

## Patrón de activación de linfocitos T en ausencia de respuesta protectora contra el virus de la Hepatitis B. Revisión.

*Loredana Goncalves, Luisa Barboza, Benibelks Albarrán, Siham Salmen, Henry Montes, Manuel Hernández y Lisbeth Berrueta.*

Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: lberruet@ula.ve.

Palabras clave: Hepatitis B, activación, citocinas, linfocitos T, no respondedores, vacuna

Resumen. La hepatitis B es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo. Un cúmulo importante de evidencias sugiere que tanto la respuesta humoral como la celular son importantes para la eliminación del virus y que la respuesta celular se ha involucrado en la patogénesis de la enfermedad. La vacunación con el antígeno de superficie (HBsAg) es considerada como la estrategia principal para el control de la infección. Sin embargo, aproximadamente 5 a 10% de los individuos fallan en producir anticuerpos específicos. En este trabajo se han revisado aspectos fundamentales en la inmunopatogenia de la Hepatitis B, así como también fenómenos que explican la ausencia de respuesta a la vacuna. Partiendo de la premisa que los individuos no respondedores a la vacuna contra la Hepatitis B, están en riesgo de infección, se propone un mecanismo común para explicar la ausencia de respuesta frente al virus. En el contexto del modelo planteado se describe una alteración en la activación de los linfocitos T, tanto en no respondedores como en infectados crónicos. Estas observaciones son consistentes con diferencias potenciales en el eje de presentación MHC/Ag, contribuyendo al entendimiento sobre la alteración de la respuesta T cooperadora como un mecanismo de base para la ausencia de inmunidad protectora contra el virus de la hepatitis B (VHB).

Pattern of T cell activation in absence of protective immunity against hepatitis B virus. Review.  
*Invest Clín 2006; 47(1): 83 - 96*

Key words: Hepatitis B, activation, cytokines, T lymphocytes, nonresponders, vaccine.

Abstract. Hepatitis B is an important cause of morbidity and mortality around the world. One-third of the world's population has been estimated to be infected with hepatitis B virus (HBV). A significant amount of evidence suggests that both humoral and cellular immune responses are important to eliminate the virus and that, cellular immunity is involved in the pathogenesis of the disease. Vaccination with HBsAg is considered as the main strategy for effective control of the infection and viral transmission. However, approximately 5-10% of immunized individuals fail to elicit detectable specific antibodies and remain at risk for hepatitis B infection. In this work we have reviewed the current status in the pathogenesis of the disease and the mechanisms described to explain nonresponsiveness to the vaccine as well. Since nonresponders to the vaccine are at risk for the infection, a common mechanism to explain the absence or inappropriate immune response to virus components is proposed. Within the suggested model an impaired activation of T lymphocytes against viral antigens, both in nonresponders to vaccination and chronically infected patients, is described. These observations could be consistent with potential differences in the MHC/Ag presentation; therefore contributing to our understanding of the altered T helper response as an underlying mechanism for the lack of protective immunity against VHB.

*Recibido: 11-10-2004. Aceptado: 03-06-2005.*

#### GENERALIDADES SOBRE LA HEPATITIS B

La hepatitis B es una de las enfermedades más importantes que afecta la raza humana y constituye un problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen 2 millardos de personas infectadas, de las cuales 350 millones son portadores crónicos del HBsAg y estos individuos tienen un alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular. El VHB, agente causal de esta enfermedad, es transmitido a través de la exposición percutánea o permucosa a fluidos corporales infecciosos, a través del contacto sexual con la persona infectada y por vía perinatal de la

madre infectada a su hijo. La frecuencia de la infección por este virus y los patrones de transmisión, varían marcadamente en diferentes partes del mundo. Aproximadamente 45% de la población mundial vive en áreas donde la prevalencia de la infección crónica es alta (>8% de la población es positiva para el HBsAg), 43% vive en áreas donde la prevalencia es moderada o intermedia (2 a 7% de la población es HBsAg positiva) y 12% vive en áreas de baja endemicidad (<2% de la población es HBsAg positiva) (1).

En Sudamérica ocurren anualmente más de 100.000 casos de infección aguda, con una prevalencia de exposición que oscila entre 6,7 y 41% y una prevalencia del HBsAg que varía entre 0,4 y 13%. Venezuela

presenta un nivel de prevalencia intermedia (1-5%), con focos de alta endemicidad: Amerindios del Estado Amazonas, del Estado Delta Amacuro, de la Sierra de Perijá en el Estado Zulia y un foco descrito en el Estado Barinas (2-4).

La hepatitis B es una enfermedad necroinflamatoria de severidad variable. Las consecuencias de la infección aguda son muy heterogeneas. El período de incubación puede extenderse entre 6 semanas y 6 meses y el desarrollo de las manifestaciones clínicas es altamente dependiente de la edad. Los recién nacidos generalmente no desarrollan ni signos ni síntomas y la infección puede producir el cuadro clínico de enfermedad en sólo 5 a 15% de los niños entre 1 y 5 años de edad (5). Los niños mayores y los adultos, son sintomáticos en 33 a 50% de las infecciones. La hepatitis fulminante ocurre entre 1 y 2% de las personas con enfermedad aguda. La infección crónica se define como la presencia de HBsAg en el suero durante al menos 6 meses y ausencia de anticuerpos contra este antígeno (anti-HBs). El riesgo de desarrollar la infección crónica varía inversamente con la edad y es más elevado en niños infectados durante el período perinatal. Las personas con infección crónica por el VHB tienen un riesgo elevado de desarrollar enfermedad hepática crónica incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular (1).

El VHB es un virus ADN de doble cadena con envoltura que pertenece a la familia *Hepadnaviridae*. El genoma viral está organizado en cuatro unidades de transcripción controladas por cuatro promotores independientes y una señal de poliadenilación común generando cuatro ARN extensamente solapados entre sí (6).

#### VACUNA CONTRA LA HEPATITIS B

La vacunación masiva contra la hepatitis B, inicialmente recomendada únicamen-

te para zonas de alta endemicidad, ha sido propuesta actualmente para todos los países porque se ha demostrado que sólo mediante la vacunación a nivel mundial se podrá controlar esta epidemia y finalmente tratar de erradicar el virus. Actualmente, las vacunas disponibles contra la hepatitis B están compuestas de preparaciones de HBsAg altamente purificadas, bien sea preparadas mediante la obtención del HBsAg del plasma de personas con infección crónica (llamadas vacunas derivadas de plasma) o a partir de plásmidos que contienen el gen que codifica para el HBsAg, dentro de células de levaduras o de mamíferos (7).

La eficacia protectora de la vacunación contra la hepatitis B está directamente relacionada con el desarrollo de Anti-HBs (8, 9). Las personas quienes desarrollan títulos de Anti-HBs > 10 mIU/mL después de una serie de vacunación primaria, están virtualmente protegidos en un 100% contra la enfermedad clínica y la infección crónica.

A pesar que las vacunas disponibles comercialmente contra la hepatitis B han demostrado inmunogenicidad excelente y alta eficacia protectora, se ha descrito que aproximadamente entre 4 a 10% de los adultos sanos inmunocompetentes, no producen niveles protectores de Anti-HBs (9, 10). Este grupo de individuos incluye no respondedores y bajos respondedores, quienes son incapaces de producir niveles detectables (> 1mIU/mL) o protectores (10mIU/mL) de Anti-HBs, respectivamente.

El mecanismo responsable de esta respuesta inapropiada a la vacunación es desconocido. Se ha sugerido la presencia de un defecto en la presentación antigénica secundario a la expresión de ciertos antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC). Los individuos homocigotos para HLA-DRB1\*0701 y DQB1\*0202 fallan en producir > 10 IU/L de Anti-HBs, mientras que los individuos heterocigotos requirieron más de 10mg/mL de la vacuna utilizada

para obtener una respuesta apropiada (11). En otro estudio más reciente se demostró que el reconocimiento del HBsAg está restringido por DRB5\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*1201, DPB1\*02012, DPB1\*0402 y DPB1\*0901 (12).

Se ha demostrado además la existencia de repertorios de linfocitos T y B defectuosos (13), lo cual pudiera ser secundario a la destrucción de clones de linfocitos B específicas para el HBsAg mediada por linfocitos T citotóxicos (14).

También se ha propuesto como mecanismo para explicar la ausencia de respuesta a la vacunación, la tolerancia inmunitaria (15) y defectos funcionales en la cooperación dependiente de los linfocitos CD4, necesaria para la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B (16, 17).

En otra serie de estudios se han demostrado alteraciones en los perfiles de citocinas producidas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> en respuesta al HBsAg (13, 18, 19).

Otro aspecto importante a considerar es la presencia de mutantes de escape a la vacuna, especialmente relacionadas a mutaciones localizadas en el determinante "a" del HBsAg. Los anticuerpos anti-"a" son capaces de proteger a los individuos de infecciones contra cualquiera de los subtipos del virus. Sin embargo se considera que estas variantes presentan un interés epidemiológico y que no representan un problema relevante inmediato para los programas de vacunación (20).

#### INMUNOPATOGENIA DE LA HEPATITIS B

La patogenia de la infección por el virus VHB y el curso clínico individual está condicionada por la respuesta inmunitaria del hospedador, dirigida contra antígenos codificados por el virus. Este proceso, conduce eventualmente tanto a la eliminación

del virus como a la lesión tisular durante el transcurso de la infección (21).

Diferentes estudios proponen que el sistema inmunitario activa varios mecanismos para eliminar viriones extracelulares circulantes y células infectadas por el virus. El mecanismo de defensa de mayor efectividad contra la infección, consiste en la producción de inmunoglobulinas de tipo IgM e IgG específicas, capaces de reconocer antígenos virales tanto solubles como unidos a las membranas celulares. Una vez que el virus ha ingresado a la célula, el papel de los anticuerpos es ineficiente para su eliminación, de tal manera que se ponen en marcha mecanismos celulares principalmente dependientes de linfocitos T, que puedan controlar la infección con daño mínimo de las células del hospedador. La participación de los linfocitos T cooperadores, elementos clave de la respuesta celular antiviral, se inicia con el reconocimiento por el receptor del linfocito T (TCR) de los péptidos virales presentados en asociación con moléculas del MHC, lo cual conduce a la activación, proliferación y producción de citocinas tanto del patrón Th1 como Th2. Seguidamente y como resultado del balance entre estos dos tipos de respuesta, se inicia la activación de linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL), específicos contra antígenos virales, con la habilidad para destruir células blanco infectadas mediante dos mecanismos principales: citólisis vía perforina o mediante lisis dependiente del sistema Fas/FasL (22).

Todos estos aspectos deben ser considerados además en el contexto de la presentación antigénica como elemento crucial en la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa. Se han descrito alteraciones en las células dendríticas hepáticas utilizando un modelo experimental de hepatitis en ratones, dichas alteraciones están relacionadas tanto con el procesamiento, como con la presentación de antígenos específicos y

disminución en la producción de Interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en presencia de HBsAg (23). Se ha publicado además, que en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis B existe una falla en las células dendríticas para incrementar las moléculas del MHC de clase II, disminución en la expresión de moléculas B7, disminución en la secreción de IL-12 en respuesta al HBsAg, disminución en la inducción de respuesta proliferativa de linfocitos T y disminución en la inducción específica de CTL (24). Sin embargo, en un trabajo publicado recientemente se ha comprobado que la capacidad estimuladora de las células dendríticas provenientes de pacientes infectados con el VHB, está intacta y que la infección de las células dendríticas con el VHB conduce a alteraciones fenotípicas y funcionales menores sin alterar en forma significativa su capacidad de estimular a las células T contra virus (25).

#### Respuesta T cooperadora específica anti-VHB

El desarrollo de la respuesta inmunitaria contra un determinado antígeno, sea éste un agente infeccioso, un autoantígeno o un alérgeno, está altamente condicionada por los patrones de citocinas que se produzcan. La intensidad de la respuesta inmunitaria anti-VHB parece estar estrechamente vinculada al tipo de respuesta de los linfocitos T ayudadores que se genera, así como también a la modulación de la respuesta inmunitaria dependiente de los antígenos virales. Se ha comunicado que en individuos no respondedores a la inmunización con la vacuna contra la hepatitis B, existe un defecto en la respuesta Th1, según el patrón de citocinas que se producen, al estimular *in vitro* linfocitos T de sangre periférica con antígenos recombinantes (13, 26). Sin embargo, estos parámetros han sido revisados más recientemente y se ha probado que la respuesta de citocinas ante la inmunización

con HBsAg es muy compleja y específica para cada donante sin que exista un patrón preponderante (19).

En la sangre periférica de pacientes con hepatitis aguda autolimitante, se genera una respuesta potente mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> restringida por el MHC clase II, contra múltiples epítopes presentes en los antígenos de la nucleocápside, el HBcAg y el HBeAg (27). En contraste, este tipo de respuesta es menos potente contra los antígenos de la envoltura en los mismos pacientes y se ha demostrado una alteración de la respuesta T cooperadora en la infección crónica (16). La respuesta específica de linfocitos T contra antígenos de la envoltura es muy potente en pacientes quienes han sido inmunizados con la vacuna recombinante de HBsAg o derivado plasmático (12).

#### Papel de las citocinas en la infección por el VHB

De lo anteriormente expuesto se infiere que el éxito en la eliminación del virus, con daño mínimo de las células propias del hospedador, depende en gran parte de un balance entre la respuesta específica de los linfocitos T cooperadores anti-VHB del tipo Th1 y Th2, donde los linfocitos T CD4<sup>+</sup> induzcan activación de los CTL y la síntesis de inmunoglobulinas específicas anti-HBsAg que pueda determinar la resolución de la infección aguda.

De acuerdo con varios estudios realizados, los tipos de citocinas asociados con la resolución espontánea de la hepatitis B aguda, consisten en el patrón Th1 con predominancia de interleucina 2 (IL-2), IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), elementos que podrían contribuir no sólo a la erradicación de la infección viral sino al daño hepático en pacientes que desarrollan hepatitis crónica. Sin embargo, también se producen pero en menor cantidad, citocinas del patrón Th2 como interleucina 4 (IL-4) e interleucina 5 (IL-5) responsables

de la respuesta humoral que conduce a la producción de anticuerpos específicos contra los antígenos del VHB, lo que indica que un balance adecuado entre el patrón de citocinas producido es crucial para eliminar el virus de la circulación (16, 28, 29).

El IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$  y probablemente la IL-2, pueden inhibir el proceso replicativo del virus por mecanismos postraduccionales, a través de degradación del ácido ribonucleico viral en el núcleo de la célula, evitando así el ensamblaje de la nucleocápside en el citoplasma. Además, recientemente se han presentado evidencias que indican que la actividad antiviral del IFN- $\gamma$  puede ser mediada por el óxido nítrico (30).

#### EFECTO ANTIVIRAL DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS

Aunque no existen datos sobre los eventos intrahepáticos tempranos de la infección en humanos, el escenario que se plantea a partir de los datos disponibles es que el interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) y el IFN- $\gamma$  producido por los hepatocitos infectados, son primariamente responsables del reclutamiento y la activación de células de la inmunidad innata dentro del hígado: macrófagos, células NKT (linfocitos T con fenotipo de células asesinas naturales o NK) y células NK. Una vez activadas, estas células pueden producir citocinas y monocinas que incrementan la expresión de moléculas del MHC de clase I sobre los hepatocitos, células que expresan estas moléculas débilmente. De acuerdo con esta interpretación, la calidad y la magnitud de la respuesta inmunitaria innata más que la respuesta específica de CTL iniciaría la secuencia de eventos patogénicos en los estadios tempranos de la infección (31).

Un número importante de evidencias sugiere que los CTL juegan un papel primordial en la erradicación de la infección, en virtud de su capacidad para identificar y eliminar células infectadas por virus a tra-

vés del reconocimiento de los antígenos virales presentados asociados a moléculas del MHC clase I (32-34). Varios de los epítopes virales son reconocidos por los CTL de la mayoría de los pacientes infectados, mientras que otros son vistos por una minoría, sugiriendo que existe una respuesta jerárquica para este virus, jerarquía que pudiera estar condicionada por la afinidad de unión al haplotipo HLA y al grado en el cual estos epítopes son conservados entre diferentes cepas virales (6).

Las células T CD8<sup>+</sup> son detectables en la sangre periférica de sujetos infectados en forma aguda durante la fase temprana de la incubación. Además, el pico de frecuencia de linfocitos citotóxicos circulantes VHB-específicos coincide con la elevación de las transaminasas (ALT) (31). Este fenómeno sugiere que dichas células median enfermedad necroinflamatoria aguda (35). Esta hipótesis fue derivada de experimentos en ratones transgénicos que expresan el HBsAg o todas sus proteínas en sus hepatocitos y que cuando se les inyectaba CTL VHB-específicos, se les inducía inflamación y necrosis hepática, mediante un proceso de múltiples pasos que involucra consecuencias directas e indirectas de la activación de los CTL. La función patogénica más destructiva de los CTL, es la secreción de IFN- $\gamma$  cuando ellos encontraban antígenos *in vivo*, lo que activaba a macrófagos intrahepáticos e inducía una respuesta de hipersensibilidad retardada, que destruía el hígado y los riñones del ratón (36).

Una respuesta vigorosa y de tipo Th1 específica contra HBcAg y contra HBeAg es detectable en virtualmente todos los pacientes durante la fase sintomática de la hepatitis B aguda autolimitante y parece estar dirigida contra varios epítopes, de los cuales unos pocos son inmunodominantes y ampliamente reconocidos por pacientes con diferentes patrones genéticos del MHC (37).

Los linfocitos T citotóxicos y de tipo cooperadores específicos contra el VHB son

generalmente indetectables en la sangre de pacientes con hepatitis B crónica, quienes son incapaces de eliminar el virus y muestran daño hepático y niveles elevados de replicación viral (37). Este bajo nivel de respuesta se ha atribuido a destrucción de clones, anergia o alteraciones en el balance de citocinas (27), pero también se ha descrito que poblaciones menores de CD8<sup>+</sup> específicas para VHB, son parcialmente tolerantes e incapaces de unir tetrámeros específicos, producir IFN- $\gamma$ , lisar y expandirse después de la estimulación con péptidos específicos (38).

Una situación totalmente diferente se presenta en pacientes asintomáticos crónicamente infectados, sin signos de daño hepático. Generalmente este grupo de pacientes ha sido considerado como desprovisto de una respuesta activa de CTL contra el VHB. Sin embargo, estudios recientes llevados a cabo mediante tinción con tetrámeros y el análisis funcional de CTL circulantes e intrahepáticos, muestran que existen linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> funcionalmente activos, tanto en circulación como en el hígado de estos pacientes, a pesar de la ausencia de daño hepático (39). Los CTL presentes en la circulación muestran actividad citolítica y secretan citocinas antivirales *in vitro* después de la estimulación con antígenos virales. Una fracción elevada de linfocitos CD8<sup>+</sup> infiltrantes en estos pacientes son HBV específicos (39). El comportamiento de la respuesta de CTL en pacientes infectados asintomáticos apoya la idea que el control de la replicación del VHB puede ser ejercido por CTL específicos sin destrucción celular.

#### PARTICIPACIÓN DE LOS FENÓMENOS DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T EN LA RESPUESTA INMUNITARIA PROTECTORA ANTI-VHB

La hepatitis B representa un modelo muy interesante para explorar los complica-

dos mecanismos moleculares que controlan la respuesta inmunitaria frente a patógenos virales, así como también lo es el estudio de la respuesta a la vacunación contra la hepatitis B, la cual sigue siendo la estrategia fundamental en la prevención de la infección. Hasta la fecha se desconocen los mecanismos responsables de la no respuesta al HBsAg. La ausencia de respuesta a la vacuna contra la hepatitis B se ha descrito en un porcentaje de la población de individuos vacunados alrededor del mundo (9, 40) y se asume que estos individuos están en riesgo para la hepatitis B. Se han propuesto una serie de factores para explicar la ausencia de respuesta a la vacuna y uno de los más controversiales se refiere al ambiente de citocinas segregadas y su repercusión en el resultado final de la respuesta inmunitaria contra el HBsAg. El análisis *in vitro* de la producción de citocinas contra el HBsAg ha revelado: ausencia de producción de citocinas del patrón Th1 en sujetos no respondedores (13, 28), ausencia de respuesta Th2 tanto en respondedores como no respondedores a la vacuna (17), ausencia de citocinas tanto del patrón Th1 como Th2 en individuos no respondedores a la vacuna (18, 19) y producción de ambos patrones de citocinas en sujetos respondedores a la vacuna (19).

Como parte de una línea de investigación desarrollada en el Instituto de Inmunología Clínica de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, para explorar aspectos relacionados con la inmunopatogenia de la hepatitis B, se ha estudiado la respuesta celular frente a antígenos del VHB en varias poblaciones de individuos. Para evaluar tanto la respuesta observada secundaria a la vacunación, como la producida por mecanismos naturales, se estudiaron dos grandes grupos de individuos: un grupo de individuos vacunados (respondedores y no respondedores a la vacuna) y no vacunados (41) y otro grupo de pacientes

infectados crónicos con VHB y curados de la infección.

Tal y como se ha descrito previamente (19), la respuesta proliferativa frente al HBsAg fue pobre en los sujetos no respondedores, cuando se compararon con los respondedores a la vacuna. La ausencia de respuesta proliferativa en estas células es una característica específica de estos individuos por cuanto la estimulación policlonal con mitógeno de pokeweed (PWM) indujo una proliferación celular adecuada comparable a la observadas en el grupo de respondedores a la vacuna y en el grupo de no vacunados.

Una posibilidad para explicar la ausencia de proliferación antígeno específica en los sujetos no respondedores a la vacuna contra la hepatitis B, podría estar relacionada con señales de co-estimulación inapropiadas que pudieran generar señales de activación temprana deficientes en los linfocitos T. Para probar esta hipótesis, se midió la expresión de las moléculas CD40L, CD25 y CD69 en las células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> de los tres grupos de sujetos estudiados. Se observó un porcentaje disminuido de la expresión de CD69 en el grupo de no respondedores al compararse con los respondedores. Con la finalidad de analizar el efecto de este resultado, la expresión de CD69 se comparó con el índice de proliferación, observándose una correlación positiva entre estos dos parámetros. De tal manera que puede decirse que la ausencia de proliferación específica en los no respondedores a la vacuna contra la hepatitis B, puede ser secundaria a defectos en la activación celular temprana.

La molécula CD25 se expresa generalmente en linfocitos T activados y se cree que las células que expresan una proporción elevada del receptor de alta afinidad para IL-2 (CD25) cumplen una función de inmunorregulación (42) y además son los candidatos más probables como precursores inmediatos de células efectoras (43). En

el estudio mencionado se observó que la estimulación con HBsAg no induce incremento en el porcentaje de expresión de CD25 en los linfocitos T de los sujetos del grupo de individuos no respondedores a la vacuna.

Se incluyen dos causas adicionales que pudieran explicar la ausencia de respuesta a la vacuna contra la hepatitis B en los sujetos no respondedores: un ambiente de citocinas inadecuado o defectos en la interacción CD40/CD40L. Entre las múltiples vías de coestimulación identificadas, existen evidencias sólidas que las interacciones entre los receptores localizados en los linfocitos T denominados CD28 y CD40L, con sus respectivos ligandos B7.1/B7.2 y CD40, localizados en las células presentadoras de antígeno (CPA), son críticas para la activación y modulación de la respuesta inmunitaria específica (44). La presencia de un diálogo recíproco entre las CPA y los linfocitos T es el responsable de la activación de ambos grupos celulares. Los linfocitos T necesitan expresar CD40L para inducir las moléculas de la familia B7 sobre las CPA y la expresión de moléculas coestimuladoras sobre las CPA, se requiere para activar el linfocito T (45). En los sujetos no respondedores se manifestó una marcada disminución de la expresión de CD40L en su superficie, en respuesta al HBsAg. Se observó además como dato importante, un coeficiente de correlación elevado entre la expresión de CD40L en las células CD4<sup>+</sup> y la producción de inmunoglobulinas.

Con la finalidad de analizar el patrón de citocinas producidas por los linfocitos T de los tres grupos de individuos, se cuantificó la síntesis intracelular de las siguientes citocinas: IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, interleucina 13 (IL-13) y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ). Se observó que las células T del grupo de vacunados respondedores, produjeron niveles significativos de todas las citocinas exploradas, sin preferencia alguna en el perfil. Estos resultados están en fran-

co contraste con aquellos demostrados en los sujetos no respondedores, en quienes la expresión de citocinas en respuesta al HBsAg, fue inclusive más baja que la observada en los sujetos no vacunados (41). Tal y como lo reportaron Larsen y colaboradores, la respuesta de citocinas *in vitro* al HBsAg es muy compleja y dependiente del sujeto (19). Estos resultados sugieren que un ambiente inapropiado de citocinas en respuesta a la estimulación específica con el HBsAg, podría explicar en parte el detrimento tanto de la respuesta humoral como celular contra el HBsAg.

Existen varios factores que determinan la diferenciación de un linfocito T virgen en un linfocito activado después del desafío antigénico (46, 47), éstos incluyen la fuerza de la señal procedente del TCR o densidad antigénica, el medio de citocinas que se genere y las vías de coestimulación involucradas. Los resultados previamente descritos sugieren que la falla en la proliferación y producción de citocinas, puede ser una consecuencia de una señal de activación ineficiente, bien sea dependiente del eje antígeno/CPA o secundaria a una participación limitada del linaje de linfocitos T cooperadores. Clarificar este proceso tan complejo requerirá de intensos estudios. Adicionalmente se puede deducir que la ausencia o disminución de la respuesta humoral específica en los individuos que no responden a la vacuna puede ser el resultado de una incapacidad de las células Th para inducir un cambio en el isotipo de inmunoglobulinas durante la maduración de la respuesta de los linfocitos B.

Si partimos de la premisa que los individuos que fallan en producir niveles adecuados de anticuerpos protectores frente al HBsAg, están en riesgo de contraer la infección, resulta razonable pensar que aquellos pacientes que no pueden eliminar el VHB de la circulación, convirtiéndose por ende en infectados crónicos, pudieran presentar déficit en señales tempranas de activación

comparables a las observadas durante la no respuesta a la vacunación. Dado que en los resultados observados en el grupo de vacunados no respondedores se demostró una disminución en la expresión de marcadores de activación, cabe preguntarse si este mismo defecto pudiera estar presente en las células de pacientes infectados crónicos, en respuesta a estímulo con HBcAg. Se observó un porcentaje disminuido de la expresión de CD69 en el grupo de infectados crónicos, al compararse con el grupo de individuos curados naturalmente de la infección. Este resultado sugiere un déficit en señales tempranas de activación de los linfocitos T específicos contra el HBcAg y además, el estímulo con HBcAg indujo incremento de la expresión de esta molécula en las células T de los sujetos curados de la infección.

Las células CD4<sup>+</sup> de los pacientes infectados crónicos no incrementan los niveles de CD40L al ser estimuladas con HBcAg. Este resultado sugiere un mecanismo común para explicar una activación ineficiente de los linfocitos Th, elementos clave de la respuesta inmunitaria, con repercusiones en la producción de citocinas, activación de CTL, producción de inmunoglobulinas protectoras, reclutamiento y activación de otros componentes inflamatorios encargados de limitar la infección.

A fin de analizar el patrón de citocinas producidas por los linfocitos T de infectados y curados de la infección, se cuantificó la síntesis intracelular de algunas citocinas. Como resultado interesante destaca que los pacientes infectados crónicos expresan niveles elevados de interleucina 10 (IL-10), en células estimuladas con HBcAg, en el grupo de pacientes infectados crónicos. Así mismo, se demostró que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes infectados crónicos estimulados con el HBcAg, expresan niveles elevados de TGF- $\beta$ , en comparación con los sujetos que resolvieron la infección espontáneamente.

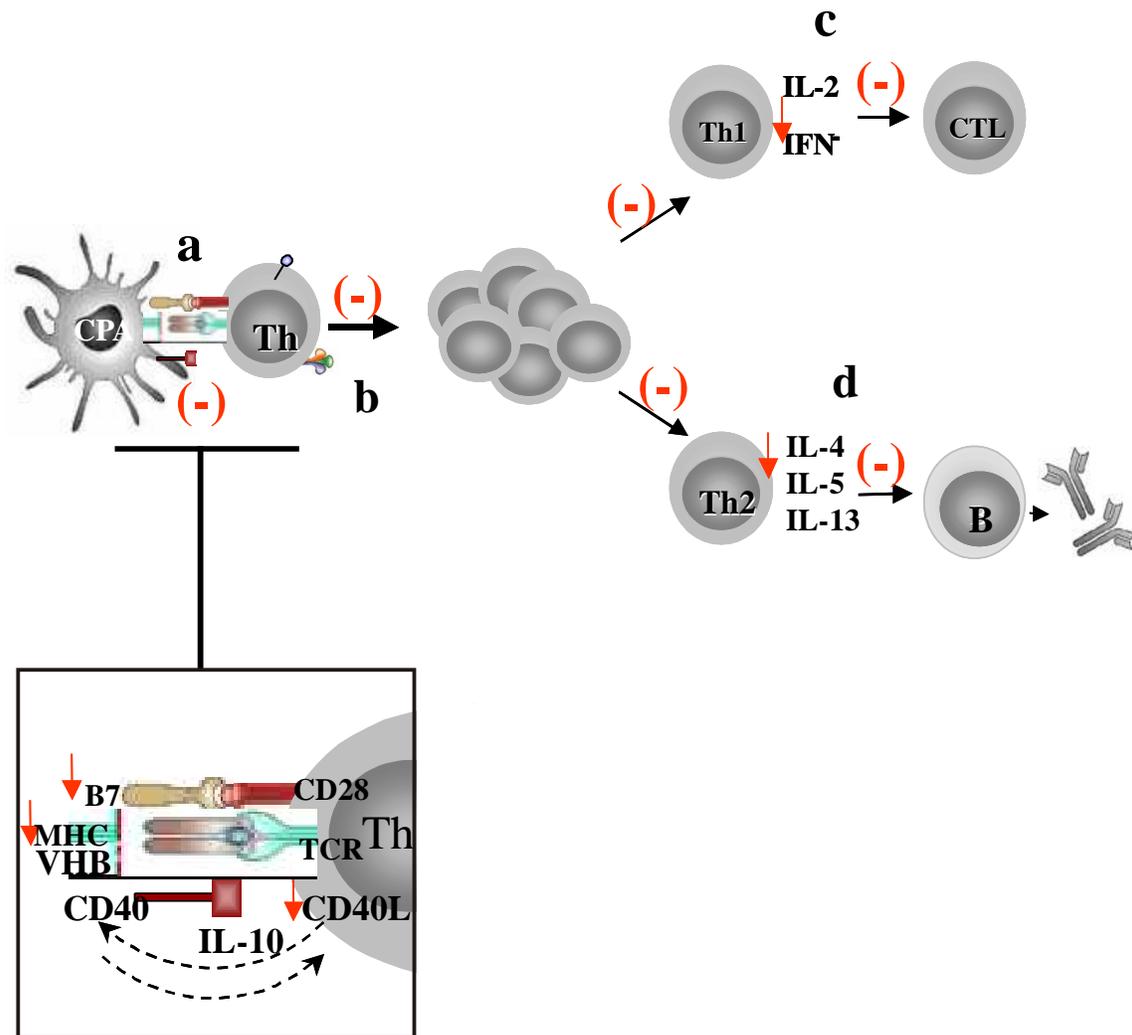


Fig. 1. Modelo de no respuesta contra antígenos del virus de la hepatitis B. a) Defectos en señales tempranas de activación derivadas de la interacción entre el complejo MHC/VHB en las CPA y los linfocitos T cooperadores, como resultado de un ambiente inhibitorio dependiente de la producción de IL-10 y de la baja expresión de CD40L y otros receptores de activación. b) Esto conlleva a una expansión y diferenciación deficiente de los linfocitos T cooperadores tanto del patrón Th1, lo cual afectaría la respuesta de los CTL (c), como del patrón Th2, disminuyendo la producción de anticuerpos neutralizantes específicos (d).

El incremento observado en la síntesis de TGF- $\beta$  mediado por las células T de los pacientes infectados crónicos sumado a inducción de la síntesis de IL-10, encaja perfectamente en el contexto del papel antiinflamatorio e inhibitorio adjudicado a la IL-10 (48). Se ha demostrado previamente un incremento en la frecuencia de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-10 en pacientes

con hepatitis B crónica, tanto en células mononucleares de sangre periférica, como en linfocitos que infiltran el hígado, que se correlacionó con los niveles de ALT séricas (49), sugiriéndose una supresión de la respuesta inmunitaria antiviral, lo cual contribuye a la persistencia de la infección. También es importante citar un estudio realizado en un número importante de pacientes

con infección crónica por VHB, el cual demostró la asociación entre el haplotipo ht2 de IL-10 y la progresión hacia hepatocarcinoma (50).

La IL-10 producida por muchas células hematopoyéticas, incluyendo macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, desempeña un papel importante en la inhibición de la respuesta inflamatoria y en la inmunidad mediada por células (51). Los efectos anti-inflamatorios de la IL-10 son atribuidos primariamente a su capacidad para inhibir funciones de las células accesorias (principalmente células dendríticas) requeridas para una función óptima de los linfocitos T. La IL-10 puede inhibir la producción de citocinas por parte de células accesorias, tales como: TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-2, las cuales se requieren para la producción óptima de IFN- $\gamma$  (51, 52). Adicionalmente, la IL-10 afecta la coestimulación disminuyendo la expresión de B7.1 y B7.2 en los monocitos, macrófagos y células dendríticas e inhibe la actividad de la quinasa de tirosina dependiente de CD40 (53). También se ha descrito que esta interleucina inhibe la expresión de MHC de clase I y de Clase II, interfiriendo por lo tanto con la presentación antigénica y la sensibilización de linfocitos T antígeno-específicos (54).

### CONCLUSIÓN

El escenario observado, en donde prevalece un microambiente inhibitorio, podría explicar una activación ineficiente de poblaciones linfoides, reflejado en disminución antigénica específica de moléculas coestimuladoras y marcadores tempranos de activación. El resultado de este desequilibrio en la respuesta inmunitaria es una incapacidad para eliminar el virus y la progresión hacia un proceso inflamatorio crónico que predispone al daño hepático permanente.

En conclusión se describe un circuito inhibitorio, en donde el compromiso de los

linfocitos Th para coordinar el desarrollo de los mecanismos de defensa antiviral, está estrechamente relacionado con pasos críticos tempranos de activación y diálogo con células accesorias (Fig 1). La pérdida de este delicado balance en la respuesta inmune, conducirá eventualmente a ausencia de inmunidad protectora después de la vacunación, mayor susceptibilidad para contraer la infección por el VHB y finalmente a imposibilidad para eliminar el virus de la circulación en una proporción de pacientes infectados, lo cual redundará en riesgo incrementado de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular.

### AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado en parte por el FONACIT código de proyectos: S12000000523, F-2000001509 y por el CDCHT de la Universidad de los Andes código: M-695-00-07-A.

### REFERENCIAS

1. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:351-366.
2. Torres J. La infección por el virus de la Hepatitis B y Delta en Sur América. *Boletín Venezolano de Infectología* 1996; 6: 68-79.
3. Torres J, Machado I. Special aspects of hepatitis B virus and Delta-virus. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8:13-27.
4. Betancourt A, Jaimes E, Flores J y Martínez D. Análisis de resultados de hepatitis B y Delta en Barinitas y La Barinesa, Estado Barinas. Informe al MSAS 1987.
5. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infec Dis* 1985;151:599-603.

6. Chisari F. Viruses, Immunity, and Cancer: Lessons from Hepatitis B. *Am J Pathol* 2000; 156:1117-1132.
7. Leroux-Roels G, Desombere I, Cobbaut L, Petit MA, Desmons P, Hauser P, Delem A, De Grave D, Safary A. Hepatitis B vaccine containing surface antigen and selected preS1 and preS2 sequences. 2. Immunogenicity in poor responders to hepatitis B vaccines. *Vaccine* 1997; 15: 1732-1736.
8. Crosnier J, Jungers P, Courouche AM, Laplanche A, Benhamou E, Degos F, Lacour B, Prunet P, Cerisier Y, Guesry P. Randomised placebo-controlled trial of hepatitis B surface antigen vaccine in French hemodialysis subunits. *Lancet* 1981; i:455-459.
9. Szmuness W, Stevens CE, Harley EJ, Zang EA, Oleszko WR, William DC, Sadovsky R, Morrison JM, Kellner A. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med* 1980; 303:833-841.
10. Craven DE, Awdeh ZL, Kunches LM, Yunis EJ, Dienstag JL, Werner BG, Polk BF, Syndman DR, Platt R, Crumacker CS, et al. Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in health care workers. Results of revaccination and genetic typings. *Ann Intern Med* 1986;105:356-360.
11. McDermott A, Cohen S, Zuckerman J, Madrigal J. Human leukocyte antigen influence the immune response to a pre-S/S hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1999; 17:330-339.
12. Desombere I, Gijbels Y, Verwulgen A, Leroux G. Characterization of the T cell recognition of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by good and poor responders to hepatitis B vaccines. *Clin Exp Immunol* 2000; 122:390-399.
13. Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, Lara-Marquez ML, Salazar M, Deulofeut R, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. Defect in Th1-Like Cells of Nonresponders to Hepatitis B Vaccine. *Human Immunol* 1997; 58:42-51.
14. Barnaba V, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F. Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I-restricted, exogenous antigen-specific T lymphocytes. *Nature* 1990; 345:258-260.
15. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6599-6603.
16. Livingston BD, Alexander J, Crimi C, Oseroff C, Celis E, Daly K, Guidotti LG, Chisari FV, Fikes J, Chesnut RW, Sette A. Altered Helper T Lymphocyte Function Associated with Chronic Hepatitis B Virus Infection and its Role in Response to Therapeutic Vaccination in Humans. *J Immunol* 1999; 162: 3088-3095.
17. Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, Penne G, Leroux-Roels G, Gigase P. Deficient T-cell response in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production. *Immunol Lett* 1994; 39:163-168.
18. Kardar G, Tehrani J, Shokri F. Diminished Th1 and Th2 cytokine production in healthy adult nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. *Scand J Immunol* 2002; 55:311-314.
19. Larsen CE, Xu J, Lee S, Dubey DP, Uko G, Yunis EJ, Alper CA. Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, nonresponders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine* 2000; 18: 3021-3030.
20. Carman W, Zanetti A, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336:325-329.
21. Grob P. Hepatitis B: virus, pathogenesis and treatment. *Vaccine* 1998;16:S11-16.
22. Guidotti L. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 2002; 20:A80-A82.
23. Abe M, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Inability of liver cells from mouse with experimental hepatitis to process and present specific antigens. *Hepatology Res* 2003; 26:61-67.

24. Zheng BJ, Zhou J, Qu D, Siu KL, Lam TW, Lo HY, Lee SS, Wen YM. Selective functional deficit in dendritic cell—T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004; 11:217-224.
25. Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Lohr HF, Bocher WO. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004;85:2829-2836.
26. Rahman F, Dahmen A, Herzog S, Bocher W, Galle P, Lohr H. Cellular and humoral immune responses induced by intradermal or intramuscular vaccination with the major hepatitis B surface antigen. *Hepatology* 2000; 31:521.
27. Chisari F, Ferrari C. Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1995; 13:29-60.
28. Bocher W. Reduced Hepatitis B Virus Surface Antigen-Specific Th1 Helper Cell Frequency of Chronic HBV Carriers is Associated With a Failure to Produce Antigen-Specific Antibodies in the Chimera Mouse. *Hepatology* 2000; 31:480-487.
29. Ramshaw I, Ramsay A, Karupiah G, Rolph M, Mahalingam S, Ruby J. Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev* 1997; 159:119-135.
30. Guidotti L, McClary H, Loudis JM, Chisari FV. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Exp Med* 2000; 191:1247-1252.
31. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39:36-42.
32. Ishikawa T, Kono D, Chung J, Fowler P, Theofilopoulos A, Kakumu S, Chisari FV. Polyclonality and Multispecificity of the CTL Response to a Single Viral Epitope. *J Immunol* 1998; 161:5842-5850
33. Reherrmann B, Lau D, Hoofnagle J, Chisari F. Cytotoxic T Lymphocyte Responsiveness after Resolution of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Clin Invest* 1996; 97:1655-1665.
34. Chisari F. Cytotoxic T Cells and Viral Hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 99:1472-1477.
35. Guidotti L, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari F. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science* 1999; 284:825-829.
36. Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, Moss B, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL, Kanagawa O, Chisari FV. Immunopathology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990; 248:361-364.
37. Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee R, Schlicht HJ, Fowler P, Guilhot S, Chisari FV. HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:10445-10449.
38. Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002; 195:1089-1101.
39. Bertoletti A, Maini M. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Immunol* 2000; 12:403-408.
40. Coates T, Wilson R, Patrick G, Andre F, Watson V. Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther* 2001; 23:392-403.
41. Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, Montes H, Soyano A, Diaz Y, Berrueta L. The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology* 2004; 326:20-28.
42. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-1253.
43. McNally JM, Dempsey D, Wolcott RM, Chervenak R, Jennings SR. Phenotypic identification of antigen-dependent and

- antigen-independent CD8 CTL precursors in the draining lymph node during acute cutaneous herpes simplex virus type 1 infection. *J Immunol* 1999; 163:675-681.
44. Grewal I, Flavell R. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Ann Rev Immunol* 1998; 16:111-135.
  45. Grewal I, Flavell T. The role of CD40 Ligand in costimulation and T-Cell Activation. *Immunol Rev* 1996; 153:85-106.
  46. Frauwirth K, Thompson C. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 2002; 109: 295-299.
  47. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:251-262.
  48. Redpath S, Ghazal P, Gascoign N. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 2001; 9:86-92.
  49. Hyodo N, Tajimi M, Ugajim T, Nakamura I, Imawari M. Frequencies of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2003; 27:109-116.
  50. Hyoung D, Byung L, Lyoung H, et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet* 2003;12:901-906.
  51. Moore K, R de Waal M, Corffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
  52. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante N, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte IFN- $\gamma$  production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178:1041-1048.
  53. Poe J, Wagner D, Miller R, Stout R, Suttles J. IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signalling of monocyte IL-1 $\beta$  synthesis and rescue from apoptosis. *J Immunol* 1997; 159:846-852.
  54. Koppelman B, Neeffjes J, de Vries J, R-Waal M. Interleukin-10 downregulates MHC class II  $\alpha\beta$  peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recyclin. *Immunity* 1997; 7:861-871.