M. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 953-962.
102. Wang K, Wei G and Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol.* 2012; 1: 36.
103. Mills DM, Stolpa JC, Cambier JC. Modulation of MHC class II signal transduction by CD19. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 596: 139-148.
104. Lee J, Kuchen S, Fisher R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5(+) pre-naïve B cell population. *J Immunol.* 2009; 182: 4116-4126.
105. Carsetti R, Kohler G and Lamers MC. Transitional V cells are the target for negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med.* 1995; 181: 2129-2140.
106. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E and Bussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science.* 2003; 301: 1374-1377.
107. Sims GP, Ettiger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG and Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 2005; 105: 4390-4398.

108. Cuss A,K, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ and Tangye SG. *J Immunol.* 2006; 176: 1506-1516.
109. Carsetti R, Rosado MM, Wardemann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004. 197; 179-191.
110. Voorby HA, Kabel PJ, de Haan M, Jeucken PH, van der Gaag RD, de Baets MH, Drexhage HA. Dendritic cells and class II MHC expression in thyrocytes during autoimmune thyroid disease of the BB rat. *Clin Immunol Immunopath.* 1990; 55: 9-22.
111. Bellentani W, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lessons from the Dionysos study. *J Hepatol.* 2001; 75: 531-537.
112. Davis MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 2009; 49: 1335-1374.
113. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Juhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 705-714.
114. Wang CC, Krantz E, Klarquist J, Krows M, McBride L, Scott EP, Shaw-Stiffel T, Weston SJ, Thiede H, Wald A, Rosen HR. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. *J Infect Dis.* 2007; 196: 1474-1482.
115. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 2451-2455.
116. Voisset C, Dubuisson K. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell.* 2004; 96 (6): 413-420.
117. Layden TJ, Mika B, Wiley TE. Hepatitis C kinetics mathematical modelling of viral response to therapy. *Sem Liver Dis.* 2000; 20: 173-183.
118. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C virus dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- $\alpha$  therapy. *Science.* 1998; 282: 103-107.
119. Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther.* 2005; 10: 1-11.
120. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.* 2004; 85:3173-3188.
121. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 2009; 49: 1335-1374.
122. Recanelli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when the silence is deception. *Trends Immunol.* 2003; 24: 456-464.

123. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2006; 69: 129–141.
124. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001; 194: 1395-1406.
125. Diepolder HM. New insights into the immunopathogenesis of chronic hepatitis C. *Antiviral Res.* 2009; 82: 103–109.
126. Guidotti IG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptative immune response. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 65-91.
127. Wedemeyer H, He X, Nadscimbeni M, Davis A, greenberg H, Hoofnagle J et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2002; 75: 5550-5558.
128. Brooks D, Teyton L, Oldstone M, McGraven D. Intrinsic functional dysregulation loss of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol.* 2005; 41: 10514-10527.
129. Cramp ME, Carucci P, Rossol S, Chokshi S, Maertens G, Williams R, et al. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia. *Gut.* 1999; 44: 424–429.
130. Kronenberger B, Herrmann E, Hofmann WP, Wedemeyer H, Sester M, Mihm U, Ghaliati T, Zeuzem S, Sarrazin C. Dynamics of CD81 expression on lymphocyte subsets during interferon- $\alpha$ -based antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Leukoc Biol.* 2006; 80 (298): 298-308.
131. Marinho RT, Pinto RM, Santos ML, de Moura MC. Lymphocyte T helper-specific reactivity in sustained responders to interferon and ribavirin with negativization (seroconversion) of anti-hepatitis C virus. *Liver Int.* 2004; 24: 413–418.
132. Trapero-Marugán M, García-Buey L, Muñoz C, Quintana NE, Moreno-Monteagudo JA, Borque MJ, Fernández MJ, Salvanés FR, Medina J, Moreno-Otero R. Sustained virological response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C genotype 1 patients associated a persistent Th1 immune response. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 24(1): 117–128.
133. Barnes E, Harcourt G, Brown D, Lucas M, Phillips R, Dusheiko G, Klenerman P. The dynamics of T-lymphocyte responses during combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2002; 36(3): 743–754.
134. Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, Ha C, Jacobson IM, Talal AH. CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol.* 2004; 137(2): 408–416.
135. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J. Immunological response in chronic hepatitis C virus infection during interferon alpha therapy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51(58): 1088–1092.

136. He X, Rehermann B, Lopez-Labrador F, Boisvert J, Cheung R, Mumm J et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in periphery blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 5692-5697.
137. Crispe I. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 51-62.
138. Koziel M. Influence of HIV co-infection on hepatitis C immunopathogenesis. *J Hepatol*. 2006; 44: S14-S18.
139. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski J, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*. 2001; 120: 512-524.
140. Sarobe P, Lasarte J, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I et al. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol*. 2003; 77: 10862-71.
141. Tseng C, Kimpel G. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med*. 2002; 195: 43-49.
142. Piccoli D, Sbrana S, Melandri E, Valiente N. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med*. 2002; 195: 335-341.
143. Martin F, Roth DM, Jans DA, Pouton CW, Partridge LJ, Monk PN, Moseley GW. Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology. *J Virol*. 2005; 79: 10839-10851.
144. Fearon DT, Carter RH. The Cd19/CR2/TAPA.1 complex of B lymphocytes: linking natural acquired immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 127-149.
145. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998; 282: 938-941.
146. Zuckerman E. Expansion of CD5 B-cell overexpression CD81 in HCV infection: towards better understanding the link between HCV infection, B-cell activation and lymphoproliferation. *J Hepatol*. 2003; 38: 674-677.
147. Chang LL, Cheng PN, Chel JS, Young KC. CD81 down-regulation on B cells is associated with the response to interferon-alpha-based treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res*. 2007; 75: 43-51.
148. Kronenberger B, Rüster B, Elez R, Weber S, Piiper A, Lee JH, Roth WK, Zeuzem S. Interferon alpha down-regulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: 1518-1526.
149. Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, Burton JR Jr, Tester IA, Wang CC, et al. Functional suppression by FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2008; 197: 46-57.



150. Alatrakchi N, Koziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. *J Viral Hepat.* 2009; 16: 223-229.
151. Burton JR Jr, Klarquist J, Im K, Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Castelblanco N, Terrault N, Rosen HR; Virahep-C Study Group. Prospective analysis of effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in chronic HCV patients undergoing combination antiviral therapy. *J Hepatol.* 2008; 49: 329-338.
152. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2004; 40: 1062-1071.
153. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, Alexander GJ. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005 ; 79: 7852-7859.
154. Bolacchi F, Sinistro A, Ciapriani C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, Drapeau CM, Rocchi G, Bergamini A. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell response in HCV- infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol.* 2006; 144: 188-196.
155. Li S, Jones KL, Woollard DJ, Dromey J, Paukovics G, Plebanski M, Gowans EJ. Defining target antigens for CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>IFN-gamma<sup>-</sup> regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85: 197-204.
156. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsäcker F, Thimme R. T cells with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005; 79: 7860-7867.
157. Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, Price DA, Gostick E, Levine BL, Tobias J, Kwok WW, Chang KM. Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2008; 82: 5043-5053.
158. Tseng KC, Ho YC, Hsieh YH, Lai NS, Wen ZH, Li C, Wu SF. Elevated frequency and function of regulatory T cells in patients with active chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 823-833.
159. Bertoletti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology.* 2003; 38: 4-13.
160. Rallón NI, Soriano V, Benito JM. Respuesta inmunitaria celular adaptativa frente a la infección por el virus de la hepatitis C. *Med Clin.* 2007; 129: 469-479.
161. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001; 345: 41-52.
162. Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med.* 1996; 335: 631-634.

163. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 75: 531-537.
164. Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology*. 2008; 48: 418-431.
165. Foster GR, Goldin RD, Thomas HC. Chronic hepatitis C virus infection causes a significant reduction in quality of life in the absence of cirrhosis. *Hepatology*. 1998; 27: 209-212.
166. Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin. Liver Dis.* 2004; 24: 3-8.
167. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*. 1997; 112: 463-472.
168. Sansonno D, Carbone A, De Re V, Dammacco F. Hepatitis C virus infection, cryoglobulinaemia, and beyond. *Rheumatology* 2007; 46: 572-578.
169. Ferri C, Antonelli A, Mascia MT, Sebastiani M, Fallahi P, Ferrari D, Pileri SA, Zignego AL. HCV-related autoimmune and neoplastic disorders: the HCV syndrome. *Dig Liver Dis* 2007; 39: S13-S21.
170. Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 2006; 44: 15-22.
171. Himoto T, Masaki T. Extrahepatic manifestations and autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 871401.
172. Hadziyannis SJ. Nonhepatic manifestations and combined diseases in HCV infection. *Dig Dis Sci*. 1996; 41: 63s-74s.
173. Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol*. 2004; 40: 341-352.
174. Tomer Y, Blackard JT, Akeno N. Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007; 36: 1051-1066.
175. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, Yamamoto AM, Camproux AC, Hausfater P, Musset L, Veyssier P, Raguin G, Piette JC. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: a prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Médecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hépatite C. *Medicine*. 2000; 79: 47-56.
176. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, Opolon P. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 2204-2212.

177. Stefanova-Petrova DV, Tzvetanska AH, Naumova EJ, Mihailova AP, Hadjiev EA, Dikova RP, Vukov MI, Tchernev KG. Chronic hepatitis C virus infection: prevalence of extrahepatic manifestations and association with cryoglob-ulinemia in Bulgarian patients. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 6518–6528.
178. Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Luttig B, Manns M, Bonkovsky HL. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1995; 21: 613–619.
179. Muratori P, Muratori L, Guidi M, Granito A, Susca M, Lenzi M, Bianchi FB. Clinical impact of non-organ-specific autoantibodies on response to combined antiviral treatment in patients with hepatitis C. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 501–507.
180. Pallazi C, Buskila D, Angelo SD, Amico SE, Olivieri I. Autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: pitfalls for the diagnosis of rheumatic diseases. *Autoimm Rev*; 2012; 11: 659–663.
181. Himoto T, Nishioka M. Autoantibodies in hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Hepatitis Monthly*. 2008; 8: 295–303.
182. Tomer Y, Davies TF. Infection, thyroid disease and autoimmunity. *Endocr Rev*. 1993; 14: 107–120.
183. Antonelli A, Clodoveo F, Ferrari SM, Colaci M, Fallahi P. Immunopathogenesis of HCV-related endocrine manifestations in chronic hepatitis and mixed cryoglobulinemia. *Autoimm Rev*. 2008; 8: 18-23.
184. Tomer Y, Villanueva R. Hepatitis C and thyroid autoimmunity: is there a link? *Am J Med*. 2004; 117: 60–61.
185. Tran A, Quaranta JF, Benzaken S, Thiers V, Chau HT, Hastier P, Regnier D, Dreyfus G, Pradier C, Sadoul JL. High prevalence of thyroid autoantibodies in a prospective series of patients with chronic hepatitis C before interferon therapy. *Hepatology*. 1993; 18: 253–257.
186. Ganne-Carrie N, Medini A, Coderc E, Seror O, Christidis C, Grimbert S, Trinchet JC, Beaugrand M. Latent autoimmune thyroiditis in untreated patients with HCV chronic hepatitis: a case-control study. *J Autoimmun*. 2000; 14: 189–193.
187. Fernandez-Soto L, Gonzalez A, Escobar-Jimenez F, Vazquez R, Ocete E, Olea N, Salmeron J. Increased risk of autoimmune thyroid disease in hepatitis C vs hepatitis B before, during, and after discontinuing interferon therapy. *Arch Intern Med*. 1998; 158: 1445–1448.
188. Antonelli A, Ferri C, Pampana A, Fallahi P, Nesti C, Pasquini M, et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med*. 2004; 117:10–13.
189. Hsieh MC, Yu ML, Chuang WL, Shin SJ, Dai CY, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Liu JF, Wang LY, Chang WY. Virologic factors related to interferon- $\alpha$ -induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Endocrinol*. 2000; 142: 431–437.

190. Loviselli A, Oppo A, Velluzzi F, Atzeni F, Mastinu GL, Farci P, Orgiana G, Balestrieri A, Cocco PL, Mariotti S. Independent expression of serological markers of thyroid autoimmunity and hepatitis virus C infection in the general population: results of a community-based study in north-western Sardinia. *J Endocrinol Invest.* 1999; 22: 660–665.
191. Metcalfe RA, Ball G, Kudesia G, Weetman AP. Failure to find an association between hepatitis C virus and thyroid autoimmunity. *Thyroid.* 1997; 7: 421–424.
192. Boadas J, Rodríguez-Espinosa J, Enríquez J, Miralles F, Martínez-Cerezo FJ, González P, Madoz P, Vilardell F. Prevalence of thyroid autoantibodies is not increased in blood donors with hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 1995; 22: 611–615.
193. Indolfi G, Stagi S, Bartolini E, Salti R, de Martino M, Azzari C, Resti M. Thyroid function and antithyroid autoantibodies in untreated children with vertically acquired chronic hepatitis C virus infection. *Clin Endocrinol.* 2008; 68: 117–121.
194. Fournié GJ, Mas M, Cautain B, Savignac M, Subra JF, Pelletier L, Saoudi A, Lagrange D, Calise M, Druet P. Induction of autoimmunity through bystander effects. Lessons from immunological disorders induced by heavy metals. *J Autoimmun.* 2001; 16: 319–326.
195. Arata N, Ando T, Unger P, Davies TF. By-stander activation in autoimmune thyroiditis: studies on experimental autoimmune thyroiditis in the GFP+ fluorescent mouse. *Clin Immunol.* 2006; 121: 108–117.
196. Bartolomé J, Rodríguez-Iñigo E, Quadros P, Vidal S, Pascual-Miguelañez I, Rodríguez-Montes JA, García-Sancho L, Carreño V. Detection of hepatitis C virus in thyroid tissue from patients with chronic HCV infection. *J Med Virol.* 2008; 80: 1588–1594.
197. Munshi N, Balasubramanian A, Koziel M, Ganju RK, Groopman JE. Hepatitis C and human immunodeficiency virus envelope proteins cooperatively induce hepatocytic apoptosis via an innocent bystander mechanism. *J Infect Dis.* 2003; 188: 1192–1204.
198. Balasubramanian A, Ganju RK, Groopman JE. Signal transducer and activator of transcription factor 1 mediates apoptosis induced by hepatitis C virus and HIV envelope proteins in hepatocytes. *J Infect Dis.* 2006; 194: 670–681.
199. Balasubramanian A, Ganju RK, Groopman JE. Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2003; 278: 35755–35766.
200. Akeno N, Blackard JT, Tomer Y. HCV E2 protein binds directly to thyroid cells and induces IL-8 production: a new mechanism for HCV induced thyroid autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008; 31: 339–344.
201. Calvaruso V and Craxi A. 2011 European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines. *Liver Internat.* 2012; 32: 2-8.

202. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38: 518-526.
203. Strader DB, Wright T, Thomaw DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatology*. 2004; 39: 1147-1171.
204. Pearlman BL. Protease inhibitors for the treatment of chronic hepatitis C genotype-1 infection: the new standard of care. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12: 717-728.
205. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C infection. *J Hepatol*. 2011; 55 (2): 245-264.
206. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceeding of the Royal Society of London. Series B. Containing papers of a Biological character*. 1957; 147: 258-267.
207. Petska S. The interferon: 50 years after their Discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem*. 2007; 282: 20047-20057.
208. Parmar S, Plataniias LC. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol*. 2003; 15: 431-439.
209. Petska S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004; 202: 8-32.
210. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK et al. IFN-lambda mediates antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*. 2003; 4: 69-77.
211. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitemore TE et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. 2003; 4: 63-68.
212. Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol*. 2007; 179: 3634-3442.
213. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H et al. Viral infections activate type I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem*. 2007; 282: 7576-7581.
214. Donnelly RP, Sheikh F, Kotenko SV, Dickensheets H. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biol*. 2004; 76: 314-321.
215. Plataniias LC. Mechanisms of type-I and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 375-386.

216. Rönnblom L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups J Med Sci.* 2011; 116: 227-237.
217. Brassard DL, Grace MJ, Bordens RW. Interferon- $\alpha$  as an immunotherapeutic protein. *J Leuk Biol.* 2002; 71: 565-581.
218. Corssmit EP, Heijligenberg R, Hack CE, Endert E, Sauerwein HP, Romijn JA. Effects of interferon-alpha (IFN-alpha) administration on leucocytes in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 359-363.
219. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40<sup>th</sup> anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* 1998; 58: 2489-2499.
220. Corssmit EP, de Metz J, Sauerwein HP, Romijn JA. Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20: 1039-1047.
221. Taylor JL, Grossberg SE. The effects of interferon-alpha on the production and action of other cytokines. *Semin Oncol.* 1998; 25: 23-29.
222. Dickensheets HL, Donnelly HL. Inhibition of IL-4-inducible gene expression in human monocytes by type I and type II interferons. *J Leukoc Biol.* 1999; 65: 307-312.
223. Farrar JD, Murphy KM. Type I interferons and T helper development. *Immunol Today.* 2000; 21: 484-489.
224. Tough DF, Borrow O, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science.* 1996; 272: 1847-1950.
225. Finkelman FD, Svetic A, Gresser I, Sbacher C, Holmes J, Trotta PP, Katona IM, Gause WC. Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *J Exp Med.* 1991; 174: 1179-1188.
226. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science.* 1994; 263: 1612-1615.
227. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta) in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol.* 1998; 10: 383-390.
228. Jewell AP, Worman CP, Lydyard PM, Yong KL, Giles FJ, Goldstone AH. Interferon-alpha up-regulated bcl-2 expression and protects B-CLL from apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Haematol.* 1994; 88: 268-274.
229. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y, Jones EA. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1986; 315: 1575-1578.

230. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon-alfa2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1485-1492.
231. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet.* 2001; 358 (9286): 958-965.
232. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002; 347 (13): 975-982.
233. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Noviello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS; IDEAL Study Team. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2009; 361: 580-593.
234. Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol.* 2000; 32: 98-112.
235. Souvignet C, Zarski JP. Combination treatment for chronic hepatitis C: what is the role of ribavirin? *Fundam Clin Pharmacol.* 2000; 14: 321-325.
236. Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RK, Wright TL, Lin A, Hoffman J, De Pamphilis J. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1673-1680.
237. Manigold T, Recanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis b and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 804-813.
238. Akiyama M, Ichikawa T, Miyaaki H, Motoyoshi Y, Takeshita S, Ozawa E, Miuma S, Shibata H, Taura N, Nakao K. Relationship between regulatory T cells and the combination of pegylated interferon and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis type C. *Intervirology.* 2010; 53: 154-160.
239. Kanto T, Inoue M, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Kakita N, Matsubara T, Higashitani K, Hagiwara H, Iio S, Katayama K, Mita E, Kasahara A, Hiramatsu N, Takehara T, Hayashi N. Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 2012; 47 (2): 169-178.
240. Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem.* 2001; 276: 46094-46098.

241. Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol.* 1998; 160: 3487-3493.
242. Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T. Ribavirin polarizes human T cell responses toward a type 1 cytokine profile. *J Hepatology.* 1999; 30: 376-382.
243. Feld JJ, Lutchman GA, Heller T, Hara K, Pfeiffer JK, Leff RD, Meek C, Rivera M, Ko M, Koh C, Rotman Y, Ghany MG, Haynes-Williams V, Neumann AU, Liang TJ, Hoofnagle JH. Ribavirin improves early responses to peginterferon through improved interferon signaling. *Gastroenterology.* 2010; 139: 154-162.
244. Pawlotsky JM. The results of Phase III clinical trials with telaprevir and boceprevir presented at the Liver Meeting 2010: a new standard of care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending. *Gastroenterology.* 2011; 140: 746-754.
245. Horner SM, Gale M Jr. Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29: 489-198.
246. Rosen HR. Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2011; 364 (25): 2429-2438.
247. Lemon SM, McKeating JA, Pietschmann T, Frick DN, Glenn JS, Tellinghuisen TL, Symons J, Furman PA. Development of novel therapies for hepatitis C. *Antiviral Res.* 2010; 86: 79-92.
248. Miller AJ, Mihm M. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006; 335: 51-65.
249. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 American Joint Committee on Cancer, melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 6199-6206.
250. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 175-208.
251. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist.* 2011; 16: 5-24.
252. Clemente CG, Mihm Jr MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996; 77: 1303-1310.
253. van Houdt IS, Sluijter BJ, Moesbergen LM, Vos WM, de Gruijl TD, Molenkamp BG, van den Eertwegh AJ, Hooijberg E, van Leeuwen PA, Meijer CJ, Oudejans JJ. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I



- antigen expression. *Int J Cancer*. 2008; 123: 609-615.
254. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009; 9: 3.
255. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 123-131.
256. Jacobs J FM, Nierkens S, Figdor CG, de varies I JM, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: a final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol*. 2012; 13: e32-42.
257. Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid supressor cells in cancer recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune supression. *Semin Cancer Biol*. 2006; 16: 53-65.
258. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133: 775-787.
259. Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, Moroziewicz D, Mitcham J, Stoutenburg J, Cheung K, Hesdorffer C, Kim-Schulze S, Kaufman HL. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 1169-1177.
260. Correll A, Tuettenberg A, Becker C, Jonuleit H. Increased regulatory T-cell frequencies in patients with advanced melanoma correlate with a generally impaired T-cell responsiveness and are restored after dendritic cell-based vaccination. *Exp Dermatol*. 2010; 19: e213-221.
261. McCarter MD, Baumgartner J, Escobar GA, Richter D, Lewis K, Robinson W, Wilson C, Palmer BE, Gonzalez R. Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2854-2860.
262. Ladányi A, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, Timar J. FOXP3(+) cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res*. 2010; 16: 303-309.
263. Ascierto PA, Napolitano M, Celentano E, Simeone E, Gentilcore G, Daponte A, Capone M, Caracò C, Calemma R, Beneduce G, Cerrone M, De Rosa V, Palmieri G, Castello G, Kirkwood JM, Marincola FM, Mozzillo N. Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulation of effects of high-dose interferon- $\gamma$  2b treatment. *J Transl Med*. 2010; 8: 76.
264. Mozzillo N, Ascierto P. Reduction of circulating regualtory T cells by intravenous high-dose interferon alfa-2b treatment in melanoma patients. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29: 801-805.

265. Jandus C, Bioley G, Speiser DE, Romero P. Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57: 1795-1805.
266. Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, Powell DJ Jr, Wunderlich JR, Merino MJ, Rosenberg SA. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood.* 2008; 112: 4953-4960.
267. Vence L, Palucka AK, Fay JW, Ito T, Liu YJ, Banchereau J, Ueno H. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 20884-20889.
268. Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M, Rubegni P, Mannucci S, Monciatti I, Cosci E, Tosi P, Luzi P. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep.* 2007; 18: 1115-1122.
269. Knol AC, Nguyen JM, Quereux G, Brocard A, Khammari A, Dreno B. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. *Exp Dermatol.* 2011;20: 430-434.
270. Hillen F, Baeten CI, van de Winkel A, Creytens D, van der Schaft DW, Winnepeninckx V, Griffioen AW. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57: 97-106.
271. Lacy KE, Karagiannis SN, Nestle FO. Advances in the treatment of melanoma. *Clin Med.* 2012; 12: 168-171.
272. Nathan FE, Mastrangelo MJ. Systematic therapy in melanoma. Review. *Semin Surg Oncol.* 1998; 14: 319-327.
273. Kirkwood JM, Richards T, Zarour HM, Sosman J, Ernstoff M, Whiteside TL, Ibrahim J, Blum R, Wieand S, Mascari R. Immunomodulatory effects of high-dose and low-dose interferon  $\alpha$ 2b in patients with high-risk resected melanoma: the E2690 laboratory corollary of intergroup adjuvant trial E1690. *Cancer.* 2002; 95: 1101-1112.
274. Parmar S, Plataniias LC. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol.* 2003; 15: 431-439.
275. Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR Jr, Coppenhaver DH, Niesel DW, Klimpel GR, Stanton GJ, Hughes TK. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA.* 1991; 266: 1375-1383.
276. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, Gorelik E, Lokshin AE. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon- $\alpha$ 2b. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 3164-3171.
277. de La Salmonière P, Grob JJ, Dreno B, Delaunay M, Chastang C. White blood cell

- count: a prognostic factor and possible subset indicator of optimal treatment with low-dose adjuvant interferón in primary melanoma. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4713-4718.
278. Moschos SJ, Edington HD, Land SR, Rao UN, Jukic D, Shipe-Spotloe J, Kirkwood JM. Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high -dose interferon alfa-2b induced objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 3164-3171.
279. Ascierto PA, Kirwood JM. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *J Transl Med* 2008; 6: 62.
280. Critchley-Thorne RJ, Yan N, Nacu S, Weber J, Holmes SP, Lee PP. Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *PLoS Med.* 2007; 4: e176.
281. Wheatley, N. Ives, A. Eggermont, J. Kirkwood, N. Cascinelli, S. N. Markovic, B. Hancock, S. Lee, S. Suciú, and on behalf of International Malignant Melanoma Collaborative Group. Interferon-a as adjuvant therapy for melanoma: an individual patient data metaanalysis of randomised trials. *J Clin Oncol.* 2007; 18S: ASCO annual meeting proceedings. Abstract 8526.
282. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102: 493-501.
283. Thrahini AA, Kirkwood JM, Gooding WE, Cai C, Agarwala SS. Durable complete responses with high-dose bolus interleukin-2 in patients with metastatic melanoma who experienced progression after biochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 3802-3807.
284. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002; 417: 949-954.
285. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363: 809-819.
286. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 2012; 366: 707-714.
287. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer

- R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364: 2507-2516.
288. Comin-Anduix B, Chodon T, Sazegar H, Matsunaga D, Mock S, Jalil J, Escuin Ordinas H, Chmielowski B, Koya RC, Ribas A. The oncogenic BRAF kinase inhibitor PLX4032/RG7204 does not affect the viability or function of human lymphocytes across a wide range of concentrations. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 6040-6048.
289. Mena F. Latest approved therapies for metastatic melanoma. What comes next? *J Skin Cancer.* 2013; 2013: 735282.
290. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D; METRIC Study Group. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2012; 367: 107-114.
291. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363: 711-723.
292. Fentiman IS, Thomas BS, Balkwill FR, Rubens RD, Hayward JL. Primary hypothyroidism associated with interferon therapy of breast cancer. *Lancet.* 1985; 1: 1166.
293. Koh LK, Greenspan FS, Yeo PP. Interferon-alpha induced thyroid dysfunction: three clinical presentations and a review of the literature. *Thyroid.* 1997; 7: 891-896.
294. Mandac JC, Chaudhry S, Sherman KE, Tomer Y. The clinical and physiological spectrum of interferon-alpha induced thyroiditis: Toward a new classification. *Hepatology.* 2006; 43: 661-672.
295. Tomer Y, Menconi F. Interferon induced thyroiditis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23: 703-712.
296. Roti E, Minelli R, Giuberti T, Marchelli S, Schianchi C, Gardini E, Salvi M, Fiaccadori F, Ugolotti G, Neri TM, Braverman LE. Multiple changes in thyroid function in patients with chronic active HCV hepatitis treated with recombinant interferon-alpha. *Am J Med.* 1996; 101(5): 482-487.
297. Corssmit EP, de Metz J, Sauerwein HP, Romijn JA. Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20: 1039-1047.

298. Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Morisco F, Cioffi M, Stornaiuolo G, Gaeta GB, Molinari AM, Lazarus JH, Amato G, Carella C. Innate and acquired immune system in patients developing interferon-alpha-related autoimmune thyroiditis: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 4138-4144.
299. Nagayama Y, Mizuguchi H, Hayakawa T, Niwa M, McLachlan SM, Rapoport B. Prevention of autoantibody-mediated Graves'-like hyperthyroidism in mice with IL-4, a Th2 cytokine. *J Immunol.* 2003; 170: 3522-3527.
300. Caraccio N, Giannini R, Cuccato S, Faviana P, Berti P, Galleri D, Dardano A, Basolo F, Ferrannini E, Monzani F. Type I interferons modulate the expression of thyroid peroxidase, sodium/iodide symporter, and thyroglobulin genes in primary human thyrocyte cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 1156-1162.
301. Caraccio N, Cuccato S, Pratesi F, Dardano A, Ursino S, Chimenti D, Boldrini L, Materazzi G, Migliorini P, Monzani F. Effect of type I interferon(s) on cell viability and apoptosis in primary human thyrocyte cultures. *Thyroid.* 2009; 19: 149-155.
302. Akeno N, Smith Ep, Stefan M, Huber AK, Zhang W, Keddache M, Tomer Y. IFN- $\alpha$  mediated the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms, *J Immunol.* 2011; 186: 4693-4706.
303. Tomer Y, Davies TF. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: From gene mapping to gene function. *Endocr Rev.* 2003; 24: 694-717.
304. Dalgard O, Bjoro K, Hellum K, Myrvang B, Bjoro T, Haug E, Bell H. Thyroid dysfunction during treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha: no association with either interferon dosage or efficacy of therapy. *J Intern Med.* 2002; 251: 400-406.
305. Prummel MF, Laurberg P. Interferon-alpha and autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 2003; 13: 547-551.
306. Ban Y, Greenberg DA, Davies TF, Jacobson E, Concepcion E, Tomer Y. Linkage analysis of thyroid antibody production: evidence for shared susceptibility to clinical autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 3589-3596.
307. Watanabe U, Hashimoto E, Hisamitsu T, Obata H, Hayashi N. The risk factor for development of thyroid disease during interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 1994; 89: 399-403.
308. Imagawa A, Itoh N, Hanafusa T, Oda Y, Waguri M, Miyagawa J, Kono N, Kuwajima M, Matsuzawa Y. Autoimmune endocrine disease induced by recombinant interferon-alpha therapy for chronic active type C hepatitis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 922-926.
309. Mazziotti G, Sorvillo F, Stornaiuolo G, Rotondi M, Morisco F, Ruberto M, Cioffi M, Amato G, Caporaso N, Gaeta GB, Carella C. Temporal relationship between the appearance of thyroid autoantibodies and development of destructive thyroiditis in patients undergoing treatment with two different type-1 interferons

- for HCV-related chronic hepatitis: a prospective study. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25: 624–630.
310. Marazuela M, García-Buey L, González-Fernández B, García-Monzón C, Arranz A, Borque MJ, Moreno-Otero R. Thyroid autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before and during interferon-alpha therapy. *Clin Endocrinol.* 1996; 44: 635–642.
311. Deutsch M, Koskinas J, Tzannos K, Vassilopoulos D, Mailis A, Tolis G, Hadziyannis S. Hashimoto encephalopathy with pegylated interferon alfa-2b and ribavirin. *Ann Pharmacother.* 2005; 39: 1745–1747.
312. Rotondi M, Minelli R, Magri F, Leporati P, Romagnani P, Baroni MC, Delsignore R, Serio M, Chiovato L. Serum CXCL10 levels and occurrence of thyroid dysfunction in patients treated with interferon- $\alpha$  therapy for hepatitis C virus-related hepatitis. *Eur J Endocrinol.* 2007; 156: 409–414.
313. Oppenheim Y, Ban Y, Tomer Y. Interferon induced Autoimmune Thyroid Disease (AITD): a model for human autoimmunity. *Autoimm Rev.* 2004; 3: 388–393.
314. Tomer Y, Blackard JT, Akeno N. Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007; 36: 1051–1066.
315. Carella C, Amato G, Biondi B, Rotondi M, Morisco F, Tuccillo C, Chiuchiolo N, Signoriello G, Caporaso N, Lombardi G. Longitudinal study of antibodies against thyroid in patients undergoing interferon-alpha therapy for HCV chronic hepatitis. *Horm Res.* 1995; 44: 110–114.
316. Wong V, Fu AX, George J, Cheung NW. Thyrotoxicosis induced by alpha-interferon therapy in chronic viral hepatitis. *Clin Endocrinol.* 2002; 56: 793–798.
317. Lisker-Melman M, Di Bisceglie AM, Usala SJ, Weintraub B, Murray LM, Hoofnagle JH. Development of thyroid disease during therapy of chronic viral hepatitis with interferon alfa. *Gastroenterology.* 1992; 102: 2155–2160.
318. Tomer Y. Hepatitis C and interferon induced thyroiditis. *J Autoimmun.* 2010; 34: J322–J326.
319. Saracco G, Touscoz A, Durazzo M, Rosina F, Donegani E, Chiandussi L, Gallo V, Petrino R, De Micheli AG, Solinas A. Autoantibodies and response to alpha-interferon in patients with chronic viral hepatitis. *J Hepatol.* 1990; 11: 339–343.
320. Morisco F, Mazziotti G, Rotondi M, Tuccillo C, Iasevoli P, Del Buono A, Sorvillo F, Amato G, Marmo R, Caporaso N, Carella C. Interferon-related thyroid autoimmunity and long-term clinical outcome of chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis.* 2001; 33: 247–253.
321. Mammen JS, Ghazarian SR, Pulkstenis E, Subramanian GM, Rosen A, Ladenson PW. Phenotypes of interferon- $\alpha$ -induced thyroid dysfunction among patients treated for hepatitis C are associated with pretreatment serum TSH and female sex. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: 3270–3276.

322. Kryczka W, Brojer E, Kowalska A, Zarebska-Michaluk D. Thyroid gland dysfunctions during antiviral therapy of chronic hepatitis C. *Med Sci Monit.* 2001; 7: 221-225.
323. Zusinaite E, Metskula K, Salupere R. Autoantibodies and hepatitis C virus genotypes in chronic hepatitis C patients in Estonia. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 488-491.
324. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales Jr FL, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002; 347:975-982.
325. Carella C, Mazziotti G, Morisco F, Rotondi M, Cioffi M, Tuccillo C, Sorvillo F, Caporaso N, Amato G. The addition of ribavirin to interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis does not modify the thyroid autoantibody pattern but increases the risk of developing hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 743-749.
326. Pichert G, Jost LM, Fierz W, Stahel RA. Clinical and immune modulatory effects of alternative weekly interferon alfa-2a in patients with advanced renal cell carcinoma and melanoma. *Br J Cancer.* 1991; 63: 287-292.
327. Pichert G, Jost M, Zöbeli L, Odermatt B, Pedio G, Stahel RA. Thyroiditis after treatment with interleukin-2 and interferon- $\alpha$ 2a. *Br J Cancer.* 1990; 62: 100-104.
328. Satzger I, Meier A, Schenck F, Kapp A, Hauschild A, Gutzmer R. Autoimmunity as a prognostic factor in melanoma patients treated with adjuvant low-dose interferon alpha. *Inter J Cancer.* 2007; 121: 2562-2566.
329. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, Panagiotou P, Polyzos A, Papadopoulos O, Stratigos A, Markopoulos C, Bafaloukos D, Pectasides D, Fountzilas G, Kirkwood JM. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med.* 2006; 354:709-718.
330. Stuckert JJ, Tarhini AA, Kirkwood JM. Interferon alfa- induced autoimmunity and serum S100 levels as predictive and prognostic biomarkers in high-risk melanoma in the ECOG- intergroup phase II trial E2696 (ASCO 2007). *J Clin Oncol.* 2007; 25: 473s.
331. Bouwhuis MG, Suci S, Collette S, Aamdal S, Kruit WH, Bastholt L, Stiernier U, Salès F, Patel P, Punt CJ, Hernberg M, Spatz A, ten Hagen TL, Hansson J, Eggermont AM; EORTC Melanoma Group and the Nordic Melanoma Group. Autoimmune antibodies and recurrence-free interval in melanoma patients treated with adjuvant interferon. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:869-877.
332. Bouwhuis MG, Suci S, Testori A, Kruit WH, Salès F, Patel P, Punt CJ, Santinami M, Spatz A, Ten Hagen TL, Eggermont AM. Phase III trial comparing adjuvant treatment with pegylated interferon Alfa-2b versus observation: prognostic significance of autoantibodies- EORTC 18991. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 2460-2466.

333. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TE, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol.* 2007; 37:129-138.
334. Lang J, Arnold B, Hammerling G, Harris AW, Korsmeyer S, Russell D, Strasser A, Nemazee D. Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. *J Exp Med.* 1997; 186: 1513-1522.
335. de Carli M, D'Elia MM, Mariotti S, Marcocci C, Pinchera A, Ricci M, Romagnani S, del Prete G. Cytolytic T cells with Th1-like cytokine profile predominate in retroorbital lymphocytic infiltrates of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77: 1120-1124.
336. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science.* 1995; 268: 1185-1188.
337. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A.* 2008; 73: 975-983.
338. Furlan R, Bergami A, Cantarella D, Brambilla E, Taniguchi M, Dellabona P, Casorati G, Martino G. Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 1830-1838.
339. Griseri T, Beaudoin L, Novak J, Mars LT, Lepault F, Liblau R, Lehuen A. Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells. *J Immunol.* 2005; 175: 2091-2101.
340. Shevach EM. Mechanisms of foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009; 30: 636-645.
341. Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P, Ghiri E, Crescioli C, Romagnani P, Vitti P, Serio M, Ferrannini E. Interferon-alpha, -beta and -gamma induce CXCL9 and CXCL10 secretion by human thyrocytes: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Cytokine.* 2010; 50: 260-267.



## **11. ANNEX**