

ARTICULOS ORIGINALES

ALGUNOS ASPECTOS INMUNOLOGICOS E INMUNOGENETICOS DE LA INFECCION CON EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB) Y DE LA APLICACION DE VACUNAS ANTIHEPATITIS B

ANTONIO IGLESIAS GAMARRA (1), EDUARDO EGEEA BERMEJO (2)

Hemos querido analizar las observaciones relacionadas con los estudios de inmunología celular asociada a la hepatitis B y a la vacuna. Desde el inicio de la década de los 80s se han practicado en el mundo numerosos estudios inmunológicos como: producción in vitro de anticuerpos, estudios de proliferación celular mediante antígenos solubles y mitógenos, estudios de subpoblaciones de células T, búsqueda de efectos del macrófago o de las células B y T, análisis de posibles trastornos en la generación de factores supresores. Observamos que muchos de estos estudios eran contradictorios y en los inicios de nuestro trabajo, a pesar del gasto excesivo que tuvimos tratando de producir anticuerpos in vitro anti-HBs, fue imposible lograrlo; por lo que decidimos hacer los estudios de cinética de proliferación celular y a través de la técnica del panning, en la cual utilizamos un anticuerpo monoclonal anti-CD8 que se une al plato de cultivo cuya superficie es de poliestireno, logramos así separar la subpoblación CD4 de la CD8; y posteriormente realizamos los experimentos de reconstitución que nos clarificó la hipótesis de Yunis y Alper sobre la no respuesta a un antígeno determinado; es decir, que la no respuesta se debe a un defecto en la estructura genética-inmunogenética durante la segregación y a una falla en la presentación antigénica.

Para lograr estas explicaciones hemos querido analizar los diferentes estudios y compararlos con el nuestro.

Finalmente creemos que usando las diferentes tablas se pueda analizar los datos. Es posible que aún queden muchas dudas, pero el tiempo y la investigación en esta área harán que se aclaren; creemos que en Colombia, al realizar los estudios básicos en nuestras etnias, el futuro será más promisorio y a corto plazo.

(1) Profesor Asistente Reumatología, Universidad Nacional de Colombia. Director Instituto Nacional de Salud.

(2) Director de la Sección de Inmunología e Inmunogenética de la Universidad del Norte, Barranquilla.

INTRODUCCION

La hepatitis B es la más frecuente de las hepatitis virales y desde 1983 sobrepasó la incidencia de la hepatitis A.

En 1971 se inició la elaboración de una vacuna contra la hepatitis B, la cual solo pudo ser efectiva a comienzos de 1980, cuando se logró prepararla del antígeno de superficie (HBsAg), extraído de individuos portadores crónicos (Heptavax-B) (1,2). Posteriormente, desde 1984, se ha venido utilizando la vacuna contra HVB producida en la levadura del *Saccharomyces cerevisiae* mediante la técnica del DNA recombinante (3). Ambas vacunas, además de ser eficaces y seguras han demostrado ser inmunogénicas en el 96-98% de adultos sanos que trabajan en centros de hemodialisis, y en el 85-96% de los hombres homosexuales (4,5).

En varios estudios que han utilizado ambos tipos de vacunas se ha logrado demostrar que entre el 5 y el 10% de los individuos aparentemente sanos no tienen una respuesta adecuada para generar anti-HBs, a pesar de reinmunización con una o dos dosis adicionales.

Además del costo y de la información adversa que circuló en los medios académicos sobre la posibilidad de adquirir el SIDA a través de la vacuna derivada del plasma, se desarrolló la vacuna mediante la técnica del DNA recombinante utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el gene que codifica el serotipo adw2 del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; fue así como la Smith Kline Biological desarrolló la vacuna ENGERIX-B (6). Recientemente el Instituto de Biotecnología de Cuba también ha desarrollado una vacuna contra la hepatitis B por medio de la técnica del DNA recombinante.

El comportamiento de la vacuna contra la hepatitis B en estudios in vitro, tanto en murinos como en el ser humano, es fundamental para entender la respuesta inmunitaria por ella inducida y su relación con la inmunogenética; para ello es importante puntualizar algunos conceptos básicos.

Iniciando la década del 70, Benacerraf y col. (7,8) Mac Devitt y col. (7) demostraron que los

genes de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) determinaban la respuesta de los linfocitos T a antígenos específicos. Posteriormente Rosenthal y Shevach (9) comprobaron que los linfocitos T solamente reaccionan a antígenos extraños, si éstos son presentados por células del sistema monocito-macrófago, llamadas células presentadoras de antígeno. Simultáneamente Katz, Hamoaka, Dorf y Benacerraf (10) observaron que la respuesta de las células T cooperadoras y de las células B está restringida por las moléculas Ia. Las células T cooperadoras tienen un papel corregulador del sistema inmune y son necesarias para la inducción de células T citotóxicas así como para la producción de anticuerpos a antígenos proteicos y la inducción de respuesta anamnésica para la producción de anticuerpos a antígenos proteicos. En esta inducción de respuesta anamnésica para la producción de anticuerpos por las células B, las células Tc actúan como célula efectora en la muerte de blancos tumorales por una vía directa o indirecta a través de la secreción de linfoquinas o gamma interferón.

Todo lo anterior determina cierta especificidad de los linfocitos T al interactuar con las moléculas de clase II sobre el macrófago (Mφ) y condiciona la respuesta de acuerdo con el haplotipo a determinados antígenos (solubles, proteínas, partículas virales, etc.). Cinco explicaciones han sido propuestas para determinar la respuesta o no a determinados antígenos: 1) La primera es la de Rosenthal (9) y Benacerraf (7,8,10) quienes postulan el concepto de la selección determinante, es decir, que la interacción de las moléculas Ia con determinados antígenos sobre la superficie celular de las células presentadoras de antígenos posee ciertas restricciones en la orientación de las moléculas, en su capacidad para unirse al receptor de las células T; 2) la segunda interpretación es sustentada por Von Boehmer, Haas y Jerne (11) y modificada por Fox, Schwartz y col. (11A) plantean que la respuesta a determinados antígenos es el resultado de la selección clonal en el proceso de diferenciación de las células T; 3) el tercer concepto es el de la inmunodominancia de Berzofsky (12,13) en el cual las respuestas de las células T a determinados antígenos proteicos depende del número de sitios antigénicos que pueden ser presentados por las moléculas de Clase II y de la habilidad para unirse a la molécula del receptor de las células T (r.c.T); 4) hace relación a un defecto

en el procesamiento del antígeno y 5) una falla estructural en la unión del r.c.T y la molécula de clase II.

Las alteraciones anteriores en la respuesta, adecuada o inadecuada, ante un antígeno determinado se han podido observar cuando existe una disminución de la respuesta proliferativa a antígenos específicos y lectinas como ocurre en pacientes con una serie de infecciones y en individuos normales que han sido vacunados con dichos patógenos. Un defecto en la no respuesta a diferentes antígenos y productos patógenos ha sido descrito con el virus de la inmunodeficiencia tipo I (HIV-I) (14), con las glicoproteínas de su envoltura (15), con el antígeno HBs Ag (16), con la vacuna para el virus de la hepatitis B (Heptavax-B) (17), con productos bacterianos del *Staphylococcus aureus* (18), toxoide tetánico (19), *Bordetella pertussis* (20), *Micobacterium ulcerans* (21), parásitos como *Toxoplasma gondii* (22). Muchas de las explicaciones ofrecidas por diferentes autores están relacionadas con un efecto citotóxico directo y con la inducción de células o con mecanismos supresores (23,24).

En 1977 Spencer y col (25) demostraron una respuesta baja en la producción de anticuerpos después de la vacunación contra el virus de la influenza tipo A y notaron que dicha respuesta se asociaba al HLA tipo BW16; en 1978 Sasasaki y col (19) observaron que dos semanas después de administrar una inyección del toxoide tetánico (TT) a un grupo de estudiantes de medicina, en el 84.8% había una respuesta proliferativa de células T y el 15.2% no presentaba respuesta al TT.

Matsushita, Sasasaki y col (26) pudieron establecer que en la población japonesa existe una serie de individuos sanos que no responde a la *Criptomeria japonicum*, al antígeno de la pared del estreptococo (27), al antígeno de *Schistosoma japonicum* (28) y que dicha falta de respuesta a estos antígenos según Sasasaki y col (19, 23-28) estaba controlada por los genes de supresión asociada al HLA, vía células CD8. Milich y Chisari (29,30), en 1982, demostraron que la respuesta baja o la ausencia de respuesta al HBs Ag en murinos estaba directamente relacionada con los haplotipos H-2. Comprobaron también que la respuesta proliferativa de las células

T al HBs Ag en los ratones respondedores, en los no respondedores y en los F1 (respondedores x no respondedores) de cepas congénicas H-2 confirma la restricción H-2 específica al HBs Ag. Además esta restricción se hace extensiva a la respuesta proliferativa específica de células T y a la producción de anticuerpos in vitro; identificaron dos genes ligados a la respuesta inmune a través del H-2; uno de estos genes se encuentra mapeado en la subregión I-A y otro en la subregión I-C; y por último demostraron que la respuesta proliferativa y la producción de antígenos a la región S de las cepas congénicas H-2 y las cepas recombinantes intra-H2 indicaban que los genes Ir influyen la producción in vitro y la respuesta proliferativa a las células T (31). El mismo grupo determinó que la subregión I-A influye a algunos subtipos y grupos específicos en la respuesta proliferativa T subtipo- específica. Berkower y col (13), han podido afirmar que la respuesta o no respuesta a la mioglobina depende de la inmunodominancia de la combinación epítope - Ia, debido a un limitado repertorio de las células T o a una presentación selectiva del epítope o los epítopes de una molécula a las moléculas de clase II por las células A.P.C. (células presentadoras del antígeno).

La respuesta o falta de respuesta proliferativa HBsAg se encuentra restringida en los antígenos de clase I y especialmente de los antígenos de clase II.

Celis y Chang (32-34) estudiaron en 1984 la respuesta proliferativa de los linfocitos de individuos vacunados contra HBsAg in vitro; para ello utilizaron dos clones (HBC-6 y HBC-13) de linfocitos T cooperadores específicamente contra HBsAg y demostraron la respuesta proliferativa de dos o tres días de incubación con el HBsAg a una concentración de 5 ug/ml y simultáneamente le agregaban el anti-HBs a una concentración de 20 ug/ml. Utilizando tanto el antígeno como el anti-HBs obtenían una respuesta proliferativa adecuada. El mismo grupo observó que 10 días después de la tercera inmunización, al realizar un estudio de proliferación celular con el HBsAg a una concentración 20 ug/ml por 7 días, suplementando el medio de cultivo con interleukina2 (IL-2), encontraron que 6 de 12 individuos tenían una alta respuesta proliferativa, mientras en 2 de los vacunados, está fue insignificante.

La respuesta de célula B, analizada por el método de P.F.C. (plaque-forming antibody secreting cells) mostró solo de 5 a 15 placas positivas, a los 7 a 10 días de inmunización in vitro; por este escaso número de placas fue difícil concluir una relación dosis/respuesta. Llama la atención que en este estudio de proliferación celular se mencionan varias concentraciones de HBsAg, no claramente indicadas y que la respuesta proliferativa no se correlaciona con la producción de anticuerpos in vitro, en los vacunados. No realizaron controles con antígenos solubles o lectina, ni se conoció el haplotipo de los individuos. Cupps y col (35) aún cuando observaron un incremento en la producción de anti-HBs IgG in vitro, no encontraron evidencia de supresión no específica para HBsAg. Nuestro estudio fue realizado en individuos a los cuales se les conocía su haplotipo y se inició tratando de encontrar la dosis que indujera una adecuada proliferación celular; ésta se obtuvo con 0,1 ug/ml y 0,2 ug/ml; se inducía una menor capacidad proliferativa al incrementar la dosis a 1 ug/ml; con 5 a 10 ug/ml la respuesta decrecía, por lo que planteamos la posibilidad de que la mayor concentración de antígenos pudiese tener un efecto tóxico (figura 1). Fue posible demostrar que la especificidad de la respuesta de células T al HBsAg era T específico, ya que al evaluar en forma simultánea en un estudio cinético (3o., 5o., 7o. y 9o. días) utilizando para ello otro antígeno soluble con el TT y las lectinas como la fitolaca americana (PWM, Pokeweed mitogen) y la fitohemaglutinina (PHA), nuestros sujetos no respondedores, no lo hacen al HBsAg, pero sí a los otros antígenos como TT, PHA y PWM, excepto en uno de los casos, que fue bajo respondedor al TT (36).

Los respondedores al HBsAg lo hicieron en forma creciente, pero disminuyó en ellos la respuesta al TT al 7o. y 9o. días y al PHA al 5o. y 7o. días. Respecto al PWM la respuesta es variable, lo que nos demuestra que nuestros individuos respondedores tienen una respuesta específica al HBsAg. Pero la respuesta tanto al HBSAg como al TT y a las lectinas tiene variabilidad individual (36) (tabla 1).

Al realizar los experimentos de proliferación de células T al HBsAg por el método de depleción de las células CD8+, tratando de analizar la falta de respuesta HBsAg, utilizamos la técnica del panning

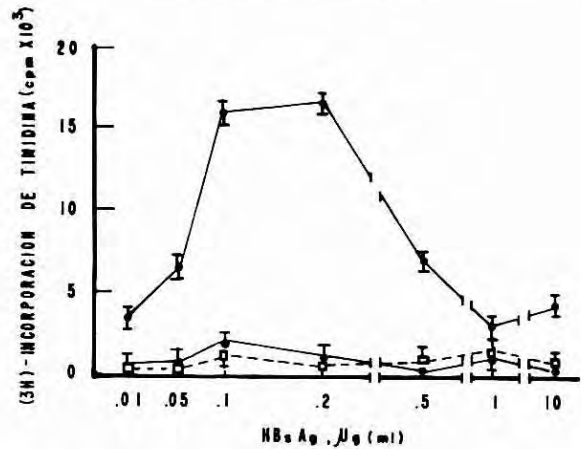


Fig. 1. Respuesta proliferativa a las diferentes concentraciones del HBsAg. Los datos se expresan como cpm ± SE. Tomado J. Exp. Med. 1991, 173: 531-538. Ref. 36.

(fraccionamiento de células T o B, que se adhieren a un plato de cultivo al que se le ha cubierto un monoclonal específico). Las células T que habían sido desprovistas de CD8, al mezclarlas con los macrófagos y cultivadas posteriormente con y sin el HBsAg, TT y las lectinas como PHA y PWM, la respuesta de los respondedores a los diferentes antígenos solubles y lectinas fue adecuada. Todos los individuos respondedores como no respondedores, dieron respuesta al PHA, pero en los no respondedores la respuesta al PHA es mayor que en los respondedores. La respuesta al PHA se disminuye al 7o. día, tanto en los respondedores como en los no respondedores; esta respuesta coincide con los hallazgos de Filion y col (16,17). Al adicionar las células CD8+, los no respondedores al HBsAg no tuvieron respuesta proliferativa a diferencia de los respondedores, especialmente en uno de ellos en quien la respuesta proliferativa fue bastante alta. Sólo en uno de los respondedores encontramos que al adicionar las células CD8T+ la respuesta proliferativa al 7o. día al TT en la reconstitución se disminuía.

Estos experimentos permiten concluir que las células CD8+: 1) no interfieren en la respuesta al HBsAg en los individuos respondedores; 2) demuestran una especificidad en la respuesta al HBsAg; 3) la respuesta proliferativa no depende del número

Tabla 1. OPTIMA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS AL HBsAg, TETANOS TOXOIDE, PNA, PWM EN INDIVIDUOS VACUNADOS CONTRA EL VHB.

| | HBsAg | | | TOXOIDE TETANICO | | | PNA | | | PWM | | | |
|------------------|-------|---------------|----------------|------------------|-------------|----------------|------|-------------|-----------------|-------|-------------|----------------|------|
| | NADA | 0.2 µg/ml | SI | NADA | 10 µg/ml | SI | NADA | 0.5 µg/ml | SI | NADA | 0.5 µg/ml | SI | |
| NO RESPONDEDORES | 1 | 906 ± 125 | 961 ± 279 | 1.1 | 906 ± 125 | 3.434 ± 855 | 3.8 | 455 ± 91 | 62.068 ± 1.196 | 136.4 | 2.888 ± 789 | 18.505 ± 1.045 | 6.8 |
| RES | 2 | 5.258 ± 279 | 5.044 ± 2.180 | 1.0 | 5.258 ± 975 | 84.477 ± 8.470 | 16.1 | 1.557 ± 310 | 77.420 ± 4.616 | 49.4 | 768 ± 131 | 14.683 ± 1.105 | 19.0 |
| | 3 | 1.639 ± 614 | 1.806 ± 186 | 1.1 | 5.465 ± 861 | 17.783 ± 1.168 | 3.3 | 507 ± 62 | 48.724 ± 2.410 | 86.1 | 1.637 ± 614 | 11.141 ± 487 | 6.8 |
| | 4 | 7.564 ± 1.715 | 8.690 ± 512 | 1.0 | 6.509 ± 482 | 56.508 ± 3.835 | 8.7 | 238 ± 89 | 39.638 ± 1.162 | 120.0 | ND | | |
| RESPONDEDORES | 1 | 103 ± 26 | 39.630 ± 5.810 | 384 | 4.768 ± 639 | 31.021 ± 1.409 | 6.5 | 394 ± 98 | 96.721 ± 9.157 | 245 | 456 ± 98 | 9.196 ± 720 | 20.0 |
| | 2 | 320 ± 75 | 52.835 ± 6.952 | 165 | 828 ± 278 | 4.816 ± 403 | 5.8 | 1.287 ± 481 | 111.187 ± 7.005 | 86 | 2.007 ± 939 | 19.344 ± 340 | 9.1 |
| | 3 | 1.448 ± 200 | 43.882 ± 1.210 | 30 | 688 ± 285 | 1.880 ± 546 | 2.7 | 1.730 ± 387 | 133.036 ± 1.020 | 77 | 1.448 ± 200 | 48.686 ± 1.750 | 32.0 |

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO $\bar{x} \pm ISD$ EN CULTIVOS Y POR TRIPLICADOS. LOS RESULTADOS DE PROLIFERACION SON TOMADOS A NIVEL DEL MAXIMO PICO DE ESTIMULACION POR EL ANTIGENO O EL NITROGENO.

* SI: INDICE DE ESTIMULACION \bar{x} DE LAS CELULAS O EN CULTIVO CON EL Ag (HBsAg O EL MITOGENO) \bar{x} SIN EL ANTIGENO O MITOGENO. SE UTILIZARON 100.000 LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN UN VOLUMEN FINAL DE 200 µl. POR TRIPPLICADO.

TOMADO J. EXP. MED. 1991; 173: 531-538 REF: 36

absoluto del CD8 y CD4, ya que se utilizó el mismo número de células y la respuesta fue variable de acuerdo al individuo; 4) la respuesta proliferativa en los respondedores al HBsAg, al TT y a las lectinas fue adecuada; 5) no se encontró respuesta al HBsAg en los respondedores, pero si hubo respuesta adecuada al TT y a las lectinas; 6) la variabilidad de las respuestas, tanto en los no respondedores como en los respondedores al HBSAg, al TT y a las lectinas se observó en los experimentos de depleción al 7o. día como en la respuesta cinética (al 3o., 5o., 7o. y 9o. días) (tabla 2) (7), nuestros resultados difieren de los publicados por Tremolada y col (37), Barnaba y col (38-40), Filion y col (16, 17), Watanabe y col (41), Hirayama y col (24), Sasazuki y col (19, 23, 26, 27, 42-44), quienes demuestran por diferentes técnicas que la falta de respuesta al HBsAg se debe a trastornos en la inmunorregulación, mediados por genes de inmunosupresión, o por las células CD8+.

Pese a la multiplicidad de investigaciones realizadas tratando de explicar el mecanismo de no respuesta por un defecto inmune mediado por células o mediadores solubles esta búsqueda debe continuar. Dusheiko y col (45) analizaron si existía un defecto de los linfocitos T en los individuos portadores crónicos y para ello estudiaron sus linfocitos in vitro. Hicieron experimentos de co-cultivos utilizando linfocitos T irradiados de individuos controladores portadores crónicos de HBsAg y los cultivaron con linfocitos B de respondedores alogénicos. Demostraron que las células B respondedoras al

HBsAg producen cantidades detectables de IgG anti HBS entre el 4o. y 8o. días de cultivo, pero si tomaban linfocitos T de individuos portadores crónicos de HBsAg y les agregaban células de respondedores anti-HBs, en 8 de 24 portadores crónicos no encontraron producción de anti-HBs y terminan planteando que posiblemente existe un defecto en las células T cooperadoras para incrementar la producción de anti-HBs; pero los diferentes autores no separaron subpoblaciones y además no conocían el haplotipo de los individuos estudiados. Otros estudios sobre los mecanismos funcionales de tipo celular en hepatitis son contradictorios; Tremolada y col (37) en 1980, Chisari y col en 1981 (46) encontraron un defecto en la inducción de proliferación celular, pero los últimos no evidenciaron la alteración de las células efectoras citotóxicas. Chang y col (47) concluyen que la respuesta proliferativa al HBsAg y depletarlos de rosetas E+ con anticuerpos monoclonales OKT3 y complemento no encontraron proliferación. Hanson y col (48) en 1984 demostraron una alteración en la respuesta inmunitaria especialmente de tipo celular y no vieron respuesta proliferativa en individuos que son portadores crónicos al HBsAg. Barnaba y col (39, 40) hallaron reducción de las células CD4 y disminución de la relación CD4/CD8 en pacientes con infección crónica por VHB comparando con individuos controles. Al utilizar experimentos de co-cultivos alogénicos entre linfocitos B y linfocitos T que son respondedores en la producción de anticuerpos, encontraron un defecto de las células B. El mismo grupo (39, 40) demostró que la eliminación de las células

TABLA 2 COMPARACION DE LA RESPUESTA DE LAS CELULAS, CD4⁺ A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B CON Y SIN LINFOCITOS CD8

| SUJETOS | MEDIOS | | | | HBsAg | | | | TETANOS TOXOIDE | | | |
|---------------|-----------------|---------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|-----------------|------|--|--|
| | CD4 + M* | CD4 + CD8 + M | CD4 + M | SI | CD4 + CD8 + M | SI | CD4 + M | SI | CD4 + CD8 + M | SI | | |
| NO RESPONDE. | 1 1,491 ± 140 | 1,322 ± 141 | 1,334 ± 139 | 0.0 | 1,105 ± 145 | 0.03 | 10,790 ± 879 | 12.3 | 8,310 ± 386 | 6.2 | | |
| DORES | 2 6,576 ± 2,116 | 7,302 ± 1,116 | 7,366 ± 1,264 | 1.1 | 7,400 ± 106 | 1.02 | 56,964 ± 2,754 | 8.7 | 62,878 ± 4,340 | 8.6 | | |
| | 3a 2,455 ± 325 | 3,512 ± 305 | 2,824 ± 642 | 1.1 | 3,385 ± 373 | 0.96 | 6,011 ± 842 | 2.5 | 3,375 ± 473 | 1.0 | | |
| | 3b 874 ± 644 | 803 ± 324 | 1,174 ± 530 | 1.3 | 818 ± 121 | 1.01 | 1,885 ± 367 | 2.1 | 1,731 ± 103 | 2.2 | | |
| | 4 1,226 ± 172 | 945 ± 27 | 1,235 ± 243 | 1.0 | 893 ± 132 | 0.94 | 3,607 ± 248 | 2.9 | 2,647 ± 289 | 2.8 | | |
| RESPONDEDORES | 1 1,554 ± 152 | 3,591 ± 2,304 | 5,137 ± 495 | 3.3 | 10,497 ± 495 | 2.9 | 35,206 ± 6,619 | 22.6 | 35,208 ± 2,475 | 9.8 | | |
| | 2 2,268 ± 396 | 2,698 ± 669 | 42,570 ± 2,835 | 18.8 | 32,897 ± 4,009 | 12.2 | 8,645 ± 417 | 3.8 | 3,863 ± 2,522 | 1.4 | | |
| | 3 205 ± 121 | 115 ± 19 | 3,172 ± 911 | 15.5 | 3,902 ± 211 | 33.8 | 19,335 ± 2,789 | 94.3 | 4,700 ± 632 | 40.9 | | |

* M = MONOCITOS DE SANGRE PERIFERICA, CD4 = LINFOCITOS CD4⁺, CD8 = LINFOCITOS, CD8⁺
SI = INDICE DE ESTIMULACION

TOMADO J. EXP. MED. 1991; 173:531-538 REF. 36

CD8T+ incrementaba la respuesta proliferativa al HBsAg pero sin afectar la respuesta a PPD o a Candida y dicha respuesta no se afectaba al depletarlo de CD4+. No utilizaron la técnica del panning, ni se conocía el haplotipo de estos individuos. Filion y col (16, 17) plantean también la posibilidad de que las células CD8T+ controlen la magnitud de la respuesta blastogénica al HBsAg y posiblemente participen en el descenso regulatorio de la respuesta anti-HBs. Nowicki y col (49) demostraron que los no respondedores tenían un incremento en el porcentaje de células T11+, HNK-1+ (subpoblación de células NK) y CD8 por inmunofluorescencia; nosotros no encontramos diferencia entre los respondedores y no respondedores en cuanto a las subpoblaciones CD8, ni en las subpoblaciones CD4, tales como 4B4 y 2H4.

La intensidad relativa de los antígenos CD4T+, CD4+2H4+ (subpoblación de células Tc inductoras de supresión) y CD8 es moderada tanto en los individuos respondedores como en los no respondedores, siendo muy baja esta intensidad en la expresión de los antígenos de clase II en estos mismos individuos y alta en las células CD4+ 4B4 (inductores de ayuda) en los sujetos respondedores y no respondedores (36). La intensidad del antígeno CD3 es mayor en los individuos no respondedores que en los respondedores (36).

Yamauchi y col (50) observaron que la supresión de la producción de anticuerpos en los portadores crónicos se debe a la presencia de un factor supresor. Chiou y col (51) y el mismo Yamauchi (50) demuestran que en las etapas tempranas es decir dos sema-

nas después de la última vacunación, el defecto de la no respuesta se debe a una alteración en el repertorio de las células B, y en una etapa más tardía, cuatro semanas después de la última vacunación, la falta de respuesta obedece a la existencia de células T supresoras.

A pesar de que el estudio de las citoquinas, producción de anti-HBs y proliferación celular no llega a claras conclusiones sí permite notar que tanto la IL-2 como el receptor de la IL-2 (TAC), juegan un papel importante en la activación y regulación de la respuesta inmune. Normalmente las células T en reposo no expresan significativamente esos receptores sobre la superficie, pero cuando estas células son estimuladas por mitógenos o antígenos el receptor de IL-2 se expresa en la membrana celular y además el péptido de 55 kd (TAC positivo), puede ser liberado en el sobrenadante. Algunos estudios han probado que el péptido TAC (IL-2 receptor) soluble se encuentra elevado, tanto en los individuos con hepatitis B aguda como en los pacientes con hepatitis crónica. Estos hechos sugieren que la activación de las células T podrían jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Recientemente estudios bien documentados han demostrado que el péptido S1 y el antígeno pre-S1 del HBsAg son altamente inmunogénicos y exhiben gran actividad proliferativa, lo que estaría de acuerdo con la teoría de la inmunodominancia.

Después de estudiar las diferentes publicaciones con respecto a la producción in vitro de anticuerpos, proliferación celular, ensayos de inmunorregulación

y de depleción celular, el análisis de nuestros hallazgos demuestra que la no respuesta al HBsAg obedece a un mecanismo de restricción periférica de acuerdo con lo demostrado por Craven y col (52), Alper y col (53) y no está relacionado con mecanismos de genes de supresión ni a través de las células CD8T+, sino que la falta de respuesta se encuentra en la interacción antígeno-macrófago y células CD4T+ y esta carencia de respuesta es de tipo multifactorial (inmunogenética, teoría de la inmu-

nodominancia, defecto en el procesamiento antigénico, depleción del repertorio en la diferenciación temprana de las células T en la selección positiva en el proceso ontogénico que induciría a un defecto estructural en la unión del receptor de las células T y la molécula de clase II durante el proceso de la presentación antigénica); lo que aún no se ha podido definir es la subpoblación de células T cooperadora (CD45 ó CD29), o un defecto del macrófago.

TABLA 3
DIFERENTES ESTUDIOS DE HLA Y ASOCIACION CON LA HEPATITIS B

| HAPLOTIPO EXTENDIDO | COMPLOTIPO | FUNCION O DEFECTO | AUTOR |
|--|---|---|---|
| 1. B8DR3 | | Defecto a nivel de la fagocitosis | Sengar y col. 1975 (56) |
| 2. B8DRw3 | | Hepatitis crónica activa Defecto en la fagocitosis | Mackay y col. 1980 (58) |
| 3. HLA-DR7 | | No respuesta | Walter y col. 1981 (54) |
| 4. B44, DR7/B8,DR3 | FC31/SCOI | Pobre respuesta | Craven y col. 1986 (52) |
| 5. No Marcadores | | No Base Genética | Krawitt y col. 1987 (62) |
| 6. B8DR3 | | Defecto del Fenotipo | Caruso y col. 1988 (57) |
| 7. HLA -Bw54, DR4, DRw53 | | Genes inductores de supresión | Watanabe y col. 1988 (41) Sasazuki y col. (23, 42, 43, 44) |
| 8. B5 - Sero positivo B13 - No respondedores A3 y B35 - Reacción local | | | Matej-H y col. 1988 (59) |
| 9. HLA - Bw35 - Cw4 | | Hepatitis crónica activa | Tanasescu y col. 1988 (60) |
| 10. HLA -A10, B12, Cw5, DR3, DR5 | | No respuesta | Kramer y col. 1988 (61) |
| 11. GLA - B8, DR3, | C2 ^X C, C4A ^X QO C4BQO BF ^X S | C4A ^X QO | Alper y col. 1989 (53) |

La respuesta y no respuesta al HBsAg también se encuentra restringida en los antígenos de clase I y II. La frecuencia de los antígenos de clase I en tres estudios realizados en la población caucásica, en los no respondedores al HBsAg se ha asociado al B8 y en la japonesa el BW54. Walker y col (54) mostraron un incremento de DR7 en el 61% y una ausencia del DR1 entre los no respondedores. Weissman y col (55) mostraron una alta prevalencia de DR7, DR3; DR7, DR4; y DR7+B8 y no encontraron haplotipos extendidos en los no respondedores. Craven y col (52) observaron una alta incidencia de DR3 y a la vez dos haplotipos extendidos: el [HLA B8, SCO1, DR3], y el [HLA-B44, FC31, DR7].

Alper y col (53) por primera vez en el humano encuentran que personas homocigotas para el haplotipo extendido [HLA B8, SCO1, DR3] tienen una pobre respuesta al HBsAg y es de carácter recesivo y demuestran que un solo haplotipo que se herede como dominante es suficiente para tener una respuesta adecuada anti-HBs. Este estudio está en contraposición con los realizados por Sasasaki y col (41) quienes postulan que el haplotipo japonés [HLA-BW54, DR4, DRW53, DQW3] que se asocia a los no respondedores del HBsAg es de carácter dominante y a la vez la no respuesta depende de un gene de inmunosupresión a través de las células CD8 (tabla 3).

Finalmente nuestros resultados indican que los sujetos no respondedores tienen un defecto específico en la presentación antigénica sobre la estimulación de las células T cooperadoras. Nuestros hallazgos sugieren que esta ausencia de respuesta a la vacuna de la hepatitis B no es mediada por mecanismos de supresión a través de las células CD8T. Lo que no hemos podido identificar es la subpoblación CD4T tales como la CD29T o la CD45T. Este defecto de la presentación antigénica (Mo) o de las células CD4T es consistente con la herencia recesiva de la no respuesta y sugiere que la respuesta se hereda en forma dominante (36).

Deulofeut, Alper, Yunis y col. demostraron los mismos hallazgos utilizando no la molécula completa de la vacuna recombinante de la hepatitis B, sino epitopes de ésta, por lo que corrobora aún más nuestros resultados.

SUMMARY

The purpose of this review is to present results of studies realized on Hepatitis B cell mediated immunology as well as on the immune response to Hepatitis B vaccine.

Since 1980, several studies on this subject has been published, some of them dealt with antibody production, cell proliferation under antigen and mitogens stimulation, defects on T cell, B-T cells and macrophages; some of these studies, are contradictions.

Using monoclonal antibodies against CD8, binded to polystyrene plate we were able to separate CD4 sub-populations and perform experiments trying to explain the non-response to specific antigen, which seems to be due to a failure in antigen presentation.

BIBLIOGRAFIA

1. Szmuness W, Stevens CE, Zang EA, et al. A controlled clinical trial of the efficacy of the Hepatitis B Vaccine (Heptavax B), A final report. *Hepatology* 1981; 1: 377.
2. Valenzuela P, Medina A, Ruther WJ, et al. Synthesis and Assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; 298.
3. Jilg W, Schidt M, Zuole KG, et al. Clinical Evaluation of a recombinant hepatitis B Vaccine. *Lancet* 1984; 2: 1174.
4. Francis DP, Hadler SC, Thompon SE, et al. The prevention of hepatitis B with vaccine: report of CDC. multi-Center efficacy trial among homosexual men. *Ann Intern Med* 1982; 97: 362.
5. Szmuness W, Stevens CE, Hardley EJ, et al. Hepatitis B Vaccine in medical Staff of hemodialysis units: efficacy and subtype cross-protection. *N. Engl. J Med* 1982; 307:1481.
6. Petre J, Van Wijnendaele F, De Neys B, et al. Development of a hepatitis B Vaccine from transformed yeast cells. *Postgraduate Med J.* 1987, 63 (Suppl 2): 73.
7. Bencerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility linked immune response genes. *Science* 1972; 175:273.

8. **Benacerraf B.** A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of the I region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. *J Immunol* 1978; 120: 1809.
9. **Rosenthal AS, Shevach EM.** Function of macrophages in antigen recognition by Guinea pig T lymphocytes I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* 1973; 138: 1194.
10. **Katz DH, Hamaoka T, Dorf ME, et al.** Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes the H-2 gene complex determines successful physiologic lymphocyte interactions. *Proc Nat Acad Sci USA* 1973; 70: 2624.
11. **Von Boehmer H, Hass W, Jerne NK.** Major Histocompatibility complex-linked immunoresponsiveness in acquired by Lymphocytes of low-responder mice differentiation in thymus of high responder mice. *Natl-Acad Sci USA* 1978; 75: 2439.
- 11A. **Fox BS, Carbone FR, Germain RN, et al.** Processing of a minimal antigenic peptide alters its interactions with MHC molecules. *NATURE* 1988; 331:538.
12. **Berkower I, Buckenmeyer GK, Gurd FRN, et al.** A possible immunodominant epitope recognized by murine T lymphocytes of Low-responder mice differentiation in thymus of high responder mice. *Natl Acad Sci* 1982; 79:4723.
13. **Berkower I, Kawwamura H, Matis LA, Berzofsky JA.** T cell clones to two major T cell epitopes of myoglobin: Effect of I-A/I-E restriction on epitope dominance *J Immunol* 1985; 135: 2628.
14. **Eales LJ, Parkin JM.** Current concepts in the immunopathogenesis of AIDS and AIDS and HIV infection. *Br Med J.* 1988; 44: 38.
15. **Mann DL, Lazane F, Popovic M, et al.** HTLV-III Large envelope protein suppresses PHA induced lymphocyte blastogenesis *J Immunol* 1987; 138: 2640.
16. **Filion LG, Saginur R; Szczerbak N.** Humoral and cellular immuneresponses by normal individuals to hepatitis B surface antigen vaccination. *Clin Exp Immunol* 1988; 71: 405.
17. **Filion LG, Saginur R, Izaguirre CA.** Phytohemagglutinin mitogenic response of normal individuals vaccinated with hepatitis B vaccines. *J infect Dis* 1989; 160: 398.
18. **Holly M, Linys, Rogers TJ.** Induction of suppressor cells by staphylococcal enterotoxin B: Identification of a suppressor cell circuit in the generation of suppressor-effector cells. *Immunology* 1988; 64: 643.
19. **Sasasaki T, Konoy, Iwamoto I, et al.** Association between HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid. *Nature* 1978; 272:359.
20. **Arora PK, Sekura RB, Hanna EE.** Suppression of the cytotoxic T lymphocyte response in mice by pertussi toxin. *Cell* 1987; 110: 1-6.
21. **Pimsler M, Sponsler TA, Meyers WN.** Immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. *J Infect Dis* 1988; 157: 577.
22. **Luft BJ, Pedrotti PW, Remington JS.** In vitro generation to adherent mononuclear suppressor cell of toxoplasma antigen. *Immunology* 1988; 63: 643.
23. **Sasasaki T, Kikuchi I, Hirayama KO, et al.** HLA-linked Immune suppression in humans. *Immunology* 1989; 65 (suppl 2): 21.
24. **Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, et al.** HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response in humans. *Nature* 1987; 327: 426.
25. **Spencer MJ, Cherry JD, Terasaki PI.** HLA antigens and antibody response after influenza A vaccination. Decreased response Associated with HLA type BW16 *N Engl J Med* 1977; 297: 692.
26. **Matsushita S, Muto M, Suemura M, et al.** HLA-Linked nonresponsiveness to *Cryptomeria japonica* pollen antigen I. Nonresponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T- cells. *J Immunol* 1987; 138: 109.
27. **Nishimura Y, Sasasaki T.** Suppressor T cells control the HLA- linked low responsiveness to streptococcal antigen in man. *Nature (Lond.)* 1983; 298:347.
28. **Ohta N, Minai M.** Antigen-specific suppressor T lymphocyte (Leu 2a + 3a) in human Schistosomiasis japonica. *J Immunol* 1983; 131: 2524
29. **Milich DR, Chisari FV.** Genetic regulation of the immune response to the murine humoral immune response to the a and d determinants of HBsAg *J Immunol* 1982: 129:320.
30. **Milich DR, Leroux-Roels GG, et al.** Genetic regulation of the immune response to hepatitis B surface-antigen (HBsAg) IV. Distinct H-2 linked Ir genes control antibody responses to different HBsAg determinants on the same molecule and map to the I-A and I-C sub-regions. *J Exp Med* 1984; 159: 41.
31. **Milich DR, Leroux-Roels GG, et al.** Genetic regulation of the immune response to the hepatitis B surface antigen (HBsAg) II. Qualitative characteristics of the humoral-immune response to the a, d and determinants of HBsAg. *J Immunol* 1983; 130: 1395.

32. Celis E, Chang TW. Antibodies to hepatitis B surface antigen potentiate the responses of human T lymphocyte clones to the same antigen. *Science (Wash. DC)*. 1984; 224:297.
33. Celis E, Kung PC, Chang TW. Hepatitis B virus reactive human T lymphocyte clones: antigen specificity and helper function for antibody synthesis. *J Immunol* 1984; 132: 1511.
34. Celis E, Zarawsky VR, JR, Chang TW. Regulation of T cell clones to hepatitis B surface antigen by antigen-specific monoclonal antibodies. *Proc Acad Sci USA* 1984; 81: 6846.
35. Cupps TR, Gerin JL, Purcell RH, et al. In vitro antigen in man: induced antibody responses to hepatitis B surface antigen, Kinetic and cellular requirements. *J Clin Invest* 1984; 74: 1204.
36. Egea E, Iglesias A, Salazar M, et al. The cellular basis for lack of antibody response to Hepatitis B Vaccine in Humans. *J Exp Med* 1991. 173: 531.
37. Tremolada F, Fattovich G, Panebianco G, et al. Suppressor cell activity in viral and non-viral chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1980; 40: 89.
38. Barnaba V, Musca A, Cordova C, et al. Relationship between T cell subsets and suppressor cell activity in chronic hepatitis B virus (HBV) Infection *Clin. Exp Immunol* 1983; 53: 281.
39. Barnaba V, Valesini G, Leurero M, et al. Immunoregulation of the in vitro anti-HBs antibody synthesis in chronic HBsAg carriers and in recently boosted anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol* 1985; 60: 259.
40. Barnaba V, Leurero M, Van Dyke AD, et al. T cell subsets in the hyporesponsiveness to Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) and antigen-specific suppressor lymphocytes in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Immunol Immunopath* 1985; 34: 284.
41. Watanabe HS, Matsushita K, Nobuhiro K, et al. Immunosuppressor gene on HLA-Bw54, DR4, DRw53 haplotype controls nonresponsiveness in humans to hepatitis B surface antigen via CD8+ suppressor T cells. *Human Immunol* 1988; 22:9.
42. Sasazuki T, Nichimura Y, Muta M, et al. HLA-linked genes controlling the immune response and disease susceptibility. *Immunol Rev* 1983; 70: 51.
43. Sone T, Tsakamoto K, Hirayama K, et al. Two distinct class II molecules enclosed by the genes within HLA-DR subregion of HLA-DR2 and DQw2 can act as stimulating and restriction molecules. *J immunol* 1985; 135: 1288.
44. Kikuchi I, Ozawa TM, Hirayama K, et al. An HLA-linked gene control susceptibility to lepromatous leprosy through T cell regulation. *Lepr Rev*. 1986; 57 (suppl 2): 139.
45. Dusheico GM, Hoofnagle JH, Cookley WG, et al. Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest* 1983; 1104.
46. Chisari FV, Castle KL, Xavier C, et al. Functional properties of lymphocyte subpopulations an hepatitis B virus infection I. Suppressor cell control of T lymphocyte responsiveness, *J Immunol* 1981; 126: 38.
47. Chang TW, Celis E, Miller RW, et al. In vitro response to HBsAg of peripheral blood lymphocytes from recipients of hepatitis B vaccine. *Hepatology* 1984; 4: 824.
48. Hanson RG, Hoofnagle JH, Minuk GY, et al. Cell mediated immunity to hepatitis B surface antigen in man. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 257.
49. Nowicki MU, Tong MJ, et al. Alterations in the immune response in nonresponder to the hepatitis B vaccine. *J Infect Dis* 1985; 152: 1245.
50. Yamauchi K, Chiou SS, Nakamushi, et al. Suppression of hepatitis B antibody synthesis by factor made by T cells from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest* 1983; 71: 1104.
51. Chiou SS, Yamauchi K, Nakanishi T, et al. Nature of the immunological nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in healthy individuals. *Immunology* 1988; 64: 545.
52. Craven DE, Awdeh ZL, Kunches LM, et al. Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in health care workers. Results of revaccination and genetic typings. *Ann Intern Med* 1986; 105: 356.
53. Alper CA, Kruskall MS, Marcus-Bagley D, et al. Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. *N Engl J Med*. 1989; 321: 708.
54. Walker M, Szmunes W, Stevens C, et al. Genetics of anti-HBs responsiveness. I HLA-DR7 and nonresponsiveness to hepatitis vaccination. *Transfusion (Philadelphia)* 1981; 21a: 601.
55. Weissman JY, Tsuchiyose MM, Tong MJ, et al. Lack of response to recombinant hepatitis B vaccine in nonresponders to the plasma vaccine. *JAMA* 1988; 260: 1734.
56. Sengar DPS, McLeish WA, Sutherland M, et al. Smiley RK. Immune response to HBsAg. *Can Med Assoc J*. 1975; 113: 929.

57. Caruso C, Giordano C, Galluzo A, et al. HLA-DR1 and HLA-DR3 phenotypes and insulin antibody production in diabetes Sicilian patients. *Exp. Clin Immunogenetic* 1988; 5: 48-51.
58. Mackay IR, Tait BD. HLA Associations with Autoimmune type chronic Active Hepatitis: Identification of B8-DRW3 haplotype by family studies 1980; 79: 95.
59. Matej-H, Nowakowska B, Pacynska J, et al. HLA antigens and the antibody response after vaccination to hepatitis B. *Arch Immunol Ther. Exp. Warsz* 1988; 36: 505.
60. Tanasescu C, Micu D, Codreanu C, et al. HBsAg positive secondary autoimmune active chronic hepatitis, immunogenetic aspects. *Med Interne* 1988; 26: 53.
61. Kramer A, Herth D, Von Keyserlingk HJ, et al. Non-responsiveness to hepatitis B vaccination: revaccination, and immunogenetic typing. *Klin Wochenschr* 1988; 66: 670.
62. Krawitt EL, Kilby AE, Albertini RJ, et al. An immunogenetic study of suppressor cell activity in auto immune chronic active hepatitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 46: 249.