

Señales coestimulación en linfocitos T de pacientes infectados por el virus de la Hepatitis B (VHB)

**RESUMEN.**

La hepatitis B es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo. Se estima que un tercio de la población mundial se ha infectado en forma aguda con el virus de la hepatitis B (VHB). 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 respuesta inmune contra el VHB está sustentada en gran parte sobre la actuación de los linfocitos T cooperadores, los cuales deben ser activados apropiadamente para que ejecuten sus funciones reguladoras. La activación efectiva de los linfocitos T depende de dos señales: la primera señal es mediada a través del TCR y el complejo antígeno/MHC y la segunda señal depende de la participación de moléculas coestimuladoras. CD28 es una de las principales moléculas coestimuladoras que media activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T. Estudios previos en este laboratorio han demostrado activación deficiente de linfocitos T en sujetos que no responden a la vacuna contra la hepatitis B, probablemente asociado a defectos en el eje de presentación CPA/MHC, que involucra la participación activa de señales coestimuladoras. Partiendo de la premisa que los sujetos que no responden a la vacuna están en riesgo de infección, se planteó la hipótesis que las alteraciones anteriormente descritas en no respondedores a la vacuna, pudieran estar presentes en aquellos pacientes que son incapaces de eliminar el virus y desarrollan por lo tanto un proceso inflamatorio crónico. Para contrastar esta hipótesis se realizaron ensayos de proliferación celular, expresión de receptores de activación y de citoquinas

intracitoplasmáticas y apoptosis, en respuesta al HBcAg y al entrecruzamiento de CD28 en la superficie de los linfocitos T. Estos parámetros fueron evaluados en linfocitos T de sujetos infectados crónicos y curados de la infección, mediante citometría de flujo. En los grupos estudiados no se observó proliferación celular en respuesta al HBcAg. Los sujetos infectados crónicos no mostraron incremento de los niveles de CD40L y CD69 luego de la estimulación con HBcAg solo o en combinación del entrecruzamiento del receptor CD28, en contraste a los individuos curados de la infección ( $p < 0,01$ ). En células CD4+ de sujetos infectados crónicos se observó un aumento significativo en la expresión de CD25 en respuesta al HBcAg ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias en los patrones de citoquinas (Th1 y Th2) evaluados, excepto por un incremento en la expresión de IL-2 en células no estimuladas de pacientes crónicamente infectados ( $p < 0,05$ ). Bajo estas condiciones experimentales, nosotros demostramos que los linfocitos T de sujetos infectados crónicos producen niveles elevados de IL-10 y TGF- $\beta$  ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente), citoquinas que suprimen la respuesta inmunológica, que en conjunto con la disminución de la expresión de CD40L en células CD4+ estimuladas con el HBcAg y la presencia de poblaciones de células CD4+CD25+ supresoras o reguladoras antígeno específicas, contribuyen a comprender la incapacidad de estos sujetos para erradicar el virus y evocar una respuesta inmunológica protectora.

## **SUMMARY.**

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 evidences suggest 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. Anti-viral immune response is largely supported by T helper cells which must be properly activated in order to accomplish their immunoregulatory function. To this end, lymphocytes require two independent signals to become fully activated. The first, an antigen specific signal is sent via the unique antigen receptor (TCR). The second signal termed costimulation, is independent of the antigen receptor and is critical to allow full activation. CD28 is a key costimulatory molecule which mediates cell proliferation, prevents anergy and apoptosis. Previous work from this laboratory has shown a deficient T cell activation in nonresponders to hepatitis B vaccination and, it is assumed that these individuals are in risk for hepatitis B infection. We hypothesized that inappropriate early activation events could also be counted for viral persistence during chronic infection. In order to explore this possibility we conducted an in vitro study to investigate cell proliferation, activation receptors expression, cytokine production in response to purified recombinant HBcAg and crooslinking of CD28 molecules. These parameters were analyzed in T lymphocytes from a group of chronically infected patients and individuals that spontaneously recovered from infection by flow cytometry. No cell proliferation was observed against HBcAg in studied groups. Chronically infected patients did not increase the levels of CD40L and CD69 following stimulation with HBcAg alone or in combination with crooslinking of the CD28 receptor, in contrast to subjects that resolved

the infection ( $p < 0.01$ ). A significant increase in CD25 expression was observed in CD4<sup>+</sup> cells from chronically infected patients in response to HBcAg. No differences were observed in the different explored cytokine profiles (Th1 or Th2), except for an increment of IL-2 in unstimulated cells from chronically infected patients ( $p < 0.05$ ). Under these experimental conditions, we were able to show that T lymphocytes from chronically infected patients produced elevated levels of IL-10 and TGF- $\beta$  ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively), cytokines known to be suppressors of immune response, which in addition to a diminished CD40L expression in HBcAg-stimulated CD4<sup>+</sup> cells and, the presence of an antigen specific induced regulatory suppressor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> population, contributes to our understanding of the incapability to eliminate the virus and to elicit a protective immune response.