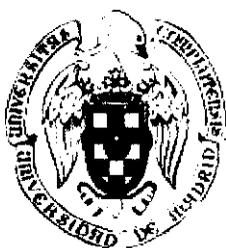


T 24298

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314013694

**Análisis de la respuesta celular CD8 específica contra el virus B,
en función del control viral y grado de inflamación hepática,
en la infección persistente por virus B.**

Tesis Doctoral

Juan Ramón Larrubia Marfil

Directores:

Prof. Manuel Díaz-Rubio García

Prof. José María Ladero Quesada

“Para María, por supuesto”.

“ Quién no sabe lo que busca, no ve lo que encuentra”.

Claude Bernard.

AGRADECIMIENTOS.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han participado de uno u otro modo en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero mostrar mi reconocimiento a los directores de esta tesis, los Profesores Manuel Díaz-Rubio y José María Ladero, por su acertada dirección. También les agradezco su decisiva participación en mi formación en Gastroenterología, adquirida durante la residencia en el hospital Clínico San Carlos, así como haber despertado en mi un especial interés por la Hepatología y la investigación, que han sido las semillas para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Mi gratitud al Profesor Roger Williams por concederme una plaza de Investigador Clínico en el "Instituto de Hepatología" del "Royal Free and University College London Medical School", donde realicé el trabajo experimental de esta tesis.

A mis tutores en el "Instituto de Hepatología", los doctores Antonio Bertoletti y Mala Maini, siempre les estaré especialmente agradecido por haberme introducido en este apasionante campo de la inmunopatogénesis de la hepatitis B.

Mi agradecimiento a los doctores Graham S. Ogg y Andrew J. McMichael del Instituto de Medicina Molecular, Departamento Nuffield de Medicina, del Hospital John Radcliffe de Oxford por la elaboración de los complejos tetraméricos HLA-péptido.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco su continua ayuda y estimulantes

discusiones. C. K. Lee, S. Reignat y J. Herberg colaboraron especialmente en los experimentos de este proyecto.

Mi recuerdo a todos los pacientes que de forma desinteresada participaron en este estudio. También mi gratitud a los profesionales del Departamento de Enfermedades de Transmisión Sexual del Centro “Mortimer Market” (NHS) de Londres por la recogida de muestras y datos clínicos.

Mi agradecimiento al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo por la financiación económica concedida a través de una beca de Formación en Investigación (BEFI 98/9155), que me ha permitido dedicarme completamente a este trabajo durante dos años.

A mis amigos les agradezco su continuo respaldo y aliento. Juan Luís, Javier G., Javier C., Fernando y Jesús me enviaron su apoyo y consejos desde España. También han compartido conmigo desde Londres los esfuerzos de esta tesis Ross, Ralph, Stephanie y Fabio, quienes en todo momento se preocuparon de replecionar mis niveles de cafeína y cerveza.

Por supuesto tengo que agradecer a toda mi familia su inestimable ayuda, especialmente a mis padres y hermana, quienes con su estímulo nunca dejaron lugar para el decaimiento ni la desilusión.

A María, a quien dedico este trabajo. Sin su apoyo esta tesis no hubiera sido posible.

ÍNDICE.

	Página
I. <u>RESUMEN</u>	1
II. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
II.1. Características generales de la respuesta inmune anti-viral	4
II.1.1 Respuesta innata	4
II.1.2 Respuesta adaptativa	5
II.1.3 Importancia de la respuesta CD8+ virus específica.....	8
II.1.4 Mecanismos de persistencia viral	10
II.2. Interacción TCR / complejo HLA clase I-péptido.	12
II.2.1 El receptor de la célula T.....	12
II.2.2 El complejo HLA clase I/péptido	14
II.3. Características antigénicas de la infección por VHB	16
II.3.1 Estructura del genoma del VHB	16
II.3.2 Replicación viral.....	18
II.3.3 Transcripción y transducción viral. Antígenos del VHB.....	19
II.4. Respuesta inmune específica en la infección por VHB	23
II.4.1 Respuesta inmune humoral.....	23
II.4.2 Respuesta inmune HLA-II restringida	25
II.4.3 Respuesta inmune HLA-I restringida	27
II.5. Respuesta CD8 core 18-27 específica HLA-A2 restringida	35
II.6. Métodos de cuantificación de los linfocitos T citotóxicos	38
II.7 Justificación de este estudio. Desarrollo inductivo	43
II.7.1 Cuadros clínicos en la infección persistente por VHB	44

III.7.2 Respuesta celular citotóxica y daño hístico	47
III.7.3 Respuesta celular citotóxica y control viral	48
III. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	51
IV. <u>DISEÑO, MATERIAL Y MÉTODOS</u>	53
IV.1 Diseño del estudio	53
IV.1.1 Tipo de diseño	53
IV.1.2 Ámbito del estudio	53
IV.1.3 Selección de los sujetos	54
IV.1.4 Variables del estudio	59
IV.2 Pacientes, material y métodos experimentales	63
IV.2.1 Sujetos seleccionados	63
IV.2.2 Recogida de muestras y datos clínicos	63
IV.2.3 Estudio virológico	65
IV.2.4 Tipaje de HLA-A2.....	66
IV.2.5 Síntesis de complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27	67
IV.2.6 Tinción de CMSP con anticuerpos anti-CD8 y con complejos tetraméricos HLA-A2/core 18 27	68
IV.2.7 Producción de líneas celulares	69
IV.2.8 Análisis de liberación de cromo y ensayo de dilución límite ...	70
IV.2.9 Amplificación del gen del VHB core 18-27	71
IV.3 Diseño del análisis estadístico	74
IV.3.1 Estadística descriptiva	74
IV.3.2 Estadística inferencial.....	75

V. <u>RESULTADOS</u>	80
V.1 Validación de la técnica de recuento de LTC core 18-27	80
V.2 Descripción de los datos y análisis univariante	85
V.2.1 Características demográficas y clínicas de los sujetos	86
V.2.2 Frecuencia de linfocitos CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica .	88
V.2.3 Expansión <i>in-vitro</i> de los linfocitos CD8+/Tc18-27+	96
V.2.4 Correlación de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ con la carga viral y el daño hepático	101
V.3 Gráficos y tablas descriptivas	103
V.4 Análisis multivariante. Control de la confusión e interacción	110
V.4.1 Análisis de la presencia de confusión e interacción en la comparación de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en los sujetos con infección persistente.....	110
V.4.2 Análisis de la capacidad de expansión de las células CD8/Tc18-27+ en los sujetos infectados por VHB ajustando por la frecuencia inicial de células CD8/Tc18-27+	111
VI. <u>DISCUSIÓN</u>	113
VII. <u>CONCLUSIONES</u>	130
VIII. <u>PUBLICACIONES GENERADAS</u>	132
IX. <u>APÉNDICES</u>	133
IX.1 Abreviaturas utilizadas	133

IX.2 Índice de gráficos	135
IX.3 Índice de tablas	137
IX.4 Financiación del proyecto	139
X. <u>REFERENCIAS</u>.....	140

I. RESUMEN.

El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus no citopático que permanece de forma persistente en el huésped, provocando distintas situaciones clínicas. Múltiples datos indican que los linfocitos T citotóxicos VHB específicos desarrollan un papel central en el control de esta infección.

Análisis matemáticos que modelan la interacción entre virus no citopáticos y la respuesta celular citotóxica, sugieren que existe una disminución en la capacidad de respuesta de los linfocitos T citotóxicos virus específicos en aquellos sujetos con infección persistente que no controlan la viremia. Por otro lado, se ha observado en modelos animales y en ciertas infecciones en humanos que el desarrollo de una respuesta celular citotóxica adecuada es capaz de controlar la infección sin generar daño tisular.

Hipótesis.

Basándonos en estos antecedentes, se planteó si aquellos sujetos con infección persistente por VHB sin datos de inflamación hepática y con baja replicación viral disponían de una respuesta celular T CD8 VHB específica superior a la de los pacientes

con elevada carga viral e inflamación hepática.

Métodos.

La respuesta celular citotóxica desarrollada por pacientes HLA-A2+ AgHBs+ contra el péptido 18-27 del core del VHB se utilizó como modelo de respuesta CD8+ antígeno específica en la infección persistente por VHB. Para contrastar la hipótesis planteada se cuantificó, directamente *ex-vivo*, la frecuencia basal de linfocitos CD8 core 18-27 específicos de sangre periférica en dos grupos de sujetos con distinto grado de control viral y daño hepático. Además, se evaluó la capacidad de expansión de estas células *in-vitro*, tras estimulación con el péptido core 18-27. En ambos análisis se utilizaron complejos tetraméricos HLA-I/péptido para el recuento de las células CD8 antígeno específicas mediante citometría de flujo.

Resultados.

Se observó que el control de la replicación del VHB se asociaba con la presencia de un reservorio circulante de células CD8+ VHB específicas que eran capaces de expandirse tras el reconocimiento específico del virus. Esta situación no se detectó en la mayoría de sujetos con alta viremia e inflamación hepática.

Conclusiones.

La existencia de una capacidad de respuesta celular citotóxica VHB específica disminuida en la infección persistente por VHB podría influir en el control de la viremia y en el desarrollo de daño hepático. El control de la replicación del VHB por las células CD8+ VHB específicas podría realizarse de forma independiente a la generación del daño tisular.

II. INTRODUCCIÓN.

El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus hepatotropo que infecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo¹ y es una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis hepática y hepatocarcinoma^{2,3,4}. Un pequeño porcentaje de los adultos que entran en contacto con el virus B no consigue controlar la infección. Sin embargo, esta situación ocurre en la mayoría de los casos con infección adquirida en el periodo neonatal⁵, siendo esta ruta la principal vía de contagio en el mundo.

El curso de la infección por VHB depende de la relación entre la respuesta inmune del huésped y la habilidad del virus para evadirla. Aunque todos los elementos de la respuesta antiviral son importantes en el control de la infección, los linfocitos T citotóxicos (LTC) antígeno específicos ejercen un papel primordial en la erradicación del VHB por su capacidad de identificar las células infectadas⁶ y eliminar el virus^{7,8}. Por estas razones es especialmente interesante el estudio de este tipo de células en aquellas situaciones en que el sistema inmune no es capaz de controlar completamente la infección.

II.1 CARACTERÍSTICAS DE LA RESPUESTA INMUNE ANTI-VIRAL.

Evolutivamente se ha alcanzado un equilibrio entre el sistema inmune del huésped y el virus que garantiza la supervivencia de ambos. Este equilibrio es diferente según se trate de un virus citopático o no citopático. Por esto, en ambos tipos de infección la respuesta inmune presenta características peculiares debido al distinto comportamiento del patógeno⁹. A continuación, se describen los mecanismos de defensa antiviral del huésped, con especial detenimiento en el papel de las células CD8 virus específicas en infecciones por virus no citopáticos.

II.1.1 Respuesta innata.

En toda respuesta inmunológica ante un virus existe una inmunidad denominada adaptativa y otra innata. El sistema inmune innato⁹ es un mecanismo filogenéticamente muy antiguo no restringido sólo a los vertebrados. Sus componentes incluyen barreras físicas tales como piel o mucosas, células fagocíticas y sustancias químicas como lisozima, interferones y complemento¹⁰. Las células del sistema innato comparten ciertas propiedades que las distinguen de la respuesta adaptativa, como son la rapidez de respuesta, la ausencia de maduración en el tiempo y la capacidad de reconocer modelos moleculares de patógenos a través de receptores poli-específicos. Por ejemplo, el RNA de doble cadena puede actuar como una señal inmunomoduladora inductora de la respuesta innata⁹. Esta es una molécula compartida por varios grupos de virus RNA pero no por el huésped, lo que permite a este sistema reconocerla como extraña. Entre las células del sistema innato destacan las células fagocíticas por sus propiedades de presentación de antígenos a las células del sistema adaptativo. Entre ellas, se debe

reseñar a las células dendríticas que son células preferentemente dedicadas a la presentación de antígenos que además de mostrar los epítopos virales a las células del sistema adaptativo¹¹, pueden seleccionar los apropiados mecanismos efectores. Esto lo realizan mediante la producción diferencial de citoquinas pro-inflamatorias como interleuquina (IL)-12 o anti-inflamatorias como IL-4. Sin embargo, este sistema por sí solo puede no ser suficiente para el control de la infección, siendo necesaria la participación de una respuesta más específica constituida por el sistema adaptativo.

II.1.2 Respuesta adaptativa.

La respuesta adaptativa constituye un mecanismo de defensa más avanzado, que se caracteriza por su especificidad. Esta propiedad se debe a los receptores clonales de la superficie celular que son generados por mecanismos somáticos durante la ontogenia. Además, otra propiedad del sistema adaptativo es la memoria celular que constituye la capacidad de responder con una eficacia mejorada ante un segundo encuentro con el patógeno.

La respuesta específica se divide en humoral y celular⁹. La inmunidad humoral esta mediada por anticuerpos, que son producidos y liberados dentro del torrente circulatorio por las células plasmáticas que derivan a su vez de las células B. Estos anticuerpos reconocen determinantes conformacionales en proteínas, carbohidratos y partículas antigénicas en membranas mucosas y en la sangre¹². Sin embargo, con excepción de las zonas lesionadas, no pueden entrar en tejidos sólidos lo que impide su actuación en órganos infectados. De entre los distintos isotipos de inmunoglobulinas producidas por estas células, la IgG y la IgA son especialmente importantes en el

control de la infección viral. Los anticuerpos neutralizantes del isotipo IgG desarrollan un papel principal en la contención de la propagación de los virus citopáticos y también en la prevención de la reinfección¹³. Además, la inmunoglobulina secretora IgA bloquea en las mucosas la unión de las partículas virales¹⁴, impidiendo así la entrada del virus. Junto a estos mecanismos directos, los anticuerpos también pueden activar la lisis viral mediada por complemento y la posterior opsonización para favorecer la fagocitosis. Los anticuerpos unidos a las células infectadas por virus pueden activar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, a través de la unión de las células "natural killer" a la fracción Fc de la inmunoglobulina. Por otro lado, durante la reinfección con el mismo virus se desarrolla una respuesta humoral secundaria mucho más rápida que es "timo dependiente", puesto que requiere la colaboración de las células T CD4+.

La inmunidad celular adaptativa esta mediada por las células T, que se diferencian en el timo y que se caracterizan por expresar el receptor clonal de la célula T, que les permite reconocer fragmentos antigénicos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA). Las células T se dividen en dos grupos funcionalmente diferentes. Los linfocitos CD8 desarrollan una actividad principalmente citotóxica, mientras que los linfocitos CD4 realizan una función reguladora de la respuesta inmune.

En la célula infectada, los péptidos endógenos derivados de componentes virales son procesados y presentados a las células T CD8+ a través de la molécula HLA de clase I. Las vías de procesamiento de este complejo incluyen la digestión citosólica de proteínas por proteosomas proteolíticos, la traslocación de los péptidos por el transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP) dentro del retículo endoplásmico donde se asocia con la molécula HLA de clase I. Posteriormente el

complejo HLA I/péptido es transportado a la membrana plasmática^{6,15,16}(Figura.-II.2).

Por otro lado, las células presentadoras de antígenos tales como macrófagos, células B y células dendríticas, fagocitan o endocitan proteínas que digieren y presentan en la superficie mediante moléculas de HLA de clase II⁶ que son reconocidos por las células T CD4+. Este mecanismo de procesado es similar pero algo distinto al que ocurre en la presentación antigénica mediante moléculas HLA de clase I. Una vez las células T han reconocido el epítipo específico (en el contexto de clase I para las CD8+ y de clase II para las CD4+) desarrollan una expansión clonal y muestran funciones efectoras.

Las células T CD4+ (linfocitos "helper") juegan un papel central en la respuesta inmune adaptativa, a través de la producción de citoquinas que tienen tanto efectos protectores como promotores de la función de las células B, T CD8+ y macrófagos. Las células T "helper" (Th) pueden ser divididas en dos grupos; las células Th 1 se caracterizan por producir IL-2 e IFN- γ y promueven la activación de los LTC y el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado¹⁷. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, e IL-10 que son importantes para la activación y diferenciación de las células B. Se ha definido un tercer grupo, formado por las células Th0 que secretan un perfil intermedio de citoquinas. En resumen, las células T CD4+ generalmente no desarrollan una función citolítica pero son muy importantes en la regulación del sistema inmune y pueden ejercer un papel antiviral directo a través de las citoquinas que producen^{18,19}.

Los linfocitos T CD8+ ejercen su función antiviral mediante la producción de

citoquinas y a través de mecanismos citolíticos directos sobre la célula infectada por el virus. Dos son los mecanismos citotóxicos utilizados por el LTC²⁰. El primero consiste en la liberación de gránulos que contienen la molécula formadora de poros perforina y la serin esterasa granzyma B. El otro método es la expresión de la molécula Fas ligando (CD95L) que interactúa con la molécula de Fas (CD95) que se expresa en la célula diana. Estas vías convergen en la inducción de apoptosis en la célula diana a través de la activación de los miembros de la familia de las caspasas²¹. Además, los LTC generan citoquinas tipo 1 como interferón gamma o factor de necrosis tumoral beta que pueden controlar la viremia por mecanismos no citolíticos.

II.1.3 Importancia de la respuesta CD8+ virus específica para el control viral.

Como se puede deducir de las características de todos los elementos del sistema inmune comentadas anteriormente, las células T CD8+ son los agentes más adecuados para la vigilancia y control de las infecciones intracelulares. Su capacidad de actuación restringida por la molécula de HLA-I, les permite reconocer la presencia de antígenos virales en las células infectadas y destruirlas. Además, junto a esta característica destaca la habilidad para migrar a los órganos periféricos, alcanzando los lugares de infección a los que no llegan los anticuerpos. Existen ejemplos en la literatura que apoyan empíricamente la importancia de este tipo de células en el control viral. Así, se ha observado como en sujetos inmunodeprimidos con infección por VEB, que desarrollaban un proceso linfoproliferativo, la infusión de linfocitos CD8 VEB específicos conseguía controlar la enfermedad²². También tenemos datos procedentes de modelos experimentales que demuestran esta idea. Se ha descrito como la transferencia de LTCs influenza-específicos es capaz de controlar la infección por influenza en

modelos murinos, sin capacidad de elaborar anticuerpos²³.

Aunque estas células son importantes en todas las infecciones virales, su papel es más relevante en el caso de virus no citopáticos. En la infección por un virus citopático la capacidad de recuperación de la primoinfección reside principalmente en la acción de citoquinas solubles anti-virales, que frenan la infección viral al hacer resistentes a las células no infectadas contra la penetración y replicación viral, y contra el daño causado por el virus⁹. No obstante, en la infección por virus no citopáticos la infección es controlada principalmente por las células citotóxicas CD8+ que destruyen la célula infectada antes de que descargue la nueva generación de virus. Esto es así, porque la ausencia de daño celular convierte al virus no citopático en un agente de alguna manera más oculto para el sistema inmune, haciendo fundamental la actuación de los LTCs⁹ para controlarlo. Tanto es así que, en la infección murina aguda por el virus de la linfocoriomeningitis murina (LCMV) (virus no citopático) hasta un 50% de los linfocitos CD8+ esplénicos son LCMV específicos²⁴ cuando el huésped es capaz de controlar el virus. Sin embargo, se ha observado como la respuesta celular citotóxica esta muy disminuida en aquellos casos de infección por virus no citopáticos sin control viral, como ocurre en la infección crónica por VHC o VHB^{25,26}.

El desarrollo de una respuesta CD8+ específica ante una primoinfección viral es un proceso complejo. Inicialmente los linfocitos T CD8+ “naïve” que expresan la molécula CD62L (receptor de atracción a los ganglios linfáticos) son reclutados a los ganglios linfáticos, donde las células presentadoras de antígenos activan a las células CD8+ que expresan el adecuado TCR. La activación de estas células conlleva muchos cambios celulares, como el incremento de la expresión de receptores de moléculas

co-estimuladoras como LFA-1 o del marcador de memoria CD44, así como el descenso de la molécula CD62L (L-selectina)²⁷. Todos estos cambios son esenciales para permitir al linfocito CD8+ migrar al lugar de la infección. Como resultado de esta activación ocurre una expansión clonal, adquisición de características efectoras y migración al órgano infectado. En el tejido infectado tras ejercer su función citolítica estas células sufren apoptosis vía Fas²⁸. Sin embargo, algunas de estas células adquieren un fenotipo de memoria y persisten durante largo tiempo como mecanismo de control. En la figura II.1 se esquematiza los elementos que intervienen en la respuesta inmune innata y adaptativa.

II.1.4 Mecanismos de persistencia viral.

En el caso de la mayoría de las infecciones que se cronifican, los virus usan múltiples estrategias para evadir o modificar la respuesta inmunitaria del huésped e impedir así su aclaramiento. Algunas de ellas se comentan a continuación para ilustrar el difícil equilibrio entre el control y la persistencia viral²⁹.

Los virus pueden escapar al reconocimiento inmunitario ocultándose en sitios privilegiados inaccesibles al sistema inmune. Por ejemplo, hay virus que integran su DNA dentro del DNA del huésped o colonizan órganos a donde no pueden llegar los LTCs²⁹. Otra manera de evadir la respuesta inmune es la pérdida de antigenicidad. De este modo determinadas mutaciones en el genoma viral serían responsables de hacer más invisible al virus. Así, se ha descrito que bajo el efecto de la presión inmunológica pueden seleccionarse mutaciones en aquellos epítomos virales importantes para anticuerpos^{30,31} y LTCs³², denominadas mutaciones de escape. Además, algunos virus

han desarrollado mecanismos para interferir con el procesamiento y presentación de los antígenos en las moléculas del HLA³³, lo que les permite no ser vistos por los LTCs. En otras infecciones, los antígenos virales pueden inducir inmunotolerancia al ser reconocidos como propios durante el desarrollo fetal tras atravesar la placenta, como ocurre en la transmisión vertical del VHB⁸⁵. En ciertas ocasiones, la ausencia de una correcta estimulación de las células T durante el reconocimiento del péptido viral puede llevar a la anergia celular y a la persistencia de la infección. Este fenómeno puede ocurrir por déficit de moléculas co-estimuladoras en las CPAs³⁴ o por un inadecuado ambiente de citoquinas o falta de ayuda por las células T CD4³⁵. También se ha descrito como la máxima estimulación con un epítipo inmunodominante puede resultar en la fatiga de la célula T que se vuelve anérgica o incluso es eliminada por apoptosis^{36,37}. Otros virus secretan moléculas con capacidades agonistas o antagonistas de citoquinas humanas que favorecen la persistencia viral. Un ejemplo de este mecanismo es la producción de un análogo de la IL-10 por el VEB que inhibe la síntesis de IFN γ y

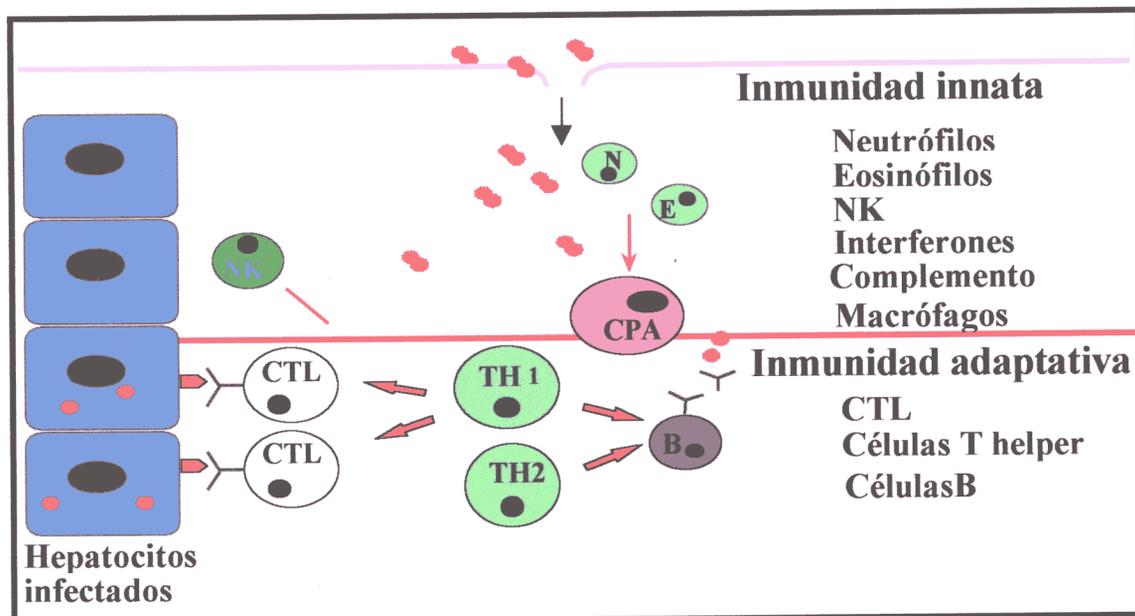


Fig. II.1. Esquema de la respuesta inmune innata y adaptativa ante una infección viral. NK: Natural Killer. CTL: linfocito T citotóxico. CPA: célula presentadora de antígenos. B: célula B. TH1/TH2: células CD4 tipo 1 y 2.

disminuye la expresión de moléculas de HLA clase II³⁸. Algunos de estos mecanismos han sido sugeridos en la infección persistente por VHB y serán comentados posteriormente.

II.2. INTERACCIÓN TCR / COMPLEJO HLA CLASE I-PÉPTIDO.

II.2.1 El receptor de la célula T (TCR).

Como se comentó previamente, el reconocimiento del antígeno por la célula T es un punto central en la generación y regulación de una respuesta inmune efectiva y se realiza a través del TCR. La capacidad de los diferentes clones de linfocitos para reconocer distintos antígenos se debe a las propiedades de este elemento celular. El TCR es un heterodímero formado, en el 95% de las células T circulantes, por una cadena α y otra β ³⁹. En menos de un 5% de células se expresa el heterodímero alternativo $\gamma\delta$. Estas cadenas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tienen un dominio amino-terminal variable y otro dominio constante, cada uno de los cuales tienen uniones disulfuro intracadena. Una corta secuencia de conexión con un residuo cisteína permite una unión disulfuro entre las dos cadenas, además un dominio transmembrana ancla el receptor a la membrana plasmática³⁹. La secuencia de variabilidad del TCR reside en la región N-terminal de los dominios α y β , que son homólogos a las regiones variables de las inmunoglobulinas. Estos dominios están generados por la combinación de genes de los segmentos V, D y J para la cadena β , y V y J para la cadena α . Esta zona de variabilidad es la que permite el reconocimiento por el TCR del complejo HLA/péptido⁴⁰. Análisis de diferentes secuencias de los dominios V del TCR han mostrado que hay cuatro regiones de secuencia de aminoácidos

hipervariables en las cadenas α y β , tres de las cuales son análogas a las regiones determinantes complementarias (CDRs) de los anticuerpos, involucradas en la unión a antígenos. La región CDR3 es la más variable de todas ellas y de esta manera es la que provoca más especificidad, permitiendo la diferenciación entre epítopos muy similares.

El heterodímero $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$ del TCR se asocia con la molécula CD3 en el complejo TCR-CD3. El complejo CD3 es esencial para la expresión en la membrana del TCR. La molécula de CD3 es un complejo formado por dos heterodímeros $\epsilon\delta$ y $\epsilon\gamma$, y un homodímero $\xi\xi$ cargados negativamente en la región transmembrana lo que permite la unión al TCR que es de carga positiva³⁹. Estas cadenas no presentan variabilidad de aminoácidos entre diferentes células T y por tanto, no pueden generar diversidad asociada con el receptor de la célula T. La función de este complejo es la transducción de la señal a la célula tras la unión del ligando al TCR⁴¹. Los polipéptidos de la molécula CD3 presentan en sus colas intracitoplasmáticas el llamado "motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina" (ITAM) que desarrolla un papel esencial en la activación del linfocito T a través de su interacción con tirosinquinasa⁴². El complejo TCR-CD3 no tiene actividad intrínseca protein-tirosin-quinasa (PTK), sino que la estimulación del receptor conduce a la fosforilación de residuos tirosina en las ITAMs, a través de las que se activa la familia de las Src quinasa. Seguidamente, la proteína asociada Z (ZAP) 70 se une con los ITAMs fosforilados. Todo este proceso conduce a la activación de dos principales rutas, una involucrando al diacilglicerol (DAG) y otra al inositol trifosfato (IP₃) que provocan la elaboración de los factores nucleares NF-AT y NF- κ B que finalmente generan la activación celular^{42,43,44}. Otra vía de activación celular es generada por la adición de señales co-estimuladoras a la unión

TCR-HLA/péptido, promoviendo la síntesis de factores nucleares que activan el "enhancer" del gen de IL-2, estimulándose la producción de esta citoquina⁴⁴.

II.2.2 El complejo HLA clase I / péptido. Interacción con el TCR.

Anteriormente se explicó cómo el ligando del TCR es un péptido que es procesado y presentado en la superficie celular por las glicoproteínas de histocompatibilidad⁴⁵. Aunque miles de variantes alélicas de moléculas de HLA I han sido identificadas en el ser humano, en un mismo individuo sólo se pueden presentar hasta 6 diferentes moléculas de clase I. Por esto, la unión entre el péptido y la molécula de HLA debe ser "promiscua", es decir, una determinada molécula de HLA puede unir una enorme variedad de diferentes péptidos y algunos péptidos pueden interactuar con varias moléculas de HLA. La estructura del HLA de clase I está formada por dos dominios "inmunoglobulina-like" en la zona proximal a la membrana y otra región en la zona distal a esta, donde se sitúa el lugar de unión del péptido. Este sitio, denominado brecha de unión, está formado por un dominio en lámina β plegada y dos regiones en α -hélice.

La zona de unión del péptido en las moléculas de clase I está bloqueada en los extremos, lo que permite el anclaje de secuencias con una longitud de entre 8 y 10 aminoácidos. Sin embargo, esta brecha de unión en las moléculas de clase II es distinta y permite la unión de péptidos mayores, de hasta 18 aminoácidos. Los péptidos que se anclan en las moléculas de clase I suelen tener unos residuos de anclaje comunes entre todos ellos para una misma molécula de HLA. Estos residuos suelen estar localizados en el aminoácido carboxi-terminal y en la segunda posición amino-terminal⁶.

La unión entre el péptido y la molécula de HLA es muy estable, pudiendo durar horas. Además, el número de estas moléculas con el mismo péptido es muy bajo en la superficie de la misma CPA. Por otro lado, la unión entre el complejo péptido-HLA y el TCR es de muy baja afinidad, es decir, la unión permanece estable muy poco tiempo⁴⁶. Por tanto, como la célula CD8+ para activarse necesita la unión de varios TCR, obliga a que un complejo péptido-HLA entre en contacto con múltiples TCR en la misma célula. Se ha demostrado que un único complejo HLA-I/péptido puede interactuar y activar hasta 200 TCRs. Para estabilizar esta interacción se establecen otras uniones entre moléculas co-estimuladoras de la CPA y la célula T como son la unión entre CD28 y B7⁴⁷. Cuando la interacción es óptima y dura lo suficiente se genera una señal que es trasducida a la célula a través de la molécula de CD3, como se comentó previamente, y se produce la activación del linfocito CD8. Sin embargo, no todos los ligandos con

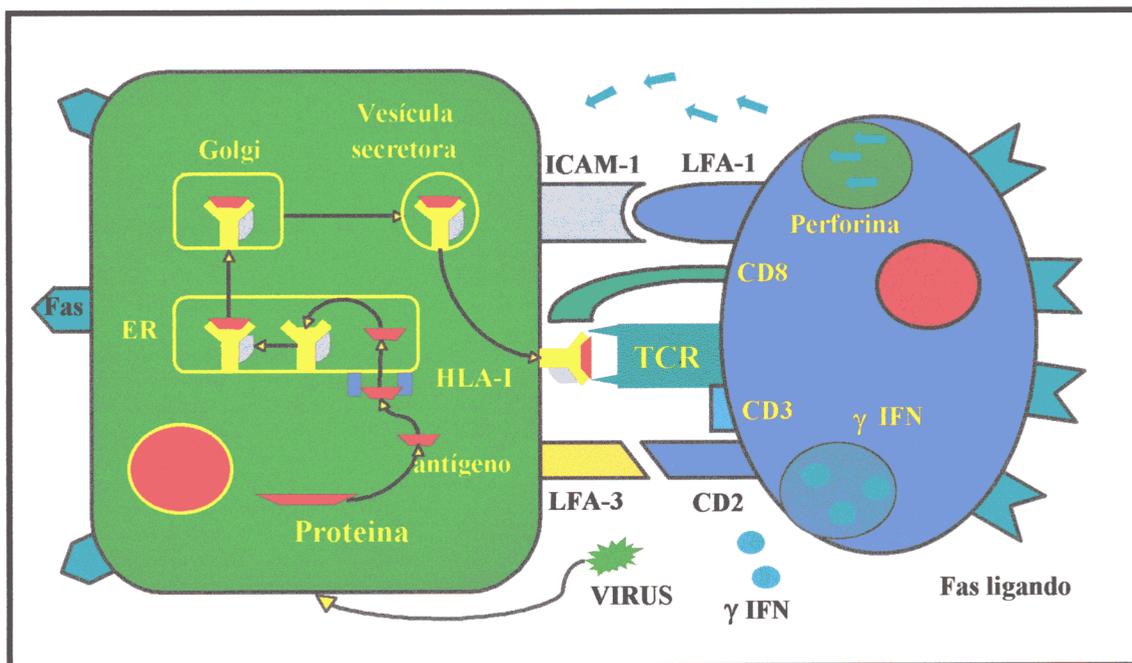


Fig.-II.2. Representación esquemática del procesado del antígeno viral en la célula infectada y su presentación en el complejo HLA-I/péptido, que es reconocido por el linfocito CD8 antígeno específico a través del TCR, activándose los mecanismos efectores citolítico y no citolítico.

capacidad de ser reconocidos por un TCR generan señales de activación. Algunos de estos péptidos pueden actuar como verdaderos antagonistas y esta es una posible estrategia de escape viral⁴⁸. En la figura II.2 se esquematiza la presentación del antígeno por la célula diana y el reconocimiento de la célula T mediante el TCR.

II.3 CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS DE LA INFECCIÓN POR VHB.

Una vez que se ha descrito de forma general la interacción entre la infección viral y el sistema inmune, se presenta en las siguientes secciones de forma particular la relación entre el VHB y la respuesta inmune contra este patógeno.

El VHB es un virus hepatotrofo, no citopático, DNA encapsulado de la familia de los hepadnavirus que causa una enfermedad necroinflamatoria hepática de variable intensidad y duración⁴⁹. En la siguiente sección se revisan las características antigénicas de este virus a partir de las que se elaboran los epítomos reconocidos por el sistema inmune.

II.3.1 Estructura del genoma del VHB⁵⁰.

El virión completo o partícula Dane es una esfera de 42 nm que contiene un core o nucleocápside que encierra el DNA viral. El genoma del VHB es un DNA circular de doble cadena parcial con un tamaño aproximado de 3200 pares de bases, lo que le convierte en el virus DNA conocido más pequeño. La cadena negativa del genoma del VHB codifica cuatro genes superpuestos: S (superficie), C (core), X (proteína X) y P (polimerasa) (figura.-II.3). Los genes S y C presentan dos regiones anteriores

denominadas pre-S y pre-C que codifican las proteínas preS1 y preS2, y pre-core respectivamente. La cadena positiva es corta y de variable longitud.

Se han definido dos “enhancers” en el genoma del virus B. El “enhancer” ENH I es tejido específico y funciona sólo correctamente en el hígado. Una proteínas y factores específicos del hígado así como ácido retinoico. El “enhancer” ENH II estimula la actividad transcripcional de los genes promotores del gen S.

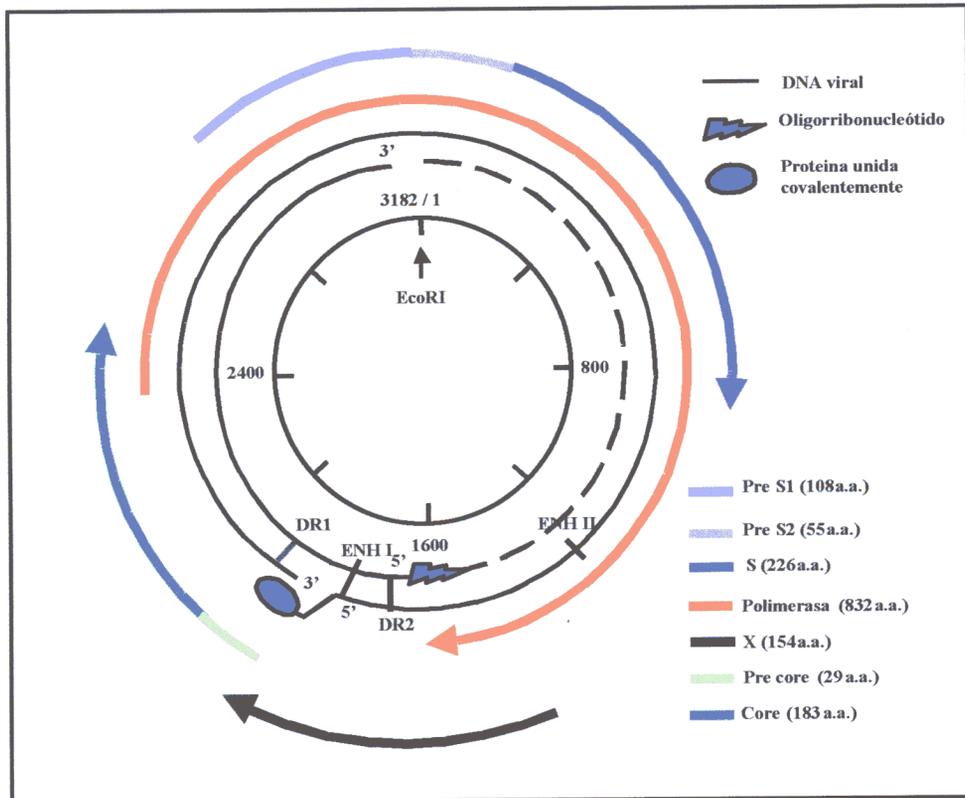


Figura II.3. Genoma del VHB que muestra las 7 proteínas codificadas por 4 genes superpuestos (superficie [S], core [C], polimerasa [P] y proteína X [X]). El gen S contiene las regiones preS1 y preS2 y el gen C contiene la región pre C. El lugar de unión de la enzima de restricción EcoRI se muestra como punto de referencia.

II.3.2 Replicación viral ⁵⁰.

Para llevar a cabo la replicación viral el VHB se une a la superficie celular y penetra en ella. Se ha descrito que la molécula anexina V de la membrana celular podría ser el principal receptor del VHB⁵¹. Una vez dentro de la célula, el core viral es transportado hasta el núcleo celular, donde el DNA circular viral se transforma en el DNA circular cerrado covalentemente (cccDNA) que funciona como matriz para la síntesis de RNA viral. La transcripción del cccDNA da lugar a transcritos de diferente tamaño. El de 3.5 kb es el RNA genómico y sirve de matriz para la transcripción inversa de la polimerasa. La síntesis de la cadena negativa de DNA a partir de este RNA genómico se inicia en la región final 3' DR1, con la proteína terminal de la polimerasa como "primer". A medida que la síntesis avanza, el RNA es degradado por la RNAasaH de la enzima DNA polimerasa. La cadena positiva se inicia en el extremo 3'DR2 y la síntesis continua hasta que se sobrepasa la proteína en el extremo 5' de la cadena negativa. El "primer" de la cadena positiva es un oligorribonucleótido derivado del RNA genómico.

Todo este proceso produce una molécula de DNA circular abierta similar al VHB maduro. Posteriormente, las moléculas de DNA de nueva generación son empaquetadas en el retículo plasmático rugoso (RER) con las partículas de la envoltura y del core formando el virión completo que finalmente es de nuevo liberado para infectar otras células. En la figura II.4 se resume el ciclo replicativo del VHB.

II.3.3 Transcripción y transducción del VHB⁵⁰. Antígenos del VHB.

Además del RNA genómico necesario para la replicación, el VHB elabora a partir del cccDNA una serie de productos de transcripción que darán lugar a proteínas que generan los antígenos del VHB. Se han identificado cuatro productos de transcripción de mRNA a partir del cccDNA. El más largo de 3.5 kb es la matriz para la replicación viral como se comentó anteriormente, pero también sirve para la expresión de las proteínas pre-core/core y polimerasa. Un transcripto de 2.4 kb codifica los péptidos pre-S1, pre-S2 y AgHBs, mientras que otro menor de 2.1 kb codifica los péptidos pre-S2 y AgHBs. Finalmente, el más pequeño de los productos de transcripción de 0.7 kb codifica la proteína X.

El gen de la nucleocápside contiene dos codones de comienzo en fase que

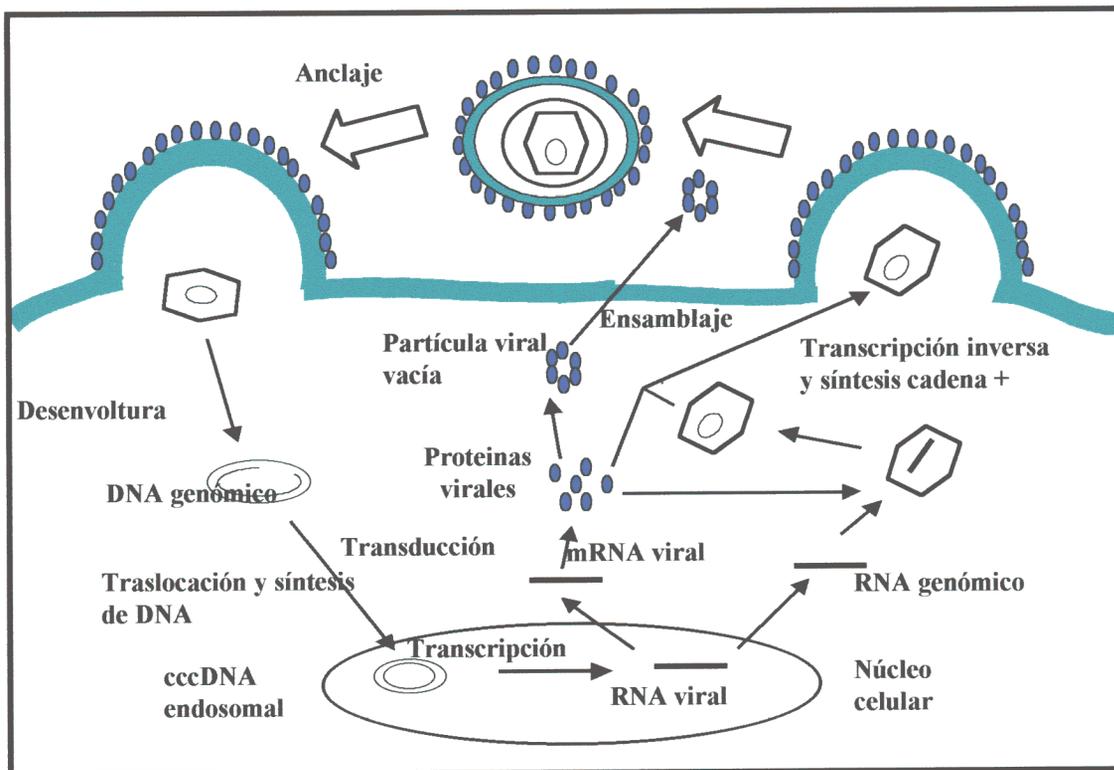


Figura II.4. Ciclo replicativo del VHB. La integración del virus en el genoma del huésped no está representada.

definen dos polipeptidos superpuestos. El más corto de estos polipeptidos, denominado antígeno del core del VHB (AgHBc), se ensambla en el citoplasma del hepatocito y después entra en el RE para formar la nucleocápside que, como se señaló previamente, encierra la DNA polimerasa viral y el RNA pre-genómico de 3.5 kb. El otro codón del gen C genera un polipeptido de mayor tamaño, a partir del que se forma el antígeno e del VHB (AgHBe). Esta proteína es translocada, gracias a un péptido señal situado en el extremo amino terminal, dentro del RER donde sufre la pérdida de un residuo carboxi-terminal y es finalmente secretada a la sangre. El AgHBe en suero es un buen marcador de la replicación viral puesto que es generado de la misma plantilla que usa el virus para la replicación. Sin embargo, la función de este polipeptido en el ciclo viral no está definida claramente ya que no es necesario para la replicación del VHB⁵². Datos clínicos⁵³ y experimentales obtenidos a partir de modelos transgénicos sugieren que pudiera tener un papel inductor de inmunotolerancia⁸⁵. Es decir, podría tratarse de una estrategia viral para favorecer la persistencia de la infección. La respuesta inmune celular a los antígenos de la nucleocápside es un importante factor en el aclaramiento viral puesto que provocan una fuerte respuesta de células T HLA-I y HLA-II restringidas en pacientes infectados por el VHB como se describirá más adelante⁵⁴.

El gen S contiene tres codones de inicio en fase que definen la región amino terminal de tres polipeptidos superpuestos (principal, mayor y medio). Todos estos polipeptidos contienen el AgHBs, mientras que extensiones amino-terminales conteniendo el antígeno preS2 o preS2 mas preS1 forman los polipeptidos mayor y medio, respectivamente. Los tres polipeptidos de la envoltura son componentes esenciales del virión infeccioso (partícula Dane) que se forman mediante ensamblaje en

el interior del RER⁵⁴. El virión es secretado tras glicosilación de los residuos de la envoltura en el aparato de Golgi⁵⁴. Los excedentes de los polipéptidos mayor y medio de la envoltura se ensamblan en el interior del RER para formar partículas no infecciosas esféricas de 22 nm, mientras que el exceso de polipéptido principal se ensambla en estructuras alargadas filamentosas no secretables que se acumulan en RER. Esto conduce a la formación de los característicos hepatocitos en vidrio esmerilado que son funcionalmente normales en condiciones basales pero exquisitamente hipersensibles a la destrucción bajo el efecto citopático del interferón gamma⁵⁵. Cuando los filamentos de las partículas AgHBs se acumulan en gran cantidad comprometen la función del RER y provocan la muerte celular⁵⁴. Los polipéptidos generados por los genes pre-S son importantes en la unión a la célula huésped. Se conocen dos lugares in-vitro de unión hepática específica para el polipéptido pre-S2 y uno para pre-S1^{56,57,51}, además ambos pueden unirse a líneas de hepatoblastoma. El producto del gen pre-S1 se une también a la membrana plasmática. Esta unión inespecífica puede ser la utilizada por el virus para entrar en células como los macrófagos. Además, el AgHBs se une a la molécula anexina V, que puede ser el principal mecanismo de entrada del virus en el hepatocito como ya se ha comentado⁵¹.

El **gen X** codifica una proteína transactivadora de la transcripción (proteína X) que regula *in vitro* positivamente la transcripción del VHB, de otros virus y de promotores celulares. La alteración de la regulación de la expresión de la proteína X puede contribuir a la hepatocarcinogénesis inducida por el VHB, puesto que se ha observado que líneas de células immortalizadas pueden ser transformadas, cuando son establemente transfectadas con el gen de la proteína X⁵⁸. Además, la expresión de esta proteína en cantidades elevadas en ratón transgénico incrementa la incidencia de

carcinoma hepatocelular⁵⁹. A pesar de que la proteína X está presente en mínimas cantidades en el tejido infectado, probablemente por la baja concentración de su RNA y su corta vida media⁶⁰, es inmunogénica para las células B y T⁶¹, quizás porque transactiva genes de importancia inmunológica como HLA-DR, HLA clase I e ICAM 1⁶².

El gen P codifica la polimerasa viral que contiene cuatro dominios: transcriptasa inversa, DNA polimerasa, RNAasa H y una proteína de unión a 5'DNA que sirve como "primer" para la transcripción inversa del pregenoma viral como se ha indicado previamente. El producto del gen de la polimerasa tiene un papel esencial en la encapsidación y replicación del genoma viral, mediante la unión a una estructura en horquilla en el extremo 5' del RNA pre-genómico, que sirve como señal de empaquetado y como matriz para la iniciación de la transcripción inversa del pregenoma viral. El uso de una transcriptasa inversa para la replicación provoca un alto grado de heterogeneidad genética al carecer esta enzima de la función de comprobación (proof-reading). Este elevado número de mutaciones del VHB puede favorecer su persistencia al generar mutaciones que puedan desactivar epítomos virales y conducir a la selección de mutaciones de escape. Es interesante resaltar que la proteína polimerasa es bastante inmunogénica durante la hepatitis aguda y crónica^{26,63}, a pesar de que esta proteína inhibe la respuesta celular a interferón alfa y gamma⁶⁴.

A partir del procesamiento de todos estos polipéptidos por las CPA surgen los epítomos que generan en el huésped la respuesta inmune específica que a continuación analizaremos.

II.4. RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA EN LA INFECCIÓN POR VHB.

En esta sección se revisa el papel que ejercen los distintos componentes del sistema inmune adaptativo en la respuesta contra la infección por VHB. Se analiza con especial detenimiento la labor de los linfocitos CD8 VHB específicos que son los protagonistas del tema de estudio de esta tesis.

II.4.1 Respuesta inmune humoral.

En la primera fase de la infección por VHB el sistema inmune actúa a través de los mecanismos de respuesta no específicos tales como las células NK⁶⁵, pero simultáneamente, comienza la inducción del sistema adaptativo por medio de la presentación de los antígenos virales por las CPA a las células B y T en los ganglios linfático regionales.

Como se discutió previamente, la función más importante de la respuesta inmune humoral es el aclaramiento de las partículas virales del compartimento extracelular del huésped. En la infección por VHB se desarrollan anticuerpos contra los péptidos de la envoltura, la nucleocápside y la polimerasa, así como contra el genoma viral. Sin embargo, sólo son neutralizantes los anticuerpos contra las glicoproteínas de la envoltura. Estos anticuerpos juegan un importante papel en el aclaramiento viral, eliminando las partículas virales de la circulación y evitando que sean captadas por las células susceptibles⁶⁶. No obstante, también pueden ser los responsables de la patogénesis de síndromes extracelulares asociados con la infección por VHB (glomerulonefritis, poliarteritis nodosa, crioglobulinemia) y de los síndromes

prodrómicos caracterizados por artralgia o urticaria, mediante la formación de inmunocomplejos⁵⁴. La aparición de los anticuerpos anti HBs se asocia con la resolución de la infección. Están dirigidos contra dos dominios situados entre los aminoácidos 124 y 147 que forman el determinante “a” común a todos los subtipos de VHB. Estos anticuerpos ofrecen protección contra la reinfección, aunque se ha descrito como mutaciones puntuales codificando una arginina en lugar de una glicina en la posición 145, debido a un cambio de G por A, provocan mutantes de escape con elevado grado de replicación a pesar de la presencia de anticuerpos antiHBs⁶⁶.

El papel de la respuesta humoral contra los antígenos de la nucleocápside (AgHBe, AgHBc) no está claro. Se acepta que no tienen una función neutralizante pues se encuentran presentes en elevadas concentraciones tanto en la infección aguda como en la infección crónica. La aparición de anticuerpos contra el AgHBe es un signo inicial de recuperación, asociado con la disminución de la replicación viral y desaparición del AgHBe. Una excepción a este patrón ocurre en los sujetos infectados con un VHB mutante con un cambio puntual G-A en el nucleótido en la posición 1896 ó con una mezcla de virus “silvestre” y mutante. Esta mutación provoca la aparición de un codón de parada que evita la expresión del AgHBe.

Es interesante remarcar que la prevalencia elevada de anticuerpos contra el core en la infección crónica por VHB se debe probablemente a que esta respuesta es tanto T dependiente como independiente, lo que permite la síntesis de estos anticuerpos a pesar de que en la hepatitis crónica la respuesta T “helper” está muy disminuida⁶⁷.

La respuesta humoral contra el extremo carboxi-terminal y contra el dominio

RNAasa H de la polimerasa aparecen como marcadores iniciales de la infección y representan la presencia activa de replicación viral⁶⁸. Otro marcador temprano de la infección y de posteriores reactivaciones es el isotipo IgM del anticuerpo HBc.

II.4.2 Respuesta inmune HLA-II restringida.

En los pacientes con infección autolimitada por VHB se detecta en sangre periférica una respuesta CD4+ HLA-II restringida muy vigorosa y dirigida contra múltiples epítomos de los antígenos de la nucleocápside⁵⁴. Sin embargo, la respuesta clase II restringida contra epítomos de la envoltura es mucho menos vigorosa en los mismos pacientes. La explicación a este hecho puede radicar en que la respuesta CD4 contra los epítomos del AgHBs podría terminar exhausta como resultado de la estimulación por altas concentraciones del AgHBs en las fases iniciales de la enfermedad. De cualquier manera, esta respuesta se ha podido detectar en el periodo preclínico de incubación⁶⁹.

Los epítomos localizados entre los residuos 50-69 del core del VHB son los más comúnmente reconocidos, de entre los diferentes epítomos del polipéptido HBc/eAg, por los pacientes con infección aguda, independientemente de su HLA. Esta respuesta se asocia con el control de la infección en sujetos con hepatitis aguda y es muy débil en pacientes con hepatitis crónica⁵⁴. Este hallazgo permite pensar que la respuesta CD4 nucleocápside específica desarrolla un papel crítico en el control viral. Esto se podría deber a varias circunstancias. La primera podría ser la inducción de una respuesta CD8 VHB específica, así se ha observado que el vigor de la respuesta T HLA-II restringida específica contra HBc/eAg en la infección aguda va paralelo a la respuesta T HLA-I

restringida específica contra todos los antígenos virales⁸². El otro mecanismo podría ser la generación de ayuda a las células B VHB-envoltura específicas, para la producción de anticuerpos neutralizantes mediante un proceso de ayuda “intermolecular”. En este proceso las células B envoltura específicas captan partículas virales mediante receptores para los determinantes HBs y preS. Posteriormente procesan estos viriones que contienen el AgHBe y presentan los epítomos derivados de su degradación a las células T CD4+ AgHBc específicas. A su vez, estas células T pueden ayudar a las células B envoltura específicas a producir anticuerpos anti-envoltura⁷⁰. Por tanto, la respuesta CD4 core específica ejerce un importante papel en el control viral.

Durante la infección crónica por VHB la respuesta periférica T HLA-II restringida contra todos los antígenos virales es mucho menos vigorosa que en sujetos con hepatitis aguda⁵⁴. Aunque estas células se detectan en el hígado de estos pacientes, parece que están presentes en muy baja frecuencia. Se ha observado que la respuesta T CD4 nucleocápside específica aumenta durante las exacerbaciones de la hepatitis crónica B y va siempre precedida de una elevación en DNA VHB y del AgHBe⁷¹. Sin embargo, durante estos episodios el AgHBs permanece estable y la respuesta proliferativa a antígenos de la envoltura es débil o indetectable. Por tanto, estos datos sugieren que la respuesta T HLA-II restringida puede ejercer un papel inmunorregulador en el control de la infección crónica y parece que su intensidad depende de la concentración de antígenos de la nucleocápside del VHB.

II.4.3 Respuesta inmune HLA-I restringida.

Hasta ahora hemos comentado cómo la respuesta celular citotóxica juega un papel esencial en el control de la infección viral no citopática, por su capacidad para identificar y eliminar las células infectadas a través del reconocimiento de péptidos virales presentados en las moléculas HLA de clase I. También hemos revisado cómo se produce la interacción entre el receptor de la célula T y el complejo HLA clase I/péptido de la célula infectada. A continuación, hemos analizado las características antigénicas del VHB, a partir de cuyos péptidos las CPA y las células infectadas generaran los epítomos que presentarán en las moléculas de HLA-I a las células CD8 VHB específicas. Además, hemos resumido como influyen otros componentes del sistema inmune adaptativo en el control del VHB. Por tanto, es el momento de examinar el cometido que desarrollan las células protagonistas de esta tesis, es decir el papel que ejercen las células citotóxicas VHB específicas HLA-I restringidas tanto en la infección aguda como en la infección crónica por VHB.

1. Hepatitis aguda autolimitada

La mayoría de los datos obtenidos sobre el papel de los LTCs VHB específicos en la hepatitis aguda provienen de la investigación en animal de experimentación. En modelos experimentales murinos se ha observado como los LTCs HLA-I restringidos VHB específicos son capaces *in-vivo* de destruir la célula diana mediante apoptosis⁷². Curiosamente, las consecuencias patológicas directas de esta destrucción son mucho menos severas que la producida por la respuesta antiinflamatoria no antígeno específica que inducen los LTCs VHB específicos cuando reconocen el antígeno. También se ha

demostrado experimentalmente que es posible el control de la replicación viral mediante mecanismos no citolíticos. Se ha observado como la producción de citoquinas tipo 1 (γ IFN, TNF β) por los LTCs VHB específicos es capaz de inhibir la replicación viral sin producir daño tisular^{7,8}. Estas citoquinas parecen activar mecanismos de defensa presentes en el hepatocito⁷³. Datos de estudios con chimpancés infectados con VHB sugieren que los mecanismos de defensa no citolíticos podrían ser más importantes que la directa eliminación de los linfocitos infectados⁷⁴. En este estudio se ha observado que la replicación y expresión del VHB puede ser completamente abolida bajo condiciones en que menos del 1% de los hepatocitos es destruido, sugiriendo este dato un papel primordial a los mecanismos no citolíticos, al menos en este modelo.

Mediante un modelo experimental de ratón transgénico que expresa el antígeno s de la hepatitis B (AgHBs) se ha observado que la transferencia de LTCs específicos *contra el epítipo AgHBs 25-39 desencadena un proceso inmunológico que podría explicar los fenómenos inmunopatológicos observados en la infección en el ser humano*⁷⁵. En este modelo en un estadio inicial se produce la apoptosis de un número reducido de hepatocitos por contacto directo entre el LTC VHB específico y la célula infectada (cuerpos de Councilman). Posteriormente las citoquinas generadas por los LTCs VHB específicos producen una activación de LTCs no antígeno específicos y neutrófilos que contribuyen al desarrollo de un fenómeno inflamatorio. Finalmente, en este modelo se describe un tercer paso mediado por IFN γ , caracterizado por el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV por activación de macrófagos y linfocitos que conduce a un cuadro de hepatitis fulminante. En este modelo no se estudia el papel que ejercen mecanismos no citolíticos sobre el control viral.

Junto a todos estos datos experimentales existen muchos datos procedentes de estudios transversales en seres humanos. En estos trabajos se han descrito muchos epítomos del VHB que son reconocidos por los linfocitos CD8 antígeno específicos. La mayoría de estos epítomos analizados son HLA-A2 restringidos por la mayor facilidad de estudio de estos pacientes, al ser este HLA el más frecuente en la raza caucásica. Todos estos epítomos presentan los residuos predichos para unirse a los puntos de anclaje de la molécula HLA-A2, que son un aminoácido leucina en la posición 2 y una valina en la posición carboxiterminal⁵⁴.

Del estudio de la respuesta celular CD8+ VHB específica en pacientes con infección aguda que controlan el virus, se ha observado que es una respuesta policlonal y multiespecífica⁵⁴. El hecho de ser multiespecífica implica que son reconocidos en un mismo individuo varios epítomos del virus a la vez, lo que supone que sea difícil para el virus evadir la respuesta inmune desarrollando mutaciones de escape. Además, al ser una respuesta policlonal ocasiona que distintos clones de células T sean capaces de reconocer a la vez el mismo epítopo lo que amplifica la respuesta. Por otro lado, se ha observado que muchos de estos epítomos virales identificados son esenciales para el virus, lo que impide que puedan ocurrir mutaciones de escape a este nivel. Por ejemplo, las señales de localización nuclear y encapsidación del genoma del VHB, debida a los residuos del AgHBc 141-151, son un importante epítopo para los LTCs de sujetos con HLA-A31 y HLA-Aw68⁸¹. Otra importante conclusión obtenida de estos trabajos es que varios de estos epítomos, especialmente core 18-27, superficie 250-258, superficie 335-343 y polimerasa 455-463, son reconocidos por la mayoría de pacientes infectados HLA-A2+, mientras que el resto de epítomos son “vistos” por una minoría de sujetos.

Estos datos sugieren que existe una jerarquía en la respuesta celular citotóxica contra el virus B, es decir existe cierto grado de inmunodominancia entre determinados epítomos⁴⁹. Esta inmunodominancia probablemente quede determinada por la afinidad de unión del epítomo a la molécula de HLA (en estos casos descritos A2) y por el grado de conservación del epítomo entre las diferentes cepas de VHB.

A pesar de esta vigorosa respuesta de linfocitos T VHB específicos en la infección aguda, se ha descubierto que concentraciones muy bajas virales persisten durante décadas después de la recuperación clínica y serológica completa, habiéndose detectado hasta 20 años después de la infección^{76,77}. El VHB es probablemente transcripcionalmente activo, ya que coexiste en estos sujetos con una respuesta citotóxica específica con marcadores de reciente activación. También se ha comprobado como esto también es cierto en la *marmota monax* que desarrolla una infección aguda por el hepadnavirus WHV. Este animal es capaz de transmitir la infección a sus hijos tiempo después de su completa recuperación de la hepatitis aguda⁷⁸. Estos hallazgos sugieren que pequeñas cantidades de VHB persisten en reservorios privilegiados tras la seroconversión y que la propagación de la infección es controlada por los LTCs, puesto que algunos de estos sujetos carecen de anticuerpos contra AgHBs. Por tanto, es posible que hígados o sangre de sujetos con una antigua infección aguda por VHB puedan transmitir la enfermedad al receptor de estos tejidos⁷⁹.

De todos estos datos podemos concluir que la respuesta celular citotóxica es capaz de controlar la infección aguda por VHB por medios citolíticos y no citolíticos, siendo esta última faceta quizás la más importante. Además, los sujetos con infección aguda que controlan la infección muestran una respuesta policlonal y multiespecífica de

gran intensidad, suficiente para ser detectada en sangre periférica. Sin embargo, el adecuado control viral no significa desaparición completa del virus en la mayoría de los casos.

2. Infección crónica por virus B.

Como se ha comentado con anterioridad en un porcentaje de casos el huésped no es capaz de controlar la infección. Para un virus no citopático, como el VHB, la manera de cronificarse es no induciendo una respuesta inmune o bien desarrollando mecanismos para evadirla. Especialmente importante para el VHB es conseguir escapar al control ejercido por los LTCs VHB específicos. Varios son los mecanismos que se especula podrían permitir esta situación.

En análisis transversales se ha observado que la respuesta celular citotóxica VHB específica en pacientes con hepatitis crónica B es débil o prácticamente indetectable en sangre periférica^{26,80,81,82}, excepto durante las exacerbaciones de la hepatitis crónica o tras la resolución espontánea o tras tratamiento con IFN α ⁸³. Sin embargo, estas células se han demostrado en el compartimento periférico de algunos pacientes y también se han aislado clones de células T VHB específicas a partir de linfocitos intrahepáticos de sujetos con hepatitis crónica⁸⁴. Por tanto, podemos asegurar que al menos en algunos pacientes con hepatitis crónica B se aíslan LTCs antígeno específicos, pero éstas son incapaces de controlar completamente la infección aunque podrían ser las responsables del daño hepático.

Se puede especular que el VHB desarrolla mecanismos para alterar cualitativa o

cuantitativamente estas células. La tolerancia neonatal es probablemente una de estas estrategias. Este mecanismo es responsable de la ausencia de respuesta inmune al VHB y de la persistencia de la infección en los casos de transmisión materno-fetal. En esta situación el paso del AgHBe a través de la placenta provoca la eliminación de los linfocitos AgHBe y AgHBc específicos centralmente en el timo, al ser considerado este antígeno como propio⁸⁵. Sin embargo, la persistencia de la infección en el adulto no es bien comprendida. Quizás la explicación más simple para la persistencia del VHB es cuantitativa, basada en la cinética de la propagación viral y del desarrollo de la respuesta de los LTCs durante los primeros momentos de la infección. Por ejemplo, la persistencia viral podría surgir si el tamaño del inoculo o la velocidad de replicación del VHB excediera la velocidad de la respuesta citotóxica.

Sin embargo, se han planteado otras posibilidades para explicar porqué la respuesta citotóxica es menos intensa en la infección crónica que en la aguda. Un candidato razonable sería la inducción de tolerancia periférica o fatiga en la respuesta citotóxica por la elevada carga viral que caracteriza a la mayoría de pacientes con infección crónica. Así, en estudios en modelos experimentales murinos, se ha sugerido que el AgHBe en alta concentración podría inducir inmunotolerancia periférica en el adulto, al deplecionar al animal experimental de células CD4 AgHBc/AgHBe específicas. El déficit de estas células sería decisivo para impedir la correcta actuación de los LTCs VHB específicos⁸⁶. De cualquier manera esto no ha sido demostrado en el ser humano.

También se ha sugerido que las células infectadas que expresan Fas ligando pueden protegerse ellas mismas contra el daño citotóxico, mediante la destrucción por la

misma vía, Fas ligando-Fas receptor, que utiliza el LTC para eliminar a su célula diana pero al revés⁸⁷. Puesto que los hepatocitos pueden ser inducidos a expresar Fas ligando durante la respuesta inflamatoria podría ocurrir que estas células eliminaran selectivamente sus LTCs VHB específicos y así permanecer crónicamente infectadas. Si bien esta posibilidad es muy atractiva para explicar la aparente inmunodeficiencia VHB específica que caracteriza a los pacientes crónicamente infectados con el VHB, en el momento actual es una idea meramente especulativa.

Otros posibles mecanismos de persistencia podrían actuar sobre la capacidad de los LTCs VHB específicos para reconocer la célula infectada. Así, un posible causante de la persistencia podría ser el acantonamiento del virus en reservorios privilegiados a donde no podrían llegar los LTCs antígeno específicos. Se ha demostrado que los LTCs VHB específicos pueden reconocer antígenos virales en los hepatocitos, pero no en el riñón o cerebro del ratón transgénico que expresa los péptidos virales⁷². En el ser humano se han descrito formas replicativas del virus en epitelio biliar, células del músculo liso, páncreas, riñón, piel, cerebro, ganglios linfáticos y tejido endocrino⁶⁶, por tanto las partículas virales acantonadas en algunos de estos lugares podrían escapar al control ejercido por las células CD8 VHB específicas.

El papel de las mutaciones de escape en epítopos de LTC VHB específicos ha atraído recientemente el interés de investigadores como causa de la persistencia viral. Pero teóricamente para que se produjeran estas mutaciones debería ocurrir una fuerte respuesta celular citotóxica principalmente monoclonal, centrada en un solo epítipo. Esta situación favorecería el desarrollo de variantes virales que no expresarían un determinado epítipo puesto que las haría virtualmente invisibles al sistema inmune. Sin

embargo, este tipo de respuesta es extremadamente inusual en la respuesta citotóxica contra el VHB. Pues como ya se ha señalado, durante la hepatitis aguda la respuesta de los LTCs es típicamente vigorosa y multiespecífica, y débil o indetectable durante la hepatitis crónica. Por tanto, se puede concluir que este mecanismo de persistencia es poco frecuente⁸⁸; sin embargo, se han descrito algunos casos⁸⁹. No obstante se debe tener en cuenta que estas variantes aparecen en sujetos con infección persistente, por lo que probablemente, es la infección crónica la que favorece la aparición de variantes de escape y no al revés. Éste puede ser el caso, comentado anteriormente, de la común mutación G-A en el nucleótido 1896 del genoma del VHB que genera el codón de parada traslacional que impide la generación de la síntesis de la proteína del pre-core provocando la seroconversión a AgHBe-. Se ha sugerido que el virus con mutación pre-core disfrutaría de ventajas de crecimiento sobre el virus silvestre cualquiera que sea la respuesta inmune, pues la ausencia del AgHBe aumenta la estabilidad conformacional de la señal de encapsidación del RNA viral, lo cual juega un papel esencial en la replicación viral⁹⁰. Además, se ha demostrado recientemente que la expresión de la proteína del pre-core induce una disminución de la eficacia de replicación *in vivo*⁹¹. Estas ventajas del VHB con mutación pre-core sobre el "silvestre" indican que se trata probablemente de una selección natural que ocurriría en sujetos infectados crónicamente y no es una mutación de escape en el seno de una respuesta inmune intensa, restringida a un epítipo del AgHBe. Sobre los restantes mecanismos posiblemente implicados en la persistencia de una infección viral comentados en la sección II.2 no existen evidencias de que ocurran en la infección por VHB.

En resumen, en el momento actual sabemos que en los pacientes con persistencia del AgHBs existe una respuesta celular citotóxica inferior que en los sujetos que

seroconvierten a Ac antiHBs, aunque no están claramente definida las posibles causas de esta diferencia. Tampoco se conoce si en todos los sujetos con persistencia del AgHBs la respuesta celular citotóxica específica es similar, independientemente de la actividad de la enfermedad.

II.5. RESPUESTA CELULAR CD8 CORE 18-27 ESPECÍFICA.

En esta sección se revisa el conocimiento acumulado sobre la respuesta celular CD8 core 18-27 específica en sujetos HLA-A2+ infectados por el VHB, por ser esta la respuesta que usaremos como modelo de estudio de la respuesta celular citotóxica HBV específica en esta tesis doctoral.

En 1991 el grupo del Dr. Carlo Ferrari demostró por primera vez en humanos la

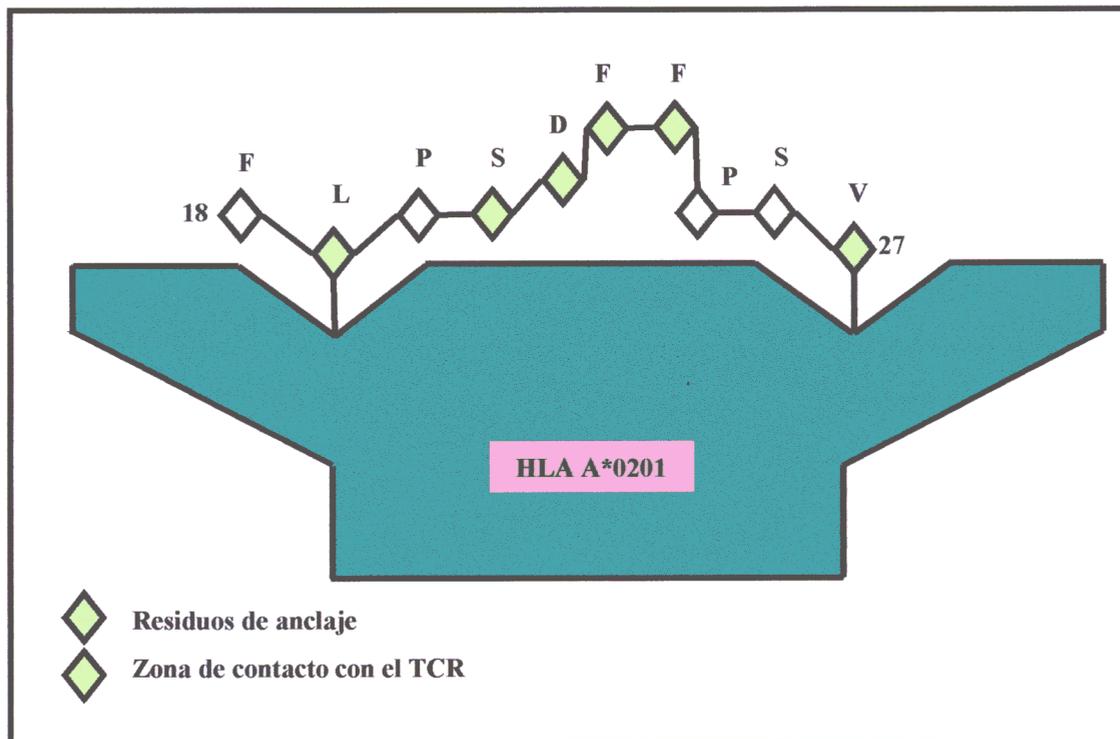


Fig.- II.5. Representación esquemática de una molécula de HLA-A*0201 presentando en la brecha el péptido del core 18-27 del VHB. Se muestran los residuos de anclaje a la molécula de HLA y los aminoácidos de contacto con el TCR.

existencia de una respuesta celular citotóxica específica contra el VHB HLA clase I restringida^{92, 80}. Se trataba del epítipo HLA-A2 restringido del antígeno del core situado en la secuencia 11-27. Esta cadena de aminoácidos se encuentra conservada entre la mayoría de subtipos del VHB. Posteriormente, con el avance sobre el conocimiento de la interacción entre el complejo HLA clase I y el péptido se observó que el verdadero epítipo era la secuencia 18-27^{93,45}. La secuencia de aminoácidos de este péptido es: F L P S D F F P S V. Como se ve presenta los residuos adecuados para poder ser presentado por una molécula de HLA-A2, es decir un lisina en la posición 19 y una valina en la posición 27⁹⁴. Por otra parte, el residuo 24 también juega un papel secundario en la unión a la molécula de histocompatibilidad. La parte central del epítipo es la zona expuesta y es por tanto importante en la interacción entre el TCR y el complejo HLA-A2/péptido core 18-27. La posición 22 parece crucial para la activación de los LTCs puesto que sustituciones no conservativas en este lugar impiden la actividad citolítica de estas células, mientras que las 21 y 23 son solo importantes en algunos clones⁹⁴. LTCs capaces de reconocer el complejo HLA*A0201/core 18-27 también reconocen este péptido si es presentado por otros subtipos de HLA-A2 como HLA-A0202, HLA-A0205, HLA-A0204 y HLA-A0206⁹⁴.

Las propiedades bioquímicas y cristalográficas de la interacción entre el péptido 18-27 y la molécula de HLA-A2 han sido extensamente caracterizadas^{95,96,93}. Este hecho, junto al profundo conocimiento inmunológico sobre la respuesta de LTCs contra este epítipo en sujetos HLA-A2 con infección por VHB, convierte a esta respuesta en un buen modelo para analizar la respuesta celular citotóxica específica contra el VHB en el ser humano. En la figura II.5 se esquematiza una molécula de HLA-A0201 presentando el péptido core 18-27.

La afinidad del péptido core 18-27 por el complejo HLA-A2 es muy elevada, concretamente una concentración de 3.3 nM es capaz de saturar el 50% de los complejos HLA-A2. Se sabe que existe una relación entre la afinidad de unión a la molécula de clase I y la inmunogenicidad. Se considera que aquellos péptidos con una afinidad alta (<50 nM) tienen gran potencial inmunogénico. En un estudio de la inmunogenicidad de este péptido, se evaluó la capacidad de los linfocitos CD8 de pacientes HLA-A2 con hepatitis aguda para lisar células diana HLA-A2+ pulsadas con el péptido core 18-27. Se observó que un 65% de los pacientes tenía una respuesta citotóxica contra este epítipo⁹⁷. De entre todos los péptidos analizados fue una de las más altas, siendo solo igualada por el péptido polimerasa 575-583 y polimerasa 455-463. Estos datos nos indican que el péptido core 18-27 presenta características de inmunodominancia en la respuesta celular en sujetos HLA-A2. Aunque también hay que tener en cuenta que en un 35% de estos individuos no fue posible detectar esta respuesta, ya sea por estar presente en baja frecuencia y no ser detectable con la técnica utilizada o porque sencillamente estos individuos desarrollaron una respuesta contra otros epítipos distintos. De cualquier manera debido a estas potentes características inmunogénicas este péptido ha sido elegido para la elaboración de una vacuna terapéutica para inducir una respuesta celular citotóxica en pacientes con infección crónica por VHB^{98,99}.

Actualmente sabemos que esta respuesta está presente en la sangre periférica de la mayoría de sujetos con hepatitis aguda. La frecuencia más alta coincide con la fase clínica de la infección. Durante esta fase, estas células muestran un fenotipo de activación (HLA-DR+, CD38+, CD62L-, CD45RA-) y ninguna capacidad de expansión

in vitro. Sin embargo, en la fase de recuperación, estos linfocitos disminuyen en frecuencia, expresan un fenotipo de células en reposo y vuelven a adquirir la capacidad de proliferar¹⁰⁰. Además, estas células eran capaces de producir IFN γ *in vitro* y de lisar células diana pulsada con el péptido core 18-27¹⁰⁰. Estos datos demuestran que en los pacientes HLA-A2+ que controlan la infección tienen unas células CD8 core 18-27 específicas con capacidad citolítica y de producir citoquinas tipo 1. Es decir, muestran las características típicas de una célula efectora con capacidad de control viral. Además, una vez han controlado la infección, las células de memoria CD8+ core 18-27 específicas vuelven a mostrar la capacidad de expansión clonal ante el estímulo antigénico.

La respuesta en la infección persistente está peor estudiada, pero se ha sugerido que sería muy débil o estaría abolida⁹². Estas diferencias señalan una vez más que la actividad de estas células es importante en el control del VHB.

II.6. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS.

Anteriormente se ha justificado el interés del estudio de las células CD8+ VHB específicas en la infección por este virus, pero la siguiente cuestión es como analizarlas. La cuantificación de los linfocitos T citotóxicos ha dependido tradicionalmente del uso de análisis funcionales de la actividad citolítica de estas células. El problema de esta estrategia es la necesidad de tener una población de células efectoras suficientemente grande. Con el fin de mejorar la sensibilidad de estos análisis suele ser necesaria la expansión de la población de interés *in vitro*, durante al menos dos semanas antes de

analizar la función citolítica. Este proceso se realiza mediante el análisis de dilución límite en el cual se estimula *in vitro* una célula por pocillo para generar clones. Este tipo de análisis requiere que las células efectoras sean capaces de sobrevivir, dividirse y mantener su función *in vitro*. Además, el método de estimulación tiene que ser reproducible y efectivo. Tales técnicas dependientes de una proliferación pueden subestimar el número de estas células al detectar solamente una pequeña población de los linfocitos T citotóxicos. Datos provenientes de determinados pacientes con infección por VIH sugieren que este problema existe. Así, esto se ha observado en sujetos en los que ocasionalmente es posible detectar actividad citolítica directamente *ex vivo*, sin necesidad de un periodo de proliferación *in vitro*. Estos casos muestran una frecuencia de linfocitos citotóxicos VIH específicos en sangre periférica de 1 en 100 células mononucleares de sangre periférica (CMSP)^{101,102}. Esta cifra es muy superior a la que se conseguiría mediante análisis de dilución límite. Es decir, asumiendo una eficiente estimulación, esta diferencia se debe probablemente a que el análisis de dilución límite cuantifica solo a aquellos linfocitos T citotóxicos capaces de proliferar en cultivo durante dos semanas, lo cual subestima el número de células circulantes.

Recientemente otras técnicas basadas en la producción de citoquinas se han utilizado para cuantificar células antígeno específicas^{103,24,104}. Estos métodos potencialmente potentes no requieren una previa proliferación *in vitro*, pero son dependientes de la producción de citoquinas como interferón- γ , inducidas tras un periodo de estimulación con el péptido específico. La producción de estas citoquinas puede ser detectada mediante ELISPOT (ensayo de inmunomancha enzimático) o mediante tinción intracelular de citoquinas y citometría de flujo. La existencia de subtipos de linfocitos productores de citoquinas tipo 1 y tipo 2 (Tc1, Tc2) provoca que

tales técnicas subestimen la frecuencia de células citotóxicas antígeno específicas, al contar solo las células capaces de producir la citoquina evaluada. A pesar de esta potencial limitación, se ha demostrado que la frecuencia de linfocitos T específicos contra el virus de la coreomeningitis murina capaces de producir interferón- γ *ex vivo* es unas 2 unidades logarítmicas superior a la frecuencia obtenida mediante análisis de dilución límite. Estos datos confirman que la dilución límite solamente mide la relativamente pequeña población de linfocitos T antígeno específicos que pueden proliferar *in vitro* durante dos semanas.

Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una nueva tecnología que permite el recuento de los linfocitos CD8 antígeno específicos directamente *ex vivo* sin necesidad de ningún ensayo funcional. Desde que las células T fueron descubiertas, ha habido intentos para identificarlas a través de su capacidad para reconocer al antígeno.

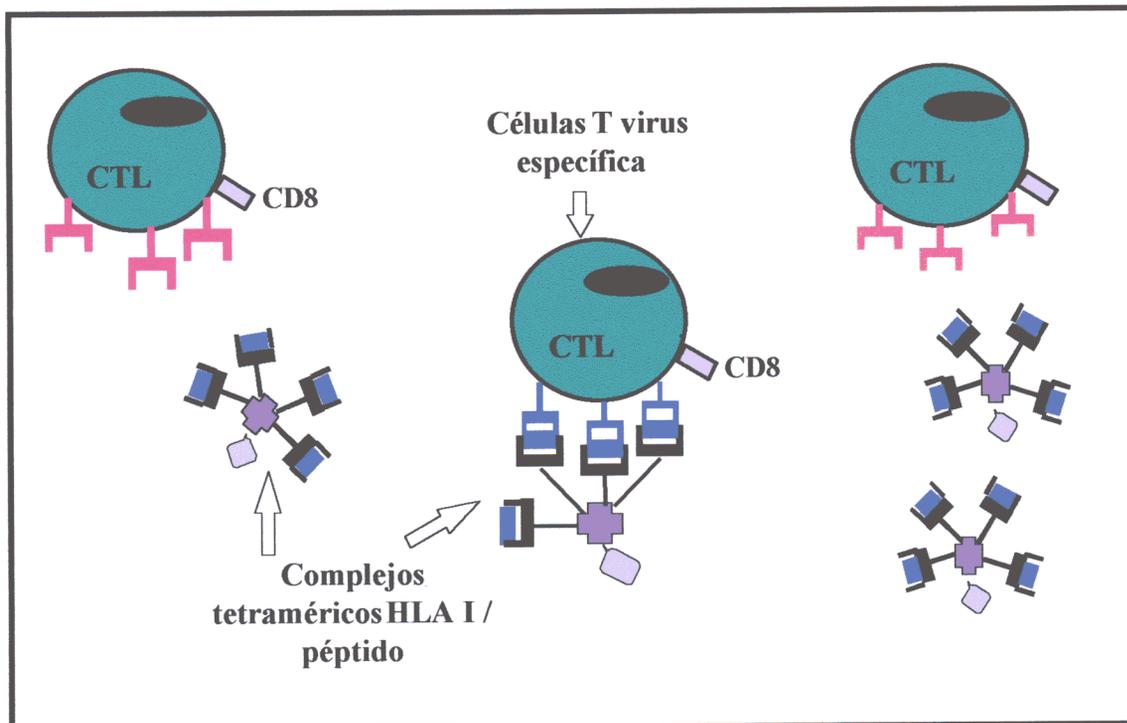


Figura II.6.- Complejos tetraméricos HLA-I/péptido uniéndose de forma específica al receptor de la célula T virus específica. CTL: linfocito T citotóxico.

Primero se descubrió que estas células reconocían el complejo formado por una molécula de HLA más un péptido. Posteriormente, se identificó al receptor de la célula T como la molécula que se unía al complejo HLA-péptido. No obstante, estudios realizados con receptores purificados y complejos HLA-péptido mostraron que aunque la unión era específica también tenía muy baja afinidad¹⁰⁵. Actualmente se especula que durante el reconocimiento de la célula infectada por la célula T, la baja afinidad y el rápido recambio son necesarios para permitir la interacción de cada receptor de la célula T con múltiples complejos HLA-péptido, como se comentó en la sección II.2.2¹⁰⁶. Estas características no son favorables para la tinción directa de estas células con complejos HLA-péptido. Para resolver este problema en 1996 Altman et al desarrollaron unas moléculas formadas por la unión de cuatro complejos HLA-péptido unidos a una molécula fluorescente que eran capaces de visualizar directamente los linfocitos citotóxicos antígeno específicos mediante citometría de flujo¹⁰⁷. Esta técnica no depende de la habilidad de las células para proliferar y así permite directamente la cuantificación de las células citotóxicas antígeno específicas sin una manipulación previa *in vitro*.

Los complejos tetraméricos HLA péptido se unen específicamente a los linfocitos T citotóxicos antígeno específicos que expresan el receptor de la célula T que reconocen la combinación HLA-péptido utilizada (Figura.-II.6). Esta técnica ha mostrado ser exquisitamente antígeno-específica y altamente sensible¹⁰⁸. Así, se ha descrito una sensibilidad diagnóstica inferior a una célula CD8+ antígeno específica entre 5000 linfocitos CD8¹⁰⁹. Por eso, esta técnica permite el análisis de respuestas celulares citotóxicas de baja frecuencia como por ejemplo a antígenos tumorales^{110,111} u otros autoantígenos¹¹² y puede ser muy útil en infecciones virales persistentes, como la

infección crónica por VHB, en las que la frecuencia de estas células es extremadamente baja.

Existen evidencias que demuestran que las células T CD8+ que unen los complejos tetraméricos forman una población celular funcional. Se ha observado que la actividad citolítica específica contra el VIH está asociado con el porcentaje de células CD8+ que se tiñen con el complejo tetramérico HLA péptido específico¹⁰⁹. Se debe destacar que porcentajes de lisis *ex vivo* inferiores al límite de detección (5-10%) pueden enmascarar frecuencias elevadas de linfocitos citotóxicos antígeno específicos. De modo que cuando la lisis péptido específica alcanza *ex vivo* entre el 5 y 10 % se descubren frecuencias superiores a una célula CD8 antígeno específica entre 100 CMSP mediante la tinción con complejos tetraméricos. Es decir, las técnicas utilizadas previamente subestimaban el número real de estas células si las comparamos con los datos obtenidos con esta nueva tecnología.

Experimentos que seleccionan mediante citometría de flujo las células CD8 teñidas con los complejos tetraméricos, demuestran que estas células tras ser estimuladas *in vitro* de forma específica, desarrollan una expansión que afecta a todas ellas¹¹², lo que demuestra la excelente sensibilidad de esta técnica.

Por todas estas características positivas hemos elegido en este trabajo la técnica de tinción con complejos tetraméricos HLA-I/péptido para el recuento de las células citotóxicas VHB específicas, tanto directamente *ex vivo* como tras estimulación antígeno específica *in vitro*. En el capítulo de material y métodos se describe el método de síntesis de estas moléculas diagnósticas.

II.7 JUSTIFICACIÓN DE ESTE ESTUDIO. DESARROLLO INDUCTIVO.

Como se ha descrito, existen claras evidencias que demuestran que en la infección por un virus no citopático los linfocitos T citotóxicos antígeno específicos desarrollan un papel central en la defensa anti-viral⁹. Se ha sugerido que su frecuencia, cinética y capacidad de migración¹¹³ entre otras, son características de las que depende el control viral. A estas habilidades de las células T citotóxicas para eliminar la infección se oponen factores virales para evitarlo. Algunos de ellos se comentaron previamente²⁹, como son la aparición de mutaciones en epítomos importantes, la colonización de lugares inmunológicamente privilegiados o la producción de factores que puedan inducir inmunotolerancia. De la interacción entre los diferentes elementos de este sistema multifactorial surge un equilibrio capaz o no de controlar la infección.

En la infección por VHB el patógeno consigue escapar al control del sistema inmune en una moderada proporción de sujetos⁵. Sin embargo, aunque se ha considerado que la respuesta celular citotóxica es muy débil en todos estos casos^{92,81,82}, la situación clínica no es igual en todos ellos⁵. Esta observación nos puede inducir a pensar que estas diferencias se deben a un distinto comportamiento de las células CD8+ VHB específicas en estos individuos. A continuación, basándonos en esta idea, se presenta el proceso inductivo que nos ha permitido plantear la hipótesis de esta tesis doctoral.

II.7.1 Cuadros clínicos en la infección persistente por VHB.

Entre todos los sujetos infectados por VHB, alrededor de un 5 por ciento de los adultos y un 95 por ciento de los neonatos presenta crónicamente el AgHBs⁵. El curso clínico de estos pacientes con infección persistente es muy variado, pudiendo en unos casos progresar a una inflamación crónica con posterior desarrollo de cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular, mientras que otros individuos permanecen en una situación asintomática, sin desarrollar ningún tipo de manifestación clínica². Globalmente, los casos sin control viral completo se pueden incluir mayoritariamente en dos grupos (Tabla.- II.1):

- a) Pacientes con inflamación hepática crónica y elevada replicación viral, normalmente definidos como hepatitis crónica B AgHBe+(HcBe+)⁵.
- b) Sujetos sin inflamación hepática y baja carga viral, habitualmente denominados portadores sanos (PS) del antígeno de superficie del VHB⁵.

En la figura II.7 se reproduce la imagen histológica de la infiltración hepática por linfocitos CD8⁺ en un sujeto PS y un paciente con HcBe⁺, en la que se puede observar el distinto grado de inflamación entre los dos casos. Una excepción a estos grupos es la infección con VHB con mutación en la región pre-core que suelen presentar un curso más agresivo y son más frecuentes en el área mediterránea¹¹⁴. Otra excepción la forman aquellos pacientes con elevada carga viral y sin signos de inflamación hepática que se encuentran en la denominada "fase de inmunotolerancia". Esta fase suele durar solamente unas semanas en la mayoría de pacientes (periodo de incubación).

Sin embargo, es habitual que se perpetúe en pacientes con transmisión vertical⁵.

Los individuos con HCBe+ se caracterizan por elevación de la actividad sérica de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) y por la positividad de marcadores de replicación viral, como el antígeno e (AgHBe) y el DNA viral (DNA VHB). Por el contrario, los PS tienen una concentración sérica de DNA VHB prácticamente indetectable mediante técnica de hibridación y el AgHBe sérico es negativo. Además, la actividad sérica de ALT es normal y no muestran datos histológicos de inflamación hepática¹¹⁵. No obstante, en ambos grupos permanece positivo el antígeno de superficie del VHB (AgHBs), indicando la persistencia de la infección. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de estos dos grupos por representar extremos opuestos en el grado de control viral y daño hepático en sujetos con persistencia del AgHBs, situación que consideramos pueden estar relacionada con las características de la inmunidad celular citotóxica.

Estudios sobre la historia natural de la infección crónica por VHB indican que estas dos formas descritas representan dos diferentes estadios evolutivos en la infección crónica B¹¹⁵. Se ha observado que, tanto de forma espontánea como tras tratamiento, los sujetos con HCBe+ pueden seroconvertir apareciendo anticuerpos contra el AgHBe (AcHBe) y negativizándose el DNA VHB medido con técnicas convencionales. Podemos considerar que existen determinados factores en ambos grupos de pacientes que determinan respuestas citotóxicas diferentes que condicionan el estadio de la enfermedad, y que cambios en esta respuesta pueden inducir cambios en la situación clínica. En los siguientes dos puntos se analiza porqué especulamos con que existe una adecuada respuesta celular citotóxica VHB específica con control viral y sin daño

hepático en la infección persistente por VHB en sujetos PS y no en pacientes con HCB^{e+}, que es en definitiva la base de la hipótesis de esta tesis doctoral.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
	Inmunotolerancia	Hep. Crónica	Portador sano	Inmune
AgHBs	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Ac antiHBs	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
DNA VHB	Positivo	Positivo	Negativo [#]	Negativo
AgHBe	Positivo	Positivo*	Negativo	Negativo
Ac antiHBe	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
ALT	Normal	Elevada	Normal	Normal

Tabla II.1: Distintas fases de la infección persistente por VHB. # Aunque el DNA viral es negativo mediante técnicas de hibridación, se puede demostrar en muchos pacientes mediante PCR. * El AgHBe es negativo en pacientes con hepatitis crónica infectados con VHB con mutaciones en la región pre-core.

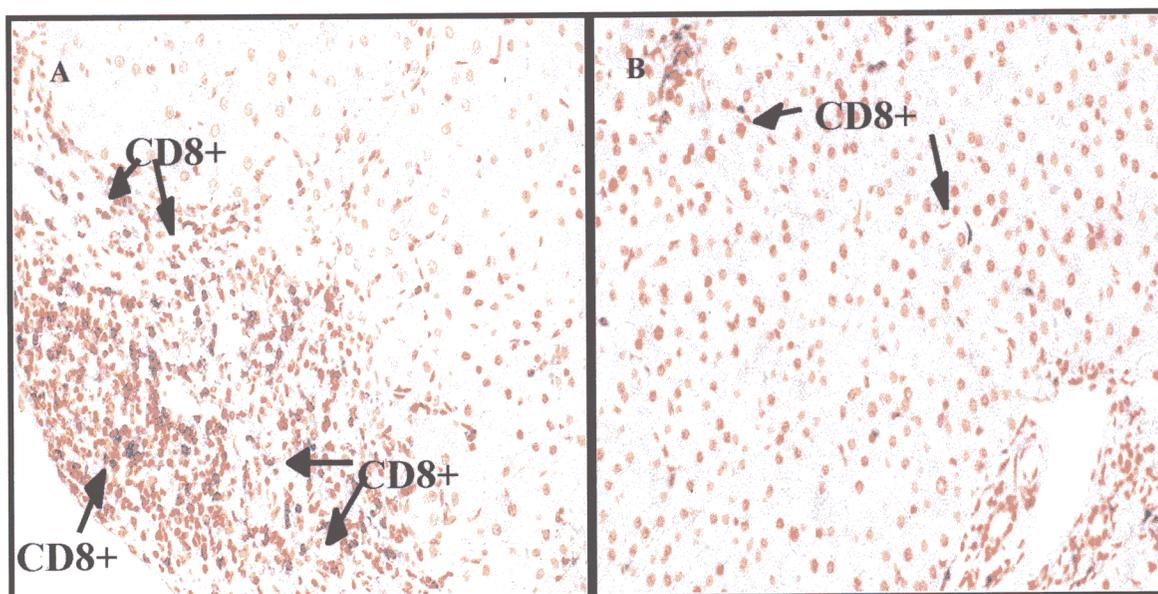


Figura II.7. Tinción inmunohistoquímica que muestra el infiltrado linfocitario T CD8⁺ en el hígado de un sujeto portador sano (B) y un paciente con hepatitis crónica (A). Los linfocitos CD8⁺ se han teñido en negro mediante la técnica de inmunoperoxidasa y los hepatocitos en marrón con hematoxilina. Se puede observar un mayor infiltrado localizado en el espacio porta en el caso B, mientras que en A el infiltrado es menor y se distribuye por el parenquima.

II.7.2 Respuesta celular citotóxica y daño hístico.

Clásicamente se ha considerado que el control de la replicación del virus B va ligado a fenómenos inmunológicos que producen inflamación. Es decir, se supone que de la interacción de la célula citotóxica VHB específica y la célula infectada surge el control viral solamente mediante mecanismos citopáticos. Así, se considera por algunos autores que sujetos con infección persistente pero sin signos de daño hepático carecen de una respuesta celular activa contra el VHB^{115,116}. Sin embargo, actualmente sabemos por modelos experimentales que no se requiere una destrucción masiva de hepatocitos infectados para controlar esta infección^{7,74}. También hay datos que demuestran que sujetos que han sufrido una hepatitis aguda y que se han recuperado totalmente, mantienen durante décadas un reservorio viral y de linfocitos CD8 VHB específicos pero sin datos de daño hepático⁷⁷. Además, se ha observado que en la infección por VHC en chimpancés, las células citotóxicas antígeno específicas contra el virus de la hepatitis C persisten en el hígado normal tras un año de la resolución de la infección aguda¹¹⁷. Es decir, a pesar de encontrarse el hígado infiltrado por células citotóxicas que controlan la infección no hay necrosis de hepatocitos. Además, existen modelos experimentales como la infección murina por el virus de la influenza, en las que el estricto control viral depende de la cinética y distribución de las células CD8 virus específicas¹¹³. En este modelo el control viral se lleva a cabo por la respuesta inmune antígeno específica sin daño tisular. Igualmente, en otras infecciones humanas tales como la infección por HTLV-I se produce el control de la infección tras una potente respuesta inmune antígeno específica sin daño hístico, mientras que una respuesta insuficiente ocasiona alteraciones tisulares^{118,119}.

Estos datos nos permiten pensar que en la infección persistente por VHB podría plantearse la misma situación que en los casos previamente comentados. Es decir, los sujetos portadores sanos que se caracterizan por la ausencia de lesión hística desarrollarían una correcta respuesta celular citotóxica, mientras que ésta estaría alterada en los pacientes con daño hepático.

II.7.3 Respuesta celular citotóxica y control viral.

Se han desarrollado modelos matemáticos para analizar la relación entre la respuesta inmune celular y la carga viral. Estos modelos se basan, como ya hemos comentado, en que existe una interacción entre la infección viral y el sistema inmune de cuyo equilibrio depende el control de la infección.

Antes de discutir la aportación de estos modelos matemáticos al desarrollo de la hipótesis de esta tesis doctoral, definiremos dos conceptos inmunológicos importantes. El primero es el concepto "respuesta celular citotóxica" que denota el número de linfocitos T citotóxicos que tiene un determinado sujeto en un punto en el tiempo. Esta respuesta depende de la cantidad de estímulo aportada por el virus, es decir de la carga viral. La respuesta celular y la carga viral están relacionadas de tal manera que una fuerte respuesta celular citotóxica puede reducir la carga viral, pero a su vez esta carga viral disminuida será un débil estímulo que ocasionará con el tiempo un descenso en la respuesta celular. El segundo concepto es la "capacidad de respuesta celular citotóxica" que se define como la habilidad de un sujeto para desarrollar una respuesta celular a un determinado virus. A escala celular es la velocidad a la que una determinada célula citotóxica antígeno específica es capaz de proliferar tras encontrar a la célula infectada.

Esta capacidad de respuesta puede tener gran importancia en el control de la infección, pues en caso de no desarrollarse correctamente permitirá que se establezca una situación de equilibrio entre el virus y la célula citotóxica virus específica a favor del patógeno.

En un análisis realizado por M. A. Nowak y C. R. M. Bangham¹²⁰ se predice que en una infección viral persistente por un virus no citopático existirán dos tipos de sujetos denominados respondedores débiles y respondedores fuertes. Los respondedores fuertes tendrán una correcta capacidad de respuesta tras encontrar al virus con lo cual reducirán rápidamente la carga viral. Posteriormente, tras descender la carga viral se alcanzará un estado de equilibrio en el que la frecuencia de células CD8 antígeno específicas también descenderá al disminuir el estímulo antigénico. En los respondedores débiles la capacidad de respuesta esta muy reducida por lo que la carga viral permanecerá en todo momento elevada y la frecuencia de linfocitos CD8 virus específicos será siempre baja. Bajo este modelo si realizamos un estudio transversal encontraremos en un punto en el tiempo una frecuencia similar de células citotóxicas virus específicas en ambos tipos de sujetos, sin embargo la capacidad de respuesta será completamente diferente entre los individuos que controlan la viremia y los que no. En la figura II.8 se representa las cinéticas teóricas virales y de los LTCs de un respondedor fuerte y uno débil.

Esta misma situación pensamos que podría ocurrir en la infección persistente por VHB, en la que los PS se comportarían como los respondedores fuertes del modelo matemático y los pacientes con HCB_e⁺ como los respondedores débiles.

En conclusión, los puntos en que nos hemos basado para establecer nuestra

hipótesis son:

1. En la infección persistente por VHB hay dos grandes grupos de sujetos caracterizados por diferente control viral y daño hepático.
2. Existen criterios teóricos y experimentales para pensar que esta diferencia puede estar relacionada con la respuesta celular CD8+ VHB específica.

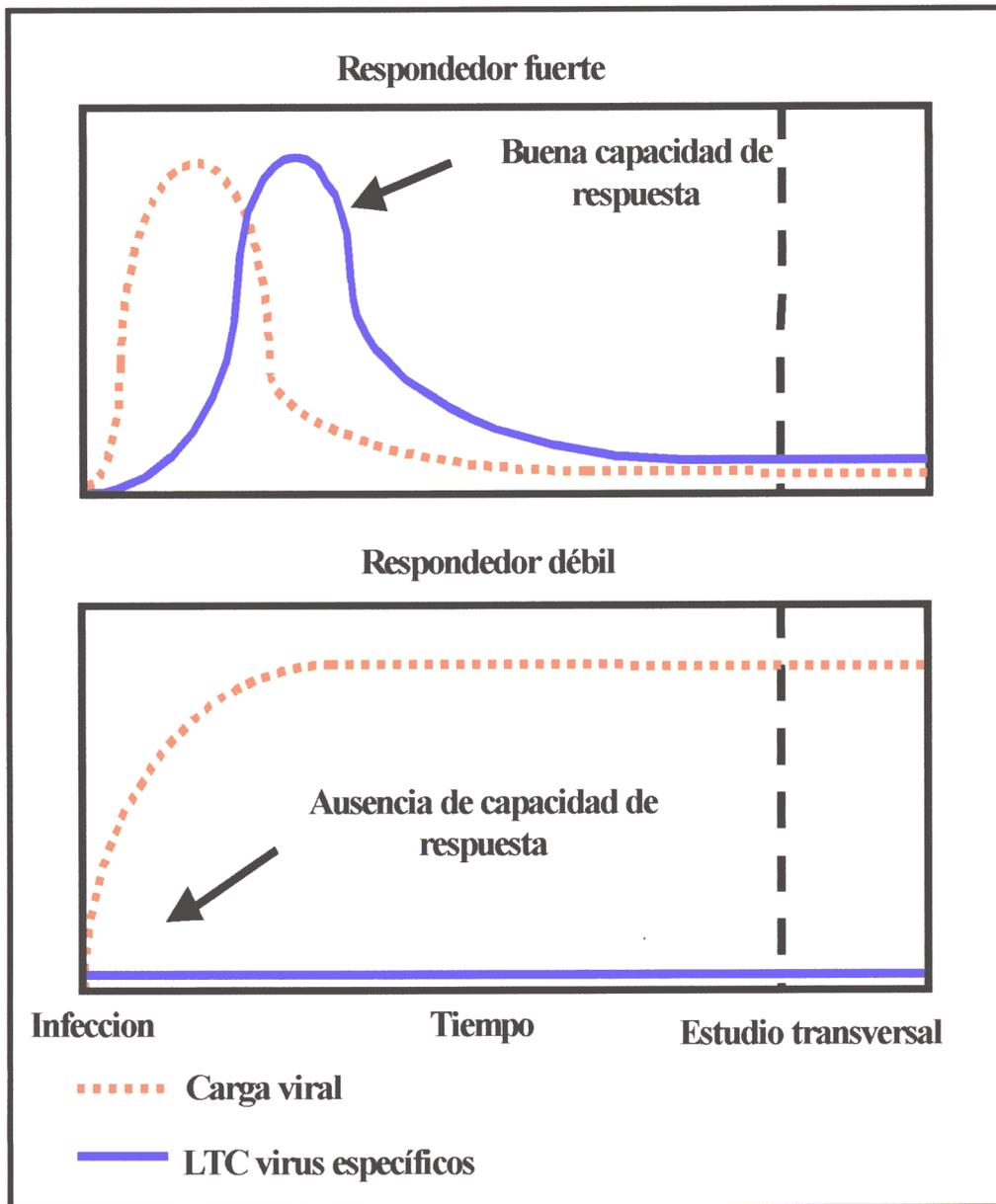


Fig. II.8 Representación de la teórica cinética viral y celular citotóxica en un modelo de respuesta inmune fuerte y débil.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Basándonos en el proceso inductivo comentado en el capítulo anterior, planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis.

1. La capacidad de respuesta celular citotóxica VHB específica en la infección persistente por VHB se encuentra disminuida en los pacientes con hepatitis crónica AgHBe+ en comparación con los portadores sanos.

Para contrastar la validez de estas hipótesis trazamos los siguientes objetivos de estudio:

Objetivo general.

1. Evaluar en individuos con infección persistente por VHB la relación entre el estadio clínico (PS frente a HCBe+) y la respuesta inmune celular CD8 VHB específica.

Objetivos específicos

1. Comparar la frecuencia de los linfocitos CD8+ core 18-27 específicos de sangre periférica en individuos HLA-A2+ con infección persistente por VHB en función del estadio clínico (PS frente a HCBe+).

2. Comparar la capacidad de expansión de los linfocitos CD8+ core 18-27 específicos de sangre periférica tras estimulación con el péptido del core 18-27 del VHB entre portadores sanos HLA-A2+ y sujetos con hepatitis crónica AgHBe+ HLA-A2+.

3. Relacionar el grado de daño hepático (transaminemia) y carga viral con las características de la respuesta celular citotóxica contra el epítipo core 18-27 en sujetos HLA-A2+ con infección persistente por VHB.

IV. DISEÑO, MATERIAL Y MÉTODOS.

IV.1 DISEÑO.

IV.1.1 Tipo de estudio.

Para contrastar la hipótesis planteada se diseñó un estudio no experimental transversal analítico¹²¹, en el que se investigó la frecuencia y capacidad de expansión de los linfocitos CD8 core 18-27+ específicos de sangre periférica (variables respuesta), en sujetos con infección persistente por virus B con distinto control de la infección y grado de inflamación hepática (variable exposición).

IV.1.2 Ambito del estudio.

El estudio se realizó en el área de salud de los distritos londinenses de Islington y Camden. Los casos se recogieron en las consultas externas de atención especializada de enfermedades infecciosas del Centro Mortimer Market del Servicio Nacional de Salud Británico (Londres, Reino Unido). El estudio se desarrolló entre los meses de septiembre de 1998 y febrero de 2000.

IV.1.3 Selección de los sujetos de estudio.

1. Criterios de admisión en el estudio.

Durante el periodo del estudio se eligieron mediante muestreo consecutivo los pacientes remitidos con el diagnóstico de infección crónica por el VHB que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

1.1 Criterios de inclusión:

- Edad entre 16 y 65 años.
- Persistencia del AgHBs durante mas de seis meses. Este criterio se utilizó para definir la presencia de infección persistente por VHB.
- Haplotipo HLA-A2 positivo. El estudio se restringió a este grupo de pacientes porque disponíamos exclusivamente de la tecnología para detectar los linfocitos CD8 core 18-27 específicos HLA A2 restringidos.
- ALT elevada, AgHBe positivo y DNA VHB elevado. Este conjunto de sujetos formó el grupo de pacientes con hepatitis crónica AgHBe+.
- ALT normal, AgHBe negativo y DNA VHB bajo. Estos sujetos cumplían los criterios de portador sano del AgHBs.

1.2. Criterios de exclusión:

- ALT elevada, AgHBe negativo y DNA VHB elevado. Este grupo de pacientes presentaba probablemente una infección por VHB con mutación precore. Se decidió excluir a estos sujetos porque pueden desarrollar un cuadro clínico más agresivo que el resto de pacientes con hepatitis crónica^{122,123}. Diversos estudios sugieren que el antígeno e puede inducir la aparición de inmunotolerancia en el adulto⁸⁶ y durante la transmisión vertical⁸⁵. Por esta razón es posible que estos sujetos presenten una respuesta celular citotóxica de características diferentes, al estar infectados por una variante viral que no expresa el antígeno e.

- ALT normal, AgHBe positivo y DNA VHB elevado. Estos sujetos se encuentran en la denominada "fase de inmunotolerancia". En ciertas áreas donde predomina la transmisión vertical esta fase puede mantenerse durante varias décadas^{5,124}. Se excluyó a este grupo de sujetos porque seguramente desarrollan una respuesta celular citotóxica con características diferenciales a la de los grupos estudiados en este trabajo.

Tanto los pacientes en fase de inmunotolerancia como los sujetos con hepatitis crónica AgHBe- tendrían que haber sido estudiados en grupos independientes de los grupos que participaron en este estudio. Dada la baja prevalencia de estas categorías clínicas en el Reino Unido se decidió previamente excluirlos de este trabajo al considerarse que no se alcanzaría un número de casos suficientes para estudiar correctamente la respuesta celular citotóxica VHB específica en estos sujetos.

- Tratamiento antiviral actual o en los seis meses previos a la entrevista. Estos casos fueron excluidos por el indudable efecto que puede ejercer el tratamiento sobre el equilibrio entre la respuesta celular citotóxica y la infección viral.

- Datos clínicos de descompensación hepática, definida por una concentración de bilirrubina sérica elevada (2.5 veces sobre el límite de normalidad), un tiempo de protrombina alargado mas de tres segundos y una concentración de albumina sérica inferior a 3 g/dL o historia clínica de ascitis, varices o encefalopatía.

- Evidencia de hepatitis autoinmune definida como anticuerpos antinucleares superiores a un título de 1/160.

- Consumo de mas de 80 g. de etanol al día. Los sujetos con consumo elevado de etanol se excluyeron porque el posible daño hepático generado por el etanol podría confundir el grado de inflamación hepática debido al VHB.

- Coinfección por VHC o VHD. Fueron excluidos los pacientes co-infectados con otros virus por desconocerse el efecto que pueden ejercer sobre la respuesta CD8 VHB específica y sobre el daño hepático.

- Inmunodepresión primaria o secundaria. Estos pacientes no entraron en el estudio por las posibles consecuencias de la inmunodepresión sobre la respuesta citotóxica contra el VHB.

Además de los pacientes problema del estudio se seleccionó como control interno negativo a un grupo de sujetos sanos con AgHBs negativo y HLA-A2 positivo de similares características demográficas a los casos. Estos sujetos se escogieron entre personas relacionadas con miembros del Instituto de Hepatología (University College London). Este grupo permitió conocer cuál era el ruido de la técnica utilizada para el recuento los linfocitos CD8 core 18-27 específicos. También se eligió un grupo de individuos HLA-A2 positivos con inmunidad contra la hepatitis B adquirida de forma natural, es decir con serología positiva para anticuerpos antiHBs y/o antiHBc y con AgHBs negativo sin vacunación previa contra el VHB. Este grupo se utilizó como control interno positivo, puesto que sabemos por estudios previos que en un gran porcentaje de sujetos inmunes contra el VHB es posible detectar células CD8 VHB específicas mucho tiempo después de controlar la infección aguda⁷⁷. Además, estas células son capaces de expansión *in vitro* tras estimulación antígeno específica¹⁰⁰. Es decir, este grupo nos permitió conocer cual era la respuesta celular CD8 VHB específica en sujetos con control completo de la infección. Estos sujetos se eligieron de forma consecutiva entre pacientes que acudieron a las consultas de Enfermedades de Transmisión Sexual del Centro Mortimer Market por causas no relacionadas con la hepatitis B.

El número de sujetos en los grupos controles no era representativo de la verdadera prevalencia de estos colectivos en la población de referencia. Esta estrategia se utilizó para incrementar la eficacia del estudio. Por lo tanto, en este trabajo el diseño planeado solo nos permitía estimar la probabilidad de la variable respuesta en los diferentes grupos, pero no la prevalencia de la exposición. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Centro Mortimer Market y todos los pacientes dieron consentimiento informado antes de participar en él.

2. Cálculo del tamaño muestral.

- Para desarrollar el primer objetivo (ver sección III.3) de este estudio se estimó el tamaño muestral necesario mediante una prueba Z bilateral para comparación de dos medias independientes¹²⁵. Estimamos la varianza de esta variable en sujetos con infección persistente, basándonos en los datos publicados sobre la frecuencia de linfocitos CD8/Tc18-27 en pacientes con hepatitis aguda B¹⁰⁰. En este trabajo la transformación logarítmica de la variable frecuencia de células CD8/Tc18-27 seguía una *distribución normal con una varianza de 0.46*. La media de la frecuencia de estas células fue de 10 células CD8/Tc18-27+ sobre 50.000 células CD8 en el grupo control negativo en este estudio. Suponiendo este mismo ruido y varianza en el análisis de sujetos HLA-A2+ con hepatitis crónica, consideramos que la mínima diferencia a detectar era de 10 linfocitos CD8/Tc18-27 sobre 50.000 células CD8. Aceptando un error alfa del 5% y un error beta del 20% y suponiendo una varianza en los dos grupos de 0.46 para detectar una diferencia igual al ln 10 necesitábamos al menos 20 pacientes en cada grupo.

- Para el segundo objetivo (ver sección III.3) se estimó el tamaño muestral mediante una prueba Z bilateral para comparación de dos proporciones independientes¹²⁶. Sabíamos que las células CD8/Tc18-27+ en la hepatitis aguda no expanden en la fase aguda probablemente debido al alto grado de activación, mientras que en la fase de recuperación son fácilmente expandibles¹⁰⁰. Si suponíamos que en los pacientes con infección persistente ocurría lo mismo, es decir, si esperábamos obtener expansión en los sujetos PS pero no en los individuos con HCB^{e+}, podíamos considerar que la prevalencia de expansión en HCB^{e+} sería inferior al 5% de los sujetos. Puesto que esperábamos una gran diferencia entre la prevalencia de expansión entre los dos

grupos, podíamos definir la mínima diferencia que pretendíamos detectar en el 35%. Con estas suposiciones y asumiendo un error alfa del 5% y un error beta del 20% calculamos que necesitábamos al menos 19 pacientes por grupo.

Puesto que para el primer objetivo se necesitaban 20 pacientes por grupo y para el segundo sólo 19 se definió el tamaño muestral mínimo del estudio en 20 casos por grupo (40 sujetos en total). Para el desarrollo del tercer objetivo (ver sección III.3) de este trabajo se consideró a priori suficiente el tamaño muestral calculado previamente.

IV.1.4 Variables del estudio.

1. Variable independiente.

El factor de riesgo analizado en este estudio fue el estadio clínico de la infección persistente por VHB. Es decir, se suponía que existían determinados factores en las distintas situaciones clínicas que influían en la respuesta celular citotóxica. Se trataba de una variable categórica con las siguientes categorías:

- Hepatitis crónica: AgHBs + / DNA VHB alto / ALT elevado / AgHBe + / HLA A2 +
- Portador sano: AgHBs + / DNA VHB bajo / ALT normal / AgHBe - / HLA-A2 +
- Control negativo: AgHBs- / AcHBs- / ALT normal / HLA A2 +.
- Control positivo (Sujetos inmunes): AgHBs- / AcHBs+ y/o AcHBc IgG+/ ALT normal.

2. Variables dependientes.

Para analizar la respuesta inmune con relación a la exposición se registraron las siguientes variables:

- Frecuencia de células CD8/Tc18-27 positivas sobre el total de células CD8+ de sangre periférica. Es una variable cuantitativa continua con un rango entre 0 y 1.
- Expansión de las células CD8/Tc18-27 positivas tras estimulación con el péptido core 18-27. Es una variable categórica dicotómica que puede tomar los valores expansión positiva o negativa.

3. Covariables.

Como posibles variables confundientes y/o modificadoras se recogieron:

- Edad en años cumplidos. Variable cuantitativa continua generada a partir de la fecha de estudio menos la fecha de nacimiento. La edad puede influir en la calidad e intensidad de la respuesta inmune. Se sabe que en las edades extremas de la vida el sistema inmune muestra cierto grado de incompetencia. Además, la edad junto a la ruta de contagio puede indicar de forma aproximada el tiempo de evolución de la infección. Por estas razones pensamos que era necesario controlar el efecto de la edad en este estudio.
- Sexo. Variable categórica dicotómica con las categorías masculino y femenino.

En la infección persistente por virus B existe una mayor prevalencia de hombres de causa desconocida¹²⁷. Esta diferencia merecía ser controlada puesto que podría influir en la respuesta antígeno específica contra el VHB.

- Ruta de contagio. Variable categórica ordinal con las siguientes categorías: 1. Parenteral o sexual; 2. Desconocida; 3. Vertical o infancia. Es conocido que los individuos con transmisión vertical o durante la infancia presentan un mayor riesgo de cronicidad por el posible desarrollo de inmunotolerancia⁸⁵. Además, esta ruta implica normalmente una evolución más larga de la infección que en otras vías de contagio. Por tanto esta variable podría comportarse como variable confundiente.

- Frecuencia de linfocitos CD8+ en sangre periférica. Variable continua con rango entre 0 y 1. Puesto que la frecuencia de linfocitos CD8+/Tc18-27+ se expresó sobre el número de linfocitos CD8+ de sangre periférica, era necesario controlar la frecuencia de células CD8+ en el compartimento periférico en los distintos grupos de estudio.

4. Otras variables.

Para definir la categoría de la variable independiente a la que pertenecían los sujetos del estudio se recogieron las siguientes variables:

- Concentración sérica de la transaminasa de alanina (ALT) en unidades por litro. Variable cuantitativa continua. Esta variable fue elegida como indicadora del grado de inflamación hepática por ser de entre todos los tests enzimáticos de fácil

realización él mas específico de inflamación hepática. También se recogieron como variables que valoraran el grado de inflamación hepática, la concentración sérica de la transaminasa de aspartato y la bilirrubina total sérica.

- Variables virológicas:

1. Marcadores serológicos de VHB: antígeno de superficie (AgHBs), antígeno e (AgHBe), anticuerpo anti core (AcHBc total), anticuerpo IgM anti core (HBcIgM), anticuerpo anti e (AcHBe). Variables categóricas dicotómica con las categorías positivo y negativo.

2. Concentración sérica de DNA VHB en picogramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$). Variable categórica con las categorías: 1. Inferior a 2; 2. Entre 2 y 100; 3. Entre 100 y 1000; 4. Entre 1000 y 2000. 5. Superior a 2000).

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen del core 18-27. Variable categórica dicotómica con las categorías: ampliación positiva o negativa. Este análisis nos permitirá demostrar la presencia del VHB en los pacientes del estudio.

Estas dos últimas variables se recogieron solamente en los sujetos AgHBs positivo.

IV.2 PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.

En esta sección se describen los pacientes admitidos en el estudio, las técnicas experimentales y el protocolo desarrollado en este proyecto para medir las distintas variables del estudio. En la tabla número IV.1 se resume la composición de los distintos medios de cultivo y soluciones utilizadas.

IV.2.1 Sujetos seleccionados para el estudio.

Entre septiembre de 1998 y febrero de 2000 acudieron a las consultas externas de Enfermedades Infecciosas del Centro Mortimer Market de Londres (NHS) 40 pacientes HLA-A2 positivos con infección crónica por VHB que cumplían los criterios de admisión en el estudio. Sin embargo, tres de estos pacientes fueron excluidos, dos de ellos por coinfección con VHC y otro por infección por VIH. Por tanto, finalmente se admitieron en el estudio 37 pacientes consecutivos HLA-A2 positivos, 19 sujetos con el diagnóstico de portador sano del VHB y 18 con hepatitis crónica con AgHBe positivo. Otros 22 sujetos conformaron los dos grupos controles (10 sujetos en el grupo control negativo y 12 en el grupo control positivo). Las características clínicas, inmunológicas y virológicas de estos cuatro grupos se describen en el capítulo de resultados.

IV.2.2 Recogida de muestras y datos clínicos

A todos los sujetos admitidos en el estudio se les recogieron durante la visita clínica los datos de interés por medio de un cuestionario normalizado. Además se extrajeron tres tubos de sangre, uno de ellos heparinizado y dos sin anticoagulante,

mediante técnica de venopunción estándar.

Procesamiento de las muestras de sangre

Los tubos con sangre no heparinizada eran centrifugados a 800 g durante 5 minutos para obtener el suero. Parte de este suero se alicuotaba en tubos de ependorf y se congelaba inmediatamente a -80°C para posterior amplificación del gen del core 18-27 y cuantificación del DNA del VHB. El resto del suero se utilizaba para el análisis de la bioquímica hepática mediante un analizador automático y para el análisis de marcadores serológicos de VHB, VHC, VHD y VIH.

Del tubo con sangre heparinizada se recogían $100\mu\text{L}$. para el tipaje del HLA-A2. El resto de esta sangre se utilizaba para la obtención de CMSP mediante gradiente de ficol-hypaque. En un tubo de 15 mL. se ponía un tercio de ficol-hypaque y dos tercios de sangre heparinizada. La sangre se dejaba caer con suavidad para evitar que se mezclaran ambos fluidos. El tubo se centrifugaba a 1000 g durante 20 minutos sin freno. A continuación se extraía con una pipeta la capa de CMSP situada entre el ficol-hypaque y el plasma. Las CMSP eran lavadas dos veces con solución de lavado para eliminar el ficol-hypaque que quedara. Finalmente las células eran contadas con una cámara de Neubauer en un microscopio óptico tras tinción con azul tripan. Habitualmente se obtenían entre 10 y 15×10^6 de CMSP a partir de 10 mL. de sangre. Las células se resuspendían en medio de cultivo para ser utilizadas a continuación en el recuento de la frecuencia de células $\text{CD8}^+/\text{Tc18-27}^+$ y para la producción de líneas celulares mediante estimulación con el péptido del core 18-27.

IV.2.3 Estudio virológico

El análisis serológico del AgHBs, AcHBc total e IgM, AgHBe, AcHBe, anti-VHD, anti-VHC y anti-VIH-1 se realizó con kits comerciales de inmunoensayo enzimático (Laboratorios Abbot, North Chicago, IL; Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ; Sanofi Diagnostic Pasteur, Marnes-la Coquette, Francia).

La concentración sérica de DNA viral se cuantificó mediante una técnica estándar de hibridación molecular sin amplificación, basada en la captura “sándwich” de híbridos de DNA, con el kit Digene Hybrid-Capture® (Digene, Beltsville, MD). El ensayo se realizó siguiendo el protocolo previamente publicado¹²⁸. Primero se preparaban 50 µL. de la muestra y de los controles apropiados en tubos de hibridación diferentes, en los que se añadían 25 µL. de solución disolvente y 25 µL. de reactivo. Los tubos se incubaban durante 20 minutos a 65 °C para producir la lisis y desnaturalización de los ácidos nucleicos. La hibridación se llevaba a cabo en presencia de sondas de RNA específicas para la cadena completa del DNA del VHB a 65 °C durante 60 minutos. Los híbridos DNA/RNA eran posteriormente transferidos a tubos de captura cubiertos con anticuerpos anti-híbridos DNA/RNA. La captura de los híbridos se realizaba tras 60 minutos de agitación en un agitador rotatorio. Después los tubos eran decantados y a continuación, los híbridos inmovilizados se incubaban durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos anti-híbridos marcados con fosfatasa alcalina. Posteriormente los tubos se decantaban y lavaban varias veces. En el siguiente paso se añadía un sustrato de la fosfatasa alcalina (LumiPhos®530) que era transformado en un compuesto luminiscente por la enzima tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. La emisión de luz es proporcional a la cantidad de DNA VHB inicialmente

presente en la muestra. La luz de cada muestra se medía en un quimioluminómetro y el resultado se obtenía como unidades relativas de luz. Una curva de calibración estándar se utilizó para calcular la concentración de DNA VHB de cada muestra en $\mu\text{g/mL}$. El nivel mínimo de detección de esta técnica se situaba en $2\mu\text{g/mL}$.

IV.2.4 Tipaje de HLA-A2

Para determinar si el paciente era HLA-A2 positivo se recogían 100 μL . de sangre periférica que se incubaban con anticuerpos de ratón anti HLA-A2 humano

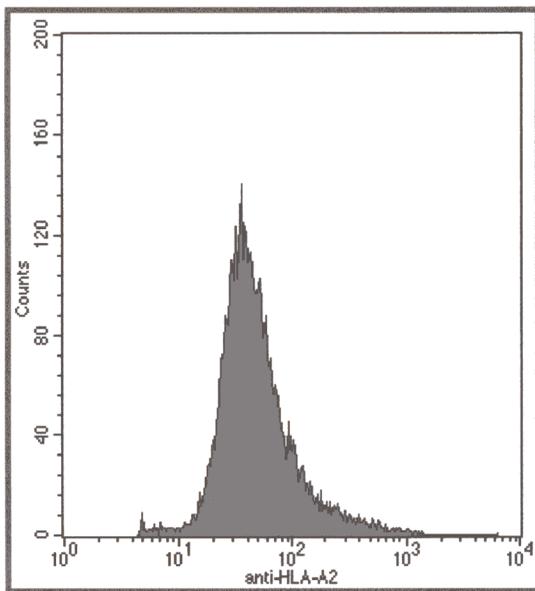


Fig.IV.1. Histograma de un paciente HLA-A2 positivo que muestra una intensidad de fluorescencia para el anticuerpo anti HLA A2 superior a 10 unidades en las CMSP.

(Incstar, Stillwater, Mi) durante 20 minutos en hielo. A continuación se teñía con un anticuerpo IgG cabra anti ratón marcado con fluoresceína (FITC) durante 20 minutos en hielo. Posteriormente la muestra teñida se trataba durante 15 minutos con la solución lisante FACS® de Beckton Dickinson para producir la lisis de los glóbulos rojos en condiciones hipotónicas

suaves, al mismo tiempo que se conservaban las CMSP. Tras ser lavadas las

células dos veces con solución de lavado pre-FACS se analizaban mediante el citómetro de flujo FACScan de Beckton Dickinson® con el programa informático CELLQuest® (Becton Dickinson). En paralelo con la muestra problema se realizaba la tinción de un control HLA-A2 negativo. Se considera que un paciente era HLA-A2 positivo cuando la intensidad de fluorescencia era mayor que en el control negativo. En la figura IV.1 se

presenta el histograma de la distribución de la expresión de la molécula de HLA-A2 en las CMSP de un paciente HLA-A2 positivo.

IV.2.5 Síntesis de complejos HLA-A2-core 18-27

Los complejos HLA-A2-core 18-27 (Tc18-27) (Figura IV.2) fueron sintetizados por G.S. Ogg y A.J. McMichael en el Instituto de Medicina Molecular del Departamento de Medicina Nuffield del Hospital John Radcliffe, Oxford según la metodología descrita previamente¹⁰⁷. Las cadenas pesada de la molécula de HLA-A2 y de la $\beta 2$ microglobulina se produjeron en *Escherichia coli* transformados con los vectores apropiados. Solamente se expresaba el dominio extracelular de la cadena pesada de la molécula de HLA-A2. El extremo carboxi-terminal fue modificado para añadirle una

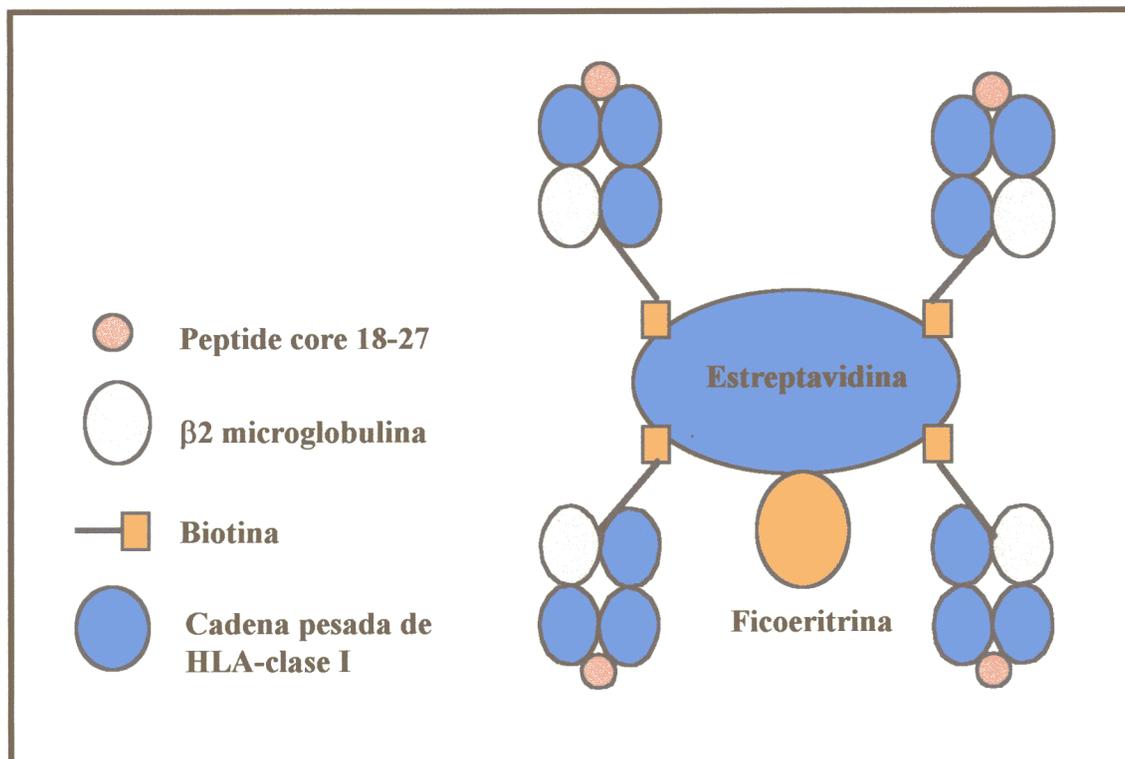


Figura IV.2. Esquema del complejo tetramérico HLA-A2 peptido core 18-27.

secuencia que contenía un lugar para biotinización. Los complejos se formaban *in vitro* mediante la unión de 30 mg. de la cadena pesada de HLA-A2, 25 mg. de β 2 microglobulina y 10 mg. del péptido core 18-27. Concretamente se utilizó como epítipo la secuencia del core 18-27 del VHB genotipo D: FLPSDFFPSV. El complejo HLA-A2-péptido se biotiniló utilizando la enzima BirA purificada a una concentración de 5 μ g/mL más 0.5 mM de biotina y 5 mM de ATP. La reacción se incubó durante 16 horas a temperatura ambiente. Los complejos biotinilados se recuperaron mediante purificación rápida de proteínas con cromatografía líquida usando una solución tamponada que contiene 20mM Tris (pH 8) y 50 mM de NaCl y con cromatografía de intercambio iónico mediante gradiente de 0 a 0.5 M de NaCl. Finalmente, las moléculas tetraméricas se marcaron con fluorescencia mediante la mezcla de los complejos biotinilados con estreptavidina-ficoeritrina a una razón molar de 4:1.

IV.2.6 Tinción de CMSP con anticuerpos anti CD8 humano y con el Tc18-27

Una parte de las CMSP obtenidas de sangre periférica, tras separación mediante gradiente de ficoll-hypaque, se utilizó para la cuantificación de la frecuencia de linfocitos CD8/Tc18-27 positivos en sangre periférica. Esta técnica ha sido descrita con anterioridad en sujetos con hepatitis aguda por VHB¹⁰⁰. Para cada paciente se incubaron medio millón de estas células durante 30 minutos a 37°C con 1 μ g del Tc18-27 en 100 μ L. de RPMI más 10% STF, en pocillos de fondo en U de 200 μ L. Posteriormente las células se lavaban con solución de lavado pre-FACS y luego se incubaban a 4°C durante 30 minutos con concentraciones saturantes de anticuerpo monoclonal anti-CD8 marcado con PE-Cy5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Finalmente, las células se lavaban y analizaban inmediatamente en el citómetro de flujo FACS® de Becton Dickinson con

el programa informático CELLQuest® (Becton Dickinson). Se analizaron al menos 200.000 células mononucleares por cada tinción, para alcanzar un número mínimo de 40.000 linfocitos CD8+.

IV.2.7 Producción de líneas celulares

Para evaluar la capacidad de expansión de los linfocitos CD8 core 18-27 específicos, las CMSP se estimularon *in vitro* con el péptido específico siguiendo el método descrito previamente⁹². En estos experimentos se utilizó el péptido correspondiente a la secuencia de la región core 18-27 del VHB genotipo D adquirido a Chiron Mimotopes (Clayton, Victoria, Australia). Concretamente, las CMSP se resuspendían a una concentración de 3×10^6 de células por mL. en medio de cultivo y se estimulaban con $1 \mu\text{M}$ del péptido del core18-27 más toxoide tetánico a una concentración de $0.5 \mu\text{M}$ en platos de 96 pocillos de fondo en U. El toxoide tetánico se utilizó como activador de los linfocitos T helper puesto que prácticamente toda la población ha sido vacunada previamente con la vacuna anti-tetánica. La respuesta T helper contra el toxoide tetánico favorece la creación de un ambiente propicio para la expansión de los linfocitos CD8 core 18-27 específicos. En el cuarto día de cultivo se añadió interleuquina 2 (IL-2) recombinante (30 UI/mL). Tras diez días de cultivo las células eran analizadas mediante citometría de flujo de igual manera a como se ha descrito para el análisis en fresco.

IV.2.8 Análisis de liberación de cromo y análisis de dilución límite.

Estas dos técnicas se utilizaron en el proceso de validación de la técnica de tinción de LTC con los complejos tetaméricos HLA-A2 / core 18-27. Como controles positivos para realizar esta validación se produjeron, a partir de un paciente con hepatitis aguda, una línea celular y un clon específico para el epítipo core 18-27 del VHB. Como controles negativos se generó a partir de las CMSP del mismo sujeto un clon específico para el epítipo 575-583 de la polimerasa del VHB y también se estimularon estas células con el péptido 77-85 del gag del VIH-1. Estos experimentos se comentan detalladamente en la sección V.I del capítulo de resultados. Para comprobar la capacidad de reconocimiento específico HLA-A2 restringido del péptido core 18-27 por las líneas celulares y por los clones utilizados como controles, se llevo a cabo un análisis de liberación de cromo que a continuación se describe.

La actividad citotóxica de las líneas celulares T y de los clones fue analizada usando como células diana a células B HLA-A2+ inmortalizadas con el VEB, marcadas con $100\mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (Amersham International, Buckinghamshire, UK) durante 1 hora a 37°C . Tras lavar las células dianas fueron diluidas en RPMI más 10% de STF y seguidamente fueron pulsadas o no durante una hora con $1\mu\text{mol/L}$ del péptido core 18-27, antes de añadirse a las líneas de células T o a los clones a una razón efector:diana 20/1. Las células fueron incubadas en platos de 96 pocillos de fondo en U. La liberación de cromo fue medida en el sobrenadante después de 5 horas de incubación a 37°C . El porcentaje de citotoxicidad fue calculado usando la siguiente fórmula: $(E-M/D-M)*100$, donde E es la liberación de cromo en el experimento, M es el cromo

liberado en presencia solamente de medio de cultivo y D es el cromo liberado en presencia de Triton X al 10%⁸⁹.

Los clones de LTC core18-27 o polimerasa 575-583 específicos se crearon mediante dilución límite. Diferentes números de CMSP (de entre 100 a 50.000) se cultivaron en pocillos en U de un plato de 96 pocillos en presencia de: CMSP autólogas irradiadas (3.000 rads), 1 $\mu\text{mol/L}$ del péptido core 18-27, y un $\mu\text{g/mL}$ de AgHBc recombinante. Los cultivos se suplementaron con IL-2 a 20 U/mL cada 3 días, y el análisis de liberación de cromo se realizó después de 10 días. Los pocillos se consideraron positivos si la lisis específica era superior al 10%.

IV.2.9 Amplificación del gen viral del core 18-27.

Para demostrar la presencia viral se amplificó el gen del core 18-27 del VHB. A partir de las muestras de suero congeladas de cada paciente se extrajo el DNA viral con la columna de purificación de DNA viral QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen Ltd., U.K.). El gen del core del VHB se amplificó mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) del *Thermophilus aquaticus* (Taq). En los pacientes con baja viremia se realizó una nueva amplificación mediante “nested PCR”. Se utilizaron los “primers” previamente descritos¹²⁹ que son derivados de la región pre-core del genoma del VHB genotipo D. Concretamente, para la primera PCR los “primers” fueron:

1.- “Primer” sentido VHB3: 5' ACGACCGACCTTGAGGCATACTT 3'

(Posición de nucleótidos: 1688-1710).

2.- “Primer” antisentido VHB578: 5' CCCACCTTATGAGTCCAAGG 3'

(Posición de nucleótidos: 2478-2569).

El gen del core 18-27 se encuentra a 243 pares de bases por debajo de VHB3. El tamaño del producto obtenido es de 791 pares de bases.

Para la “nested PCR” los “primers” utilizados fueron:

1.- “Primer” sentido WR1: 5' GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGC 3'

(Posición de nucleótidos: 1778-1804).

2.- “Primer” antisentido VHB2: 5' CTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTT 3'

(Posición de nucleótidos: 2396-2373).

El gen del core 18-27 se encuentra 150 pares de bases por debajo de WR1. El tamaño del producto obtenido con esta PCR es de 619 pares de bases.

Para realizar la PCR se preparaba una solución compuesta por 10 μL de solución tamponada para PCR, 200 μM de cada uno de los cuatro deoxirribonucleótidos trifosfato (Boehringer), “primers” a una concentración final de 20 μM , 6 μL de magnesio 25 mM, 2.5 U.I. de Taq DNA polimerasa (Pharmacia Biotech, Suecia), 5 μL de DNA madre de la muestra y agua destilada hasta un volumen final de 100 μL . La reacción se desarrollaba en un ciclador térmico de DNA (Perkin Elmer 9600). Los programas utilizados se describen en la figura 4. Para comprobar el resultado de la PCR se corría una alícuota del producto final, teñida con bromuro de etidio en una electroforesis en gel de agarosa 1% mas TAE (Tris-acetato 40mM (pH 8), EDTA 1mM) durante 30 minutos a 100V. Posteriormente se visualizaban los productos con rayos ultravioletas observándose una banda en torno a 700 pares de bases.

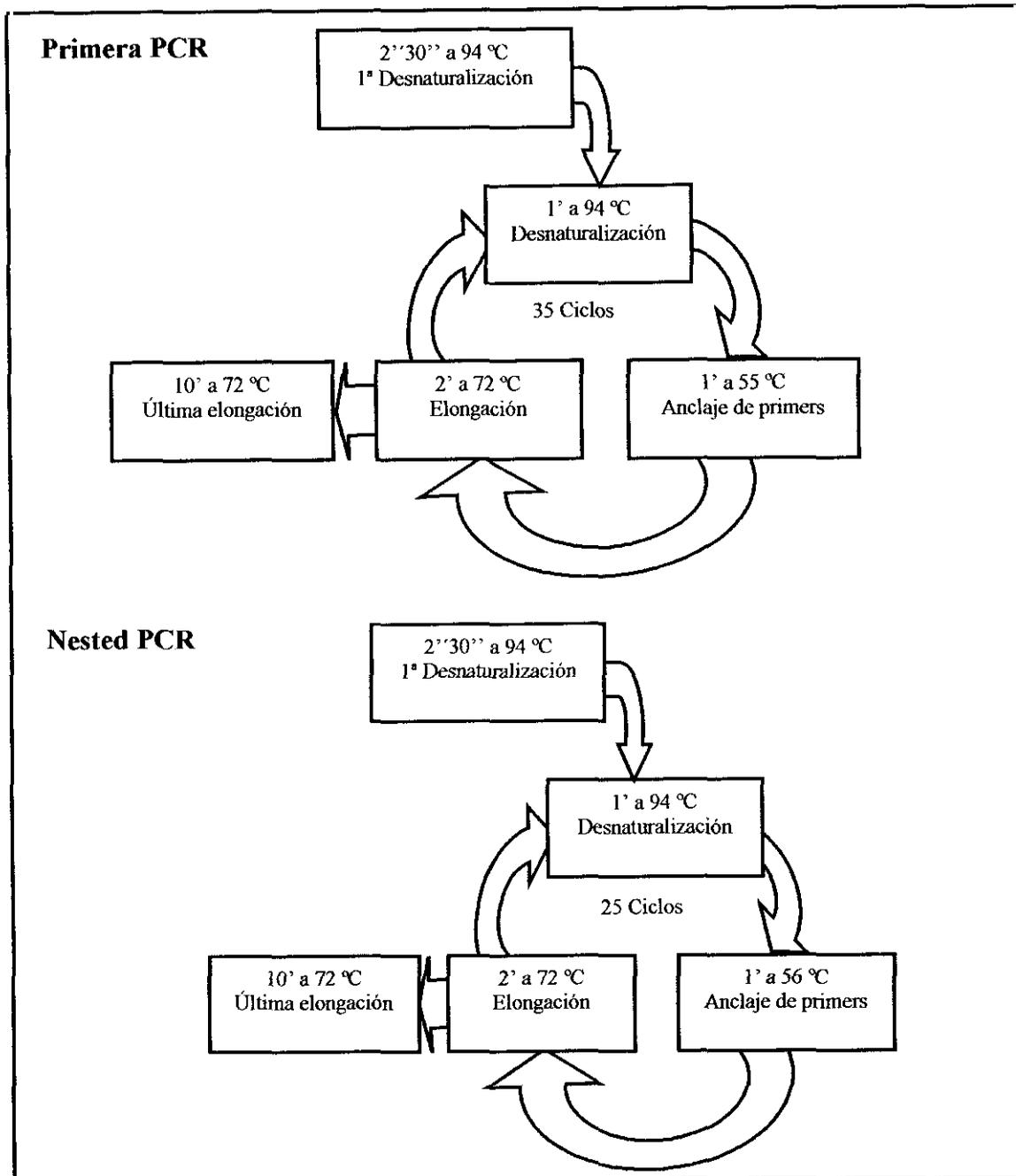


Fig. IV.3. Esquema de los programas utilizados para la amplificación del gen del péptido del core 18-27.

SOLUCIONES	CONSTITUYENTES
Solución de lavado pre-FACS	<ul style="list-style-type: none"> • Solución fosfato tamponada: (137 mM NaCl+ 1.7 mM NaH₂PO₄+ 5.3 mM KCl + 10 mM. N₂HPO₄ (pH 7.4)) • 1% de suero de ternera fetal (STF).
Solución de lavado para separación de CMSP	<ul style="list-style-type: none"> • Medio RPMI 1640 • 10 % STF.
Solución tamponada para PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Tris HCl 20 mM + KCl 50 mM (pH 8.3)
Medio de cultivo celular	<ul style="list-style-type: none"> • Medio RPMI 1640 • Hepes 20 mM • Piruvato sódico 0.5 mM • 100 U de penicilina • 100 µg/mL de estreptomicina • 2 Mercaptoetanol 50 µM • Aminoácidos esenciales X50 (1/50) • Aminoácidos no esenciales X100 (1/100) • 10 % STF

Tabla IV.1. Medios y tampones utilizados en los experimentos.

IV.3 DISEÑO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

IV.3.1. Estadística descriptiva¹³⁰.

Primero se describieron las diferentes variables del estudio en los distintos grupos. Para describir las variables cuantitativas con los correctos índices de centralización y dispersión, se evaluó en primer lugar si las distribuciones condicionales de estas variables, según los distintos grupos definidos por la variable independiente (grupo clínico) seguían una distribución normal mediante la aplicación del test de Kolgomorov Smirnov con la corrección de Lillefors. La homogeneidad de varianzas

entre grupos se analizó mediante el test de Levene. Las variables cuantitativas normales fueron descritas mediante su media y su desviación estándar. Las que no siguieron una distribución normal se resumieron mediante su mediana y amplitud intercuartil.

Las variables categóricas se describieron mediante su distribución de frecuencias en los distintos grupos definidos por las categorías de la variable independiente.

La representación gráfica de las variables categóricas se realizó mediante diagramas de barras estratificados por los distintos grupos. Las variables cuantitativas se representaron mediante gráficos de cajas para cada grupo del estudio, con excepción de la edad que se representó mediante histogramas.

IV.3.2. Estadística inferencial.

Como herramienta metodológica se utilizó en todos los análisis la prueba de significación de la hipótesis nula propuesta por Fisher. Todas las pruebas realizadas fueron bilaterales y a partir de un nivel de significación $p < 0.05$ se rechazó la hipótesis nula.

Análisis univariante¹³¹.

Se realizó un análisis univariante para la comparación de las distintas variables del estudio en los diferentes grupos. En aquellas variables cuyas distribuciones condicionales seguían una distribución normal con homogeneidad de varianzas se realizó un análisis paramétrico. En aquellas variables no normales se intentaron las

transformaciones pertinentes para ajustarlas a la normalidad. En el caso de lograrse el ajuste deseado se siguió también un análisis paramétrico. Para la comparación de los cuatro grupos se utilizó el análisis de la varianza de una vía, seguido de un análisis de contrastes para las comparaciones entre grupos en caso de ser significativo el análisis de la varianza. En las variables que disponíamos solo de los datos de dos grupos se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes. En todos los casos se calculó el intervalo de confianza al 95% de la diferencia de las medias.

En aquellas variables cuantitativas que no seguían una distribución normal a pesar de las transformaciones realizadas se utilizó un análisis no paramétrico. Para la comparación entre los cuatro grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis mientras que para comparaciones entre dos grupos se utilizó el test U de Mann-Whitney.

La comparación de las variables categóricas entre los cuatro grupos se efectuó mediante un test χ^2 de asociación lineal en aquellas variables categóricas ordenadas. En las variables categóricas no ordenadas se utilizó el test χ^2 de Pearson. En las variables en que sólo se disponía de los datos de los pacientes con AgHBs+ se llevó a cabo una prueba exacta de Fisher.

El análisis de la correlación de la transaminasemia y carga viral con la frecuencia de células CD8/Tc18-27+ en sangre periférica se realizó mediante el índice de correlación de Spearman.

Análisis multivariante¹³².

El control de la confusión y de la interacción entre variables se realizó en este estudio a dos niveles. Primeramente se previno este sesgo en el diseño, al permitir solamente la entrada al estudio a aquellos sujetos negativos para las posibles variables confundientes (criterios de exclusión). Posteriormente se controló este sesgo en el análisis multivariante ajustando los modelos por las posibles variables confundientes o modificadoras.

Para analizar la presencia de confusión o interacción producida por las variables sexo, edad, raza y ruta de contagio sobre la frecuencia de células C8/Tc18-27+ en sangre periférica en los distintos grupos se construyó un modelo de regresión lineal múltiple. Para ello primero se construyó un modelo máximo con todos los términos de interacción y modificación. Las decisiones de retener o eliminar del modelo los términos de interacción se basó en una prueba de significación estadística. Concretamente se realizó una prueba de significación global sobre el decremento máximo de R^2 producido al estimar el modelo máximo sin los términos de interacción. En este análisis si el resultado de la prueba de significación global no era significativo se excluían las interacciones. Si era significativa la prueba global se determinaba el grado de significación de cada interacción y se retenía en el modelo aquellas variables que eran significativas. A continuación se evaluaban los términos de confusión del modelo. Para ello, el modelo sin las interacciones no significativas y con todas las posibles variables confundientes se comparaba con modelos mas reducidos en los que se excluían sistemáticamente las variables confundientes que no era obligado mantener por la norma jerárquica. Finalmente, se excluían del modelo aquellos confusores que no

producían cambios importantes en el comportamiento del modelo (sesgo y precisión).

A continuación, se evaluó el cumplimiento por el modelo creado de las condiciones de un modelo de regresión lineal: linealidad, homocedasticidad, ausencia de autocorrelación y normalidad. Para ello se evaluó si los residuales de cada distribución condicional eran variables aleatorias independientes distribuidas según leyes normales de media 0 y variancia σ^2 . El resultado de este análisis de regresión lineal múltiple se contrastó con los del análisis univariante para valorar la validez de este último

Para estudiar el posible sesgo producido por la frecuencia basal de células CD8+/Tc18-27+ sobre el efecto del grupo clínico en la expansión de estas células tras estimulación antígeno específica, se realizó un análisis de regresión logística ajustando por la variable “frecuencia de células CD8+/Tc18-27+”. El modelo de regresión logística no necesita asumir las mismas condiciones distribucionales que el modelo de regresión lineal. Sin embargo, se evaluó si la variable cuantitativa “frecuencia de células CD8+/Tc18-27+” seguía una distribución normal multivariante, puesto que se consiguen soluciones más estables. También se evaluó la ausencia de colinealidad entre las covariables ya que esta situación puede aumentar el valor de los errores típicos. Se evaluó el “riesgo” de expansión del grupo PS y del grupo HCB^e+ sobre el grupo control positivo mediante las odds ratios del parámetro de la variable predictora ajustado por la posible variable confundiente. La decisión de eliminar o retener esta variable se tomó sobre la base de si producía cambios prácticamente importantes en el comportamiento del modelo en cuanto a sesgo y exactitud. La significación del modelo se analizó mediante el método de máxima verosimilitud. El resultado del análisis de regresión logística se comparó con el obtenido mediante el análisis univariante para conocer la

validez de este último.

Los datos del estudio fueron recogidos en una base de datos Microsoft Access 97® y se depuraron y analizaron en el programa SPSS 9.0 para Windows® (SPSS Inc.).

V. RESULTADOS.

V.1 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE RECuento DE LTC CORE 18-27 ESPECÍFICOS.

Antes de comenzar el análisis de los pacientes del estudio, se evaluó la capacidad de los complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27 (Tc18-27) para detectar las células CD8 core 18-27 específicas entre la población general de linfocitos CD8. Para tal fin, se analizó la sensibilidad y especificidad de la técnica para diferenciar clones y líneas celulares que sabíamos previamente si eran o no específicas para este epítipo.

Como control positivo se utilizó un clon de células CD8 core 18-27 específicas y una línea celular citotóxica contra el epítipo core 18-27, generadas a partir de los linfocitos CD8 de un paciente HLA-A2 con hepatitis aguda. Estos linfocitos CD8 habían mostrado previamente *in vitro* actividad citolítica contra células diana pulsadas con el péptido core 18-27, evaluada mediante el análisis estándar de liberación de cromo. Como control negativo se utilizó un clon específico para el epítipo de la polimerasa (pol) 575-83 del VHB y CMSP del mismo paciente que se estimularon con el péptido gag 75-85 del VIH.

Los clones se generaron siguiendo la metodología comentada en el capítulo de material y métodos. La tinción del clon core 18-27 específico con anticuerpos monoclonales anti CD8 y con tetrámeros HLA-A2/core 18-27 mostró que el 94% de las células eran doble positivas. Es decir, la tinción con este tetrámero era capaz de reconocer prácticamente la totalidad de las células del clon, lo que demostraba su elevada sensibilidad. Sin embargo, cuando teñimos el clon específico para el epítipo pol 575-83 del VHB con el tetrámero HLA-A2/core 18-27 más anticuerpos monoclonales anti-CD8, solamente una minoría de células fue doble positiva. Esto demuestra que la tinción con esta molécula es específica para las células CD8 que expresan el TCR adecuado. En la figura V.1 se muestran los gráficos de puntos de estos dos análisis.

Además, también se comprobó la sensibilidad y especificidad de esta técnica mediante la tinción de las líneas celulares generadas a partir de este paciente con hepatitis aguda. Previamente analizamos si estas líneas tenían capacidad de reconocimiento específico del péptido core 18-27. Para ello se realizó el ensayo estándar de liberación de cromo, usando células diana HLA-A2 pulsadas o no pulsadas con el péptido core 18-27, como se comentó en el apartado de material y métodos. La línea estimulada con el péptido del core 18-27 mostró un índice de lisis específica de células pulsadas sobre las no pulsadas de un 25%, es decir, tenía capacidad citolítica HLA-A2 restringida de células que presentaban el epítipo core 18-27. Cuando esta línea celular fue teñida con tetrámeros core 18-27 y anticuerpos monoclonales anti-CD8, se observó que reconocía una población de células doble positiva, lo que demuestra su sensibilidad para detectar las células CD8 VHB específicas. Por otro lado, las CMSP de este mismo paciente estimuladas con el péptido gag 77-85 del VIH-1 no

mostraron ninguna actividad citolítica sobre las células pulsadas con el péptido core 18-27 en el ensayo de liberación de cromo. Logicamente, al estimular las CMSP de este paciente con un péptido distinto al core 18-27 no conseguimos expandir la población celular citotóxica específica para el epítipo core 18-27 y por tanto era imposible que existiera alguna actividad citolítica. Esta misma observación se comprobó al teñir estas células con los complejos tetraméricos core 18-27. La frecuencia de células doble positiva fue inferior a 1 entre 10.000 células CD8+, lo que demuestra una vez más la gran especificidad de la técnica. En la figura V.2 se muestran los gráficos de puntos de este experimento.

Obviamente, todos estos experimentos señalan que la técnica utilizada para reconocer los linfocitos CD8 core 18-27 específicos muestra gran especificidad y sensibilidad, pero no nos permite conocer cual es la especificidad y sensibilidad en el análisis de los sujetos del estudio. Estos parámetros no se pueden calcular al no disponer de una técnica “patrón oro” de referencia con la que comparar la tinción con complejos tetraméricos. Como se comentó en la introducción, actualmente se considera que la tinción con complejos tetraméricos es la técnica que se debe considerar de referencia para el recuento de las células T citotóxicas¹⁰⁸. Sin embargo, el análisis realizado con estos clones y líneas celulares nos permite suponer el mismo comportamiento de esta técnica en el estudio de las CMSP directamente *ex-vivo* en sujetos con infección persistente por VHB.

Finalmente, calculamos el ruido de la técnica, es decir el punto de corte a partir del cual consideramos que un sujeto presentaba linfocitos CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica. Para ello utilizamos el grupo control negativo del estudio. Es decir,

analizamos la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en las CMSP de diez sujetos sanos HLA-A2 positivos. Las características de estos sujetos se describen en la tabla V.9.

La distribución de la frecuencia en sangre periférica de células CD8+ /Tc18-27+ positivas no seguía una distribución normal, pero sí que lo hacía su transformación logarítmica (tabla V.1). Por tanto, se utilizó la variable transformada, "logaritmo neperiano de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+", para definir el punto de corte. Se consideró que un resultado era negativo si era inferior a la media de esta variable en el grupo control negativo más dos veces el error típico de la media. Este es el límite superior del intervalo que estima al 95% del valor poblacional de esta variable en el grupo control negativo. Este límite se situó en una frecuencia de 7.2 células CD8/Tc18-27 positivas por cada 50.000 linfocitos CD8 de sangre periférica. Por tanto, se consideró que un sujeto del estudio tenía un resultado positivo de nuestra técnica de recuento de células CD8+/Tc18-27+ cuando presentaba un valor superior a 8 células positivas por cada 50.000 linfocitos CD8+.

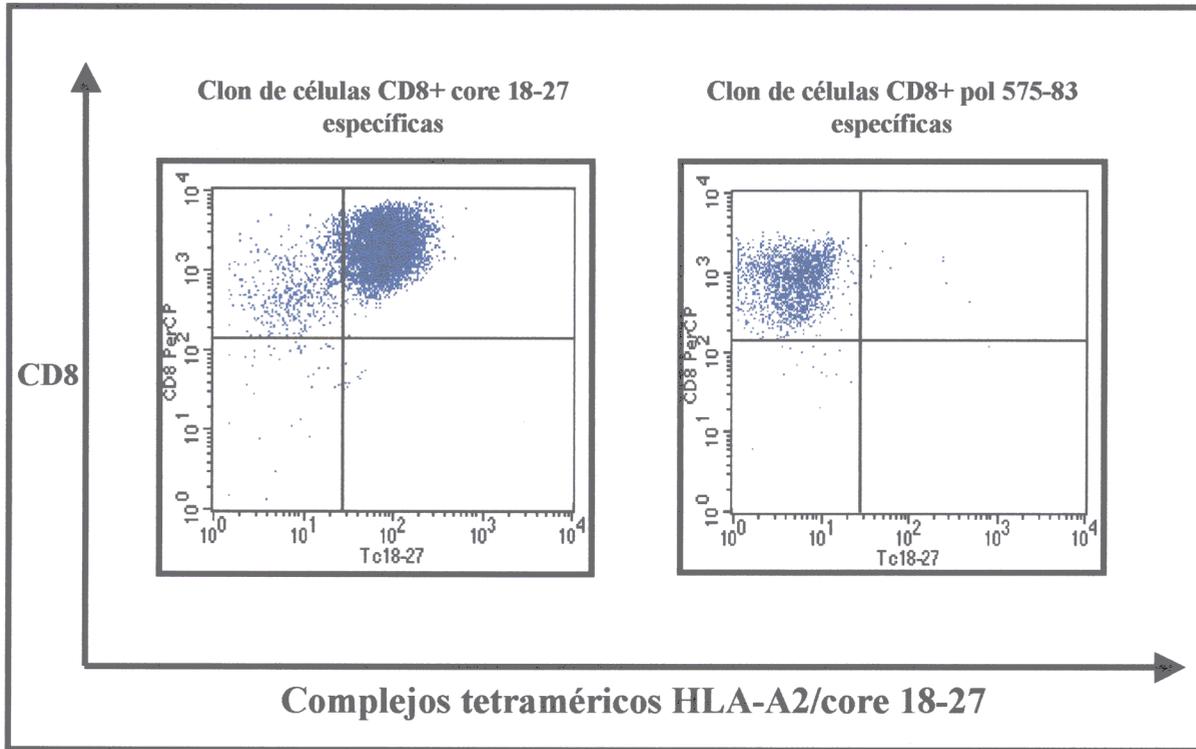


Figura V.1. Gráfico de puntos de la tinción de los clones core 18-27 y pol 575-83 específicos con los complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27 (Tc 18-27) más anticuerpos anti-CD8. En el clon core 18-27 se observa una población doble positiva que no existe en el clon pol 575-583.

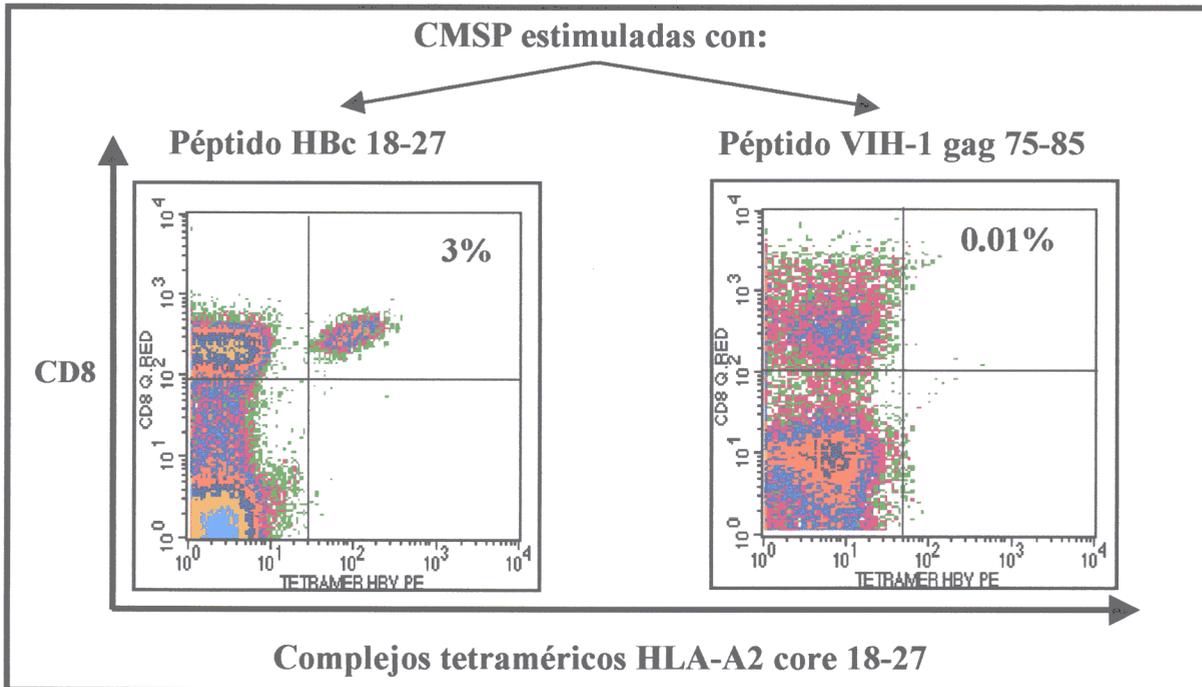


Fig. V.2. Gráficos de puntos que muestra la especificidad de los complejos tetraméricos para detectar las células CD8+ core 18-27 específicas en dos líneas celulares de un mismo paciente en fase de recuperación de una hepatitis aguda B. En las CMSP estimuladas con el péptido core 18-27 se detecta un población de células doble positivas (CD8+/Tc18-27) que no se detecta tras estimular estas células con el péptido gag 75-85 del VIH.

V.2 DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA Y ANÁLISIS UNIVARIANTE.

En esta sección se describen las distribuciones de las variables del estudio en los cuatro grupos analizados. En la tabla V.9 de la sección de gráficos y tablas de este capítulo, se enumeran todas las variables junto a los índices estadísticos que las definen. En esta tabla también se muestra si las variables se ajustan a una distribución normal y presentan homocedasticidad, lo que nos permitirá valorar que test estadístico aplicar en el análisis univariante. En la misma tabla también se enumeran los valores p de las comparaciones de los índices estadísticos de las variables en los cuatro grupos. En la tabla V.10 se presenta la estimación poblacional de las variables más importantes del estudio en los dos grupos problema (PS y HCBe+). La representación gráfica de las distribuciones de las variables del estudio se expone también en la sección de gráficos y tablas de este capítulo (Figuras V.10 a V.18).

Las variables respuesta del estudio: "frecuencia de células CD8+/Tc18-27" y "expansión de células CD8+/Tc18-27" se describen con más detalle en apartados individuales de esta sección.

Las variables cuantitativas edad, bilirrubina sérica, plaquetas y frecuencia de linfocitos CD8 de sangre periférica seguían una distribución normal y se han descrito mediante su media y desviación típica. Las variables cuantitativas ALT sérica, AST sérica y frecuencia de células CD8 core 18-27 específicas no seguían una distribución normal por lo que se describen mediante la mediana y la amplitud intercuartil.

V.2.1 Características demográficas y clínicas de los sujetos del estudio.

En el estudio entraron 49 sujetos con infección por VHB repartidos en tres grupos según el grado de control viral e inflamación hepática. Además, otros 10 sujetos formaron un grupo control negativo, definido así por tratarse de sujetos HLA-A2 positivos sin contacto con el VHB. De entre los 49 sujetos con infección por VHB, 12 sujetos integraban el grupo control positivo, que eran aquellos pacientes HLA-A2 positivos que tras previo contacto con el VHB habían controlado completamente la infección eliminando el AgHBs y desarrollando AchBs (sujetos inmunes). El 66% de los integrantes de este grupo tenía antecedentes de un cuadro clínico de hepatitis aguda. La mediana desde el primer diagnóstico de la infección en los sujetos inmunes era de 3.5 años con una amplitud de variación de 16 años. Los 37 sujetos restantes formaron los dos grupos problema; el primero lo constituían 19 individuos HLA-A2+ con características clínicas de portadores sanos y el segundo lo formaron 18 pacientes con hepatitis crónica AgHBe+.

Los cuatro grupos eran similares respecto a las principales características demográficas. La edad media de los sujetos de estudio se situaba al final de la tercera década en los cuatro grupos, oscilando entre los 40 años del grupo portador sano y los 36 del grupo control negativo, con un recorrido de la variable que iba de los 16 años a los 62. En los cuatro grupos existía una mayor proporción de sujetos de raza caucásica sobre la raza asiática y no había sujetos de otras razas en ningún grupo. La representación del sexo masculino era superior al sexo femenino en todos los grupos, con una variación entre el 52% del grupo portador sano y el 67% del grupo HCBe+.

La posible ruta de contagio entre los grupos con infección persistente por VHB con AgHBs+ no fue diferente ($p=0.214$). En ellos, la principal vía de contagio era la sexual o parenteral, aunque en un 42% de los PS y un 28% de los pacientes con HCB_e+ no sospechaba de ninguna posible ruta. Alrededor del 20% de los miembros de ambos grupos referían la transmisión vertical o en la infancia como causa de contagio. El grupo control positivo, es decir los sujetos con inmunidad adquirida de forma natural contra el VHB mostraban una mayor proporción de sujetos con contagio por vía sexual o parenteral que los otros grupos, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa ($p=0.064$). Esta tendencia puede deberse a que estos sujetos fueron recogidos en una consulta de enfermedades de transmisión sexual, lo que les puede hacer más proclives a recordar este mecanismo de contagio. De cualquier manera, esta tendencia se tuvo en cuenta al realizar el análisis multivariante.

Como era de esperar los valores de transaminasemia en los dos grupos control y en el grupo “portador sano” estaban dentro de los límites de normalidad, mientras que la mediana en el grupo con HCB_e+ era dos veces más elevado que el límite superior de la normalidad. En cambio, el valor medio de bilirrubina estuvo dentro del intervalo normal en los dos grupos de sujetos con infección persistente AgHBs+. La bilirrubina no se recogió en los sujetos de los grupos control.

El resultado de la PCR para amplificar el gen del core del VHB fue positivo en el 100% de los sujetos diagnosticados con HCB_e+ y en el 68% de los portadores sanos. Este análisis no se realizó en ninguno de los grupos controles. En la mayoría de los portadores sanos fue necesaria realizar una “nested PCR” tras la primera PCR para obtener un resultado positivo, debido a la menor concentración sérica de DNA viral en

estos sujetos. La cuantificación del DNA viral en suero mediante técnica de hibridación fue siempre inferior a 2 μ g/mL en los portadores sanos, mientras que en los pacientes con HCB $_{e+}$ fue siempre superior a este valor.

Por supuesto, todos los sujetos con infección crónica por VHB tenían una serología positiva para AgHBs, y ésta era negativa en todos los controles. Igualmente, debido a los criterios diagnósticos todos los pacientes con HCB $_{e+}$ tenían serología positiva para el AgHBe y negativa para anticuerpos antiHBe, ocurriendo lo contrario en los portadores sanos. Los anticuerpos contra el antígeno del core fueron positivos en 82% de los PS y en el 75% de los controles positivos. Entre los pacientes con HCB $_{e+}$ solamente el 35% tenían anticuerpos antiHBc. Esta diferencia en la frecuencia de anticuerpos anti-HBc fue estadísticamente significativa y será comentada en la discusión. En el grupo control positivo todos los sujetos presentaban anticuerpos contra el AgHBs mientras que el resto de los sujetos del estudio tenían serología negativa para este anticuerpo. Finalmente, la frecuencia de linfocitos CD8 $^{+}$ en sangre periférica fue similar en los cuatro grupos. En resumen, este análisis sugiere que existe homogeneidad entre los grupos en aquellas variables distintas del factor de estudio (grupo clínico), lo que permitió la comparación de los grupos y la extracción de conclusiones.

V.2.2 Frecuencia de linfocitos CD8 $^{+}$ core 18-27 $^{+}$ en sangre periférica.

Las CMSP de los sujetos del estudio fueron teñidas con anticuerpos monoclonales anti-CD8 y complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27 para visualizar mediante citometría de flujo las células CD8 $^{+}$ core 18-27 específicas.

La distribución de la variable "frecuencia de células CD8+/Tc18-27+" no seguía una curva normal como se comentó previamente (Tabla V.1). Concretamente, mostraba una marcada asimetría izquierda como se puede ver en el gráfico de puntos (Figura. V.3). Probablemente, como sabemos por estudios previos, esta asimetría se debe a que no todos los sujetos HLA-A2+ desarrollan una respuesta contra este epítipo⁹⁷. La mediana de la distribución de esta variable en el grupo PS era 14 células CD8+/Tc18-27+ por cada 50.000 linfocitos CD8+ y en el grupo control positivo (sujetos inmunes) era 18 células. En cambio, la mediana de esta variable en los grupos control negativo y HCB^e+ era solamente 5 y 4 células CD8+/Tc18-27+ respectivamente, es decir por debajo del valor que consideramos como un resultado positivo (Figura. V.4). La transformación logarítmica de esta variable además de seguir una distribución normal en todos los grupos (Tabla V.1) presentaba también homogeneidad de varianzas (Test de Levene; p=0.498), lo que nos permitió un análisis paramétrico de los datos.

Variable	Grupos	Test de Kolmogorov-Smirnov (p valor)
Frecuencia CD8+/Tc18-27	Control negativo	>0.2
	Hepatitis crónica	0.19
	Portador sano	<0.001
	Control positivo	0.049
Ln (Frecuencia CD8+/Tc18-27)	Control negativo	>0.2
	Hepatitis crónica	0.144
	Portador sano	>0.2
	Control positivo	0.173

Tabla V.1.- Análisis de normalidad de la distribución de las variables "frecuencia de células CD8+/Tc18-27+" y "Transformación logarítmica de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+". Ln: logaritmo neperiano

Por tanto, se realizó un análisis de la varianza de una vía para comparar las

medias de la transformación logarítmica de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ entre los cuatro grupos. Este análisis fue extremadamente significativo ($p < 0.001$). Posteriormente, se realizó un análisis de las diferencias entre los distintos grupos de las medias de la transformación logarítmica de la variable frecuencia de células CD8+/Tc18-27+, mediante un análisis de contrastes definidos a priori. La posterior transformación de esta diferencia entre logaritmos a una escala natural, nos aportó la odds ratio de la frecuencia de Tc18-27 entre los distintos grupos comparados. Es decir, nos indicó cuantas veces son más frecuentes en un grupo que en otro estas células en sangre periférica. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla V.2. Además, en la tabla V.3 se describen los intervalos de confianza de la media de frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ por 50.000 células CD8+ en sangre periférica en los distintos grupos del estudio, obtenidas a partir de la transformación a escala natural de los intervalos de confianza al 95% de la media de la variable “transformación logarítmica de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+”.

Grupos	Valor p	OR	IC 95% de OR
Hepatitis crónica / Control neg..	0.819	0.9	(0.43 a 2)
Portador sano / Control neg.	0.006	2.9	(1.4 a 6.2)
Control pos / Control neg.	0.002	3.7	(1.6 a 8.4)
Portador sano / Hep. crónica.	0.001	3.3	(1.7 a 5.5)
Control pos. / Hep. crónica.	<0.001	4.1	(2 a 8.3)
Control pos / Portador sano.	0.504	1.27	(0.6 a 2.5)

Tabla V.2.- Odds ratio de las frecuencias de células CD8+/Tc18-27+ entre los distintos grupos que se comparan. (Control neg: grupo control negativo; Control pos: grupo control positivo).

Grupos	Media Frec. Tc18-27+/50000 CD8+	I.C 95% de la media
Control negativo	4.12	(2.5 a 7.2)
Hepatitis crónica	3.8	(2.4 a 5.7)
Portador sano	12.2	(7 a 22)
Control positivo	15.5	(8.75 a 27.4)

Tabla V.3.- Media e intervalo de confianza de la media (IC95%) de la variable "frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ por 50.000 linfocitos CD8".

Del anterior análisis se deduce que existe una frecuencia diferente de células CD8 VHB específicas entre los sujetos que controlan la viremia y los que no lo hacen. Concretamente, el grupo "Portador sano" tiene 3.3 veces más células CD8+ core 18-27 específicas que el grupo con "Hepatitis crónica". También, se puede observar que el grupo "control negativo" y el grupo "hepatitis crónica" presentan la misma frecuencia de células antígeno específicas, mientras que el grupo "control positivo" y el grupo "portador sano" tienen una frecuencia similar que además es superior a la de los grupos control negativo y hepatitis crónica.

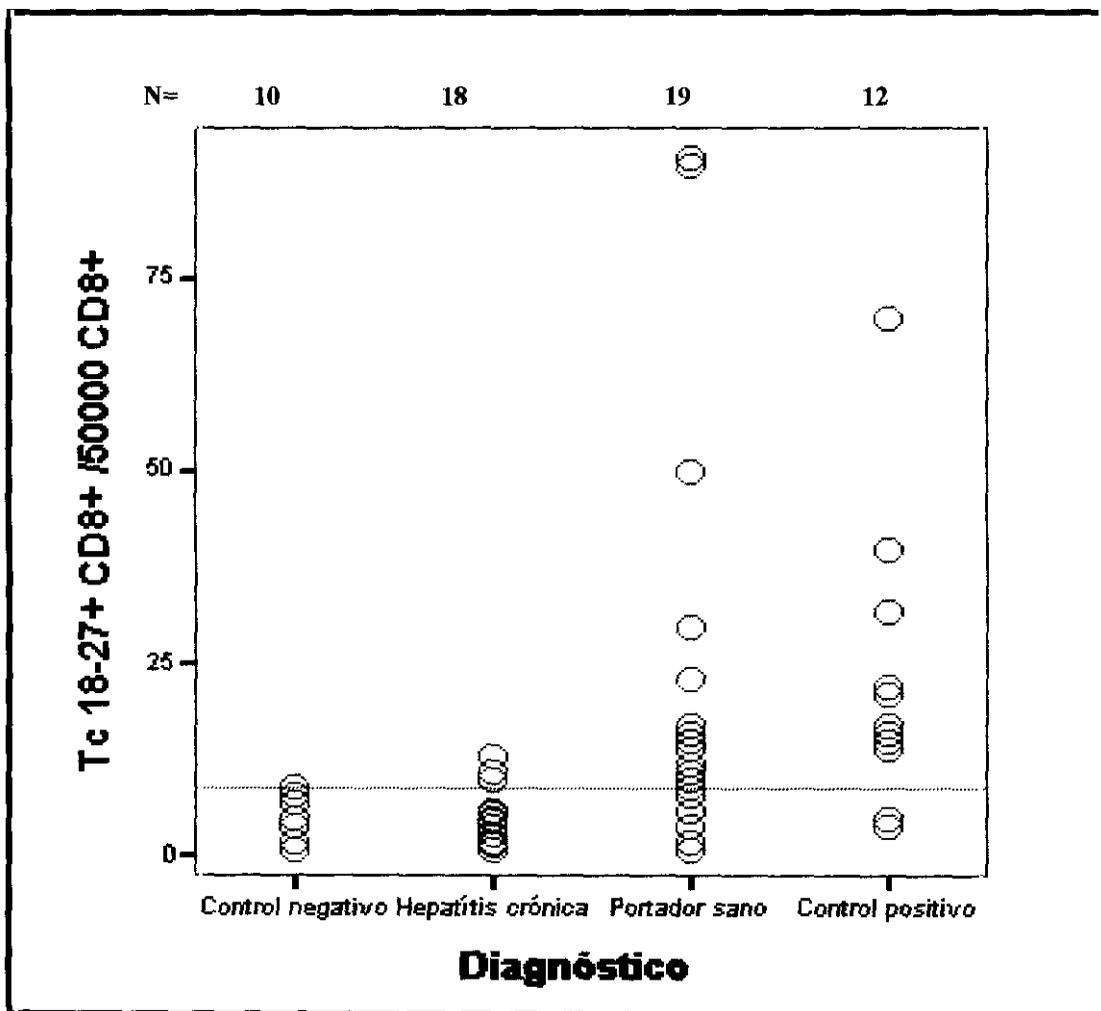


Fig. V.3.- Gráfico de puntos representando la frecuencia de células CD8+ core 18-27 específicas por 50.000 linfocitos CD8+ de sangre periférica en los sujetos del estudio. La línea horizontal de puntos representa el punto de corte de la técnica (8 células CD8+/Tc18-27+ por 50.000 linfocitos CD8+ de sangre periférica).

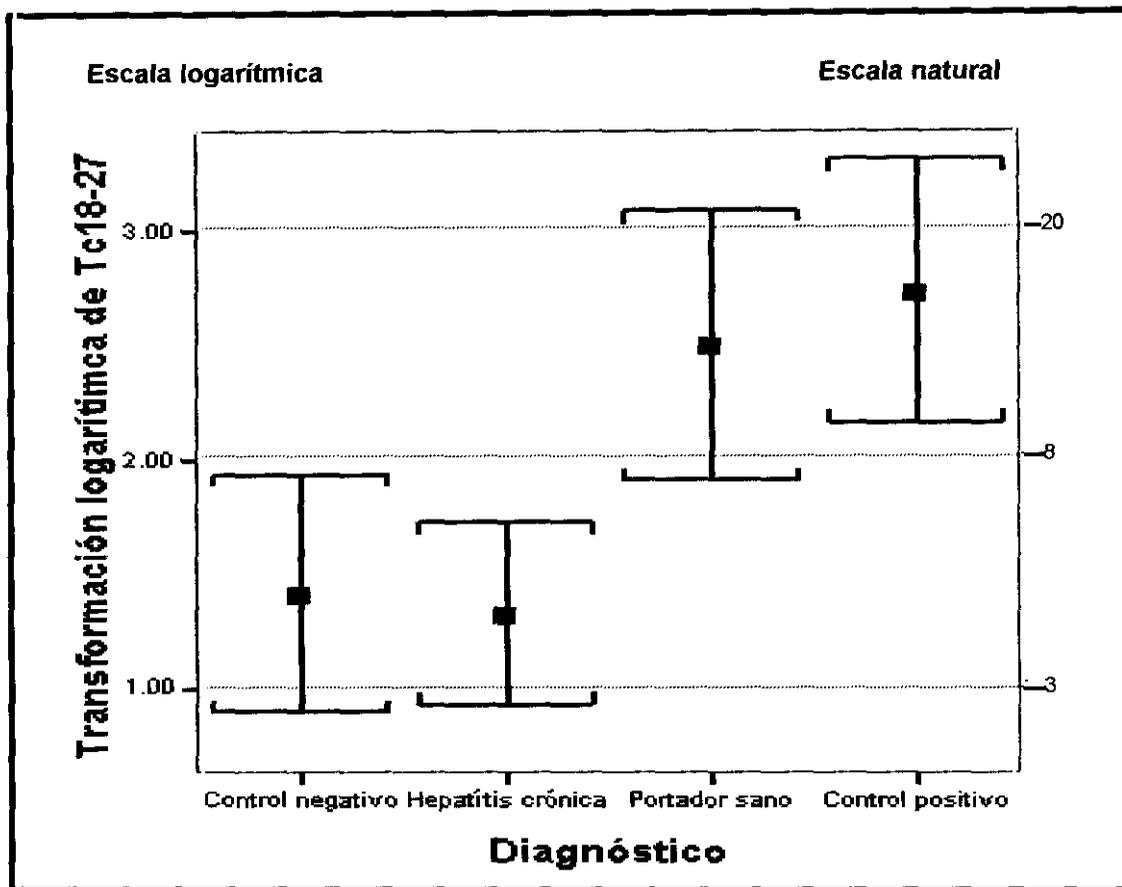


Fig. V.4 Intervalos de confianza al 95% de la media de la variable frecuencia de células CD8+ Tc18-27+ por cada 50.000 linfocitos CD8+ de sangre periférica en los cuatro grupos del estudio. En el eje Y izquierdo se representa el valor del logaritmo neperiano de la frecuencia de estas células por 50.000 linfocitos CD8+. En el eje Y derecho se representa la transformación a escala natural de este valor.

Sin embargo, aunque la diferencia de frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica entre los pacientes con "Hepatitis crónica" y los sujetos "Portadores sanos" es estadísticamente muy significativa, también es muy estrecha en valores absolutos. Así, si observamos los intervalos de confianza de las medias de la variable "Frecuencia de células CD8+/Tc18-27+" en ambos grupos, podemos ver que prácticamente se solapan (Tabla. V.3; Figura V.4.). Es decir, se puede suponer que desde un punto de vista biológico la diferencia observada no debe ser importante.

Tras el análisis de la frecuencia media de las células CD8+/Tc 18-27+ en los distintos grupos, realizamos una nueva comparación desde otra perspectiva. Para evitar el posible sesgo provocado sobre del valor medio de la frecuencia Tc18-27+ por la posibilidad de ausencia de respuesta a este epítipo en algunos sujetos del estudio, se realizó un análisis categorizando la variable. De esta manera evaluamos qué grupos presentaban una mayor proporción de sujetos con respuesta celular citotóxica contra el epítipo core 18-27.

En el apartado anterior definimos el límite de detección de nuestra técnica en 8 células CD8+/Tc18-27+ por cada 50.000 células CD8+, por tanto dividimos a los sujetos del estudio en dos categorías: a) con más de 8/50.000 células CD8+/Tc18-27+; b) con menos de 8/50.000 células CD8+/Tc18-27+. Con este límite observamos que el 68% de los sujetos PS y un 75% de los sujetos del grupo control positivo tenían una frecuencia superior a 8 células CD8+/Tc18-27, mientras que esto sólo ocurría en un 10% de los controles negativos y en el 22% de los pacientes con HCB^{e+} (Tabla V.4).

Frec. de células CD8+/Tc18-27		Control negativo	Hepatitis crónica e ⁺	Portador sano	Control positivo
0-8	Nº de casos	9	14	6	3
	Porcentaje	90%	78%	32%	25%
Superior a 8	Nº de casos	1	4	13	9
	Porcentaje	10%	22%	68%	75%
Total	Nº de casos	10	18	19	12

Tabla V.4. Distribución de la proporción de sujetos con una frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica superior a 8.

Se realizó un análisis de la tabla V.4 mediante un test Chi cuadrado de tendencia lineal que fue significativo con una $p < 0.001$. Es decir, el porcentaje de sujetos con células CD8+/Tc18-27 se incrementa de forma significativa desde el grupo control

negativo al positivo. A continuación se realizó una comparación de los grupos entre sí, corrigiendo el valor p mediante la técnica de Bonferroni. Se consideró una comparación significativa cuando el valor p era inferior a 0.0083, es decir 0.05 dividido por el número de comparaciones realizadas. Este análisis se resume en la tabla V.5.

Grupos	Diferencia proporción	IC 95% de la diferencia.	p valor	OR	IC 95% de la Odds Ratio	p valor
1. Hepat crónica / Control negativo	12%	(-14% a 38%)	0.410	2.5	(0.2 a 27)	0.430
2. Portador sano / Control negativo	58%	(30% a 86%)	0.003	19.5	(2 a 190)	0.011
3. Control positivo / Control negativo	65%	(34% a 96%)	0.002	27	(2.3 a 311)	0.008
4. Portador sano / Hepatitis crónica	46%	(17% a 74%)	0.005	7.6	(1.74 a 33)	0.007
5. Control positivo / Hepatitis crónica	52%	(21% a 83%)	0.004	10.5	(1.8 a 58.3)	0.007
6. Control positivo / Portador sano	16%	(-25% a 38%)	0.387	1.8	(0.3 a 7.03)	0.694

Tabla V.5.- Valores p e I.C. 95% de las diferencias y razones de Odds inter-grupos de la frecuencia de sujetos con más de 8 células CD8+/Tc18-27+. Se considera significativa una $p < 0.0083$ tras corregir el valor p mediante Bonferroni.

Mediante este análisis se observó de nuevo que no existía diferencia entre la proporción de sujetos con más de 8 células CD8+/Tc18-27+ entre el grupo control negativo y los pacientes con hepatitis crónica. Sin embargo, esta proporción fue un 46% mayor en el grupo “portador sano” que en el grupo “hepatitis crónica” y se tradujo en un riesgo 7.6 veces superior de encontrar más de 8 células VHB específicas por 50.000 células CD8+ en el grupo PS que en el HCB+. Otra vez observamos que no existía diferencia entre los grupos control positivo y “portador sano”. En el gráfico V.5 se representa mediante barras estos datos.

En la figura V.6 se reproduce el diagrama de puntos del análisis mediante citometría de flujo de un paciente típico de cada grupo del estudio. Se puede observar

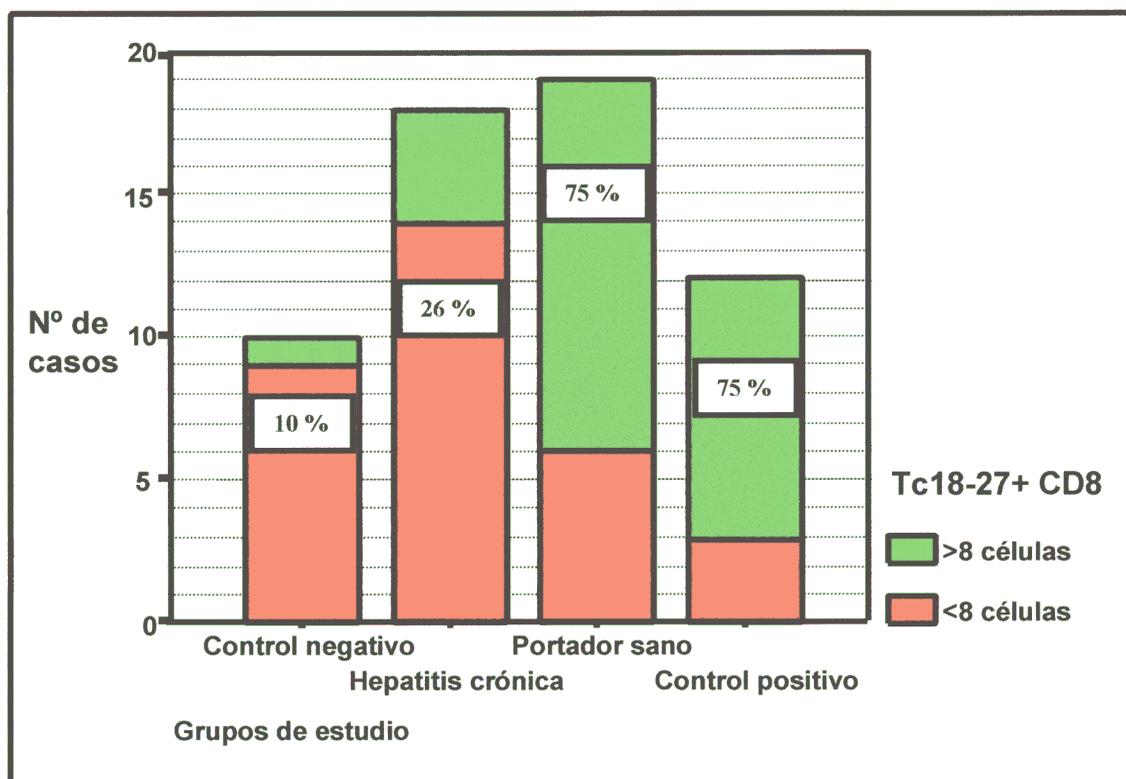


Fig. V.5. Diagrama de barras que representa la proporción de sujetos con mas de 8 células CD8+/Tc18-27+ sobre 50.000 linfocitos CD8 en los distintos grupos.

como en el sujeto del grupo PS y en el sujeto inmune es posible diferenciar una población de células doble positiva superior a 0.016% (límite de detección), mientras que en el caso con HCB^{e+} la frecuencia de estas células se encuentra cerca del ruido de la técnica y en el control negativo es muy inferior al valor mínimo de detección.

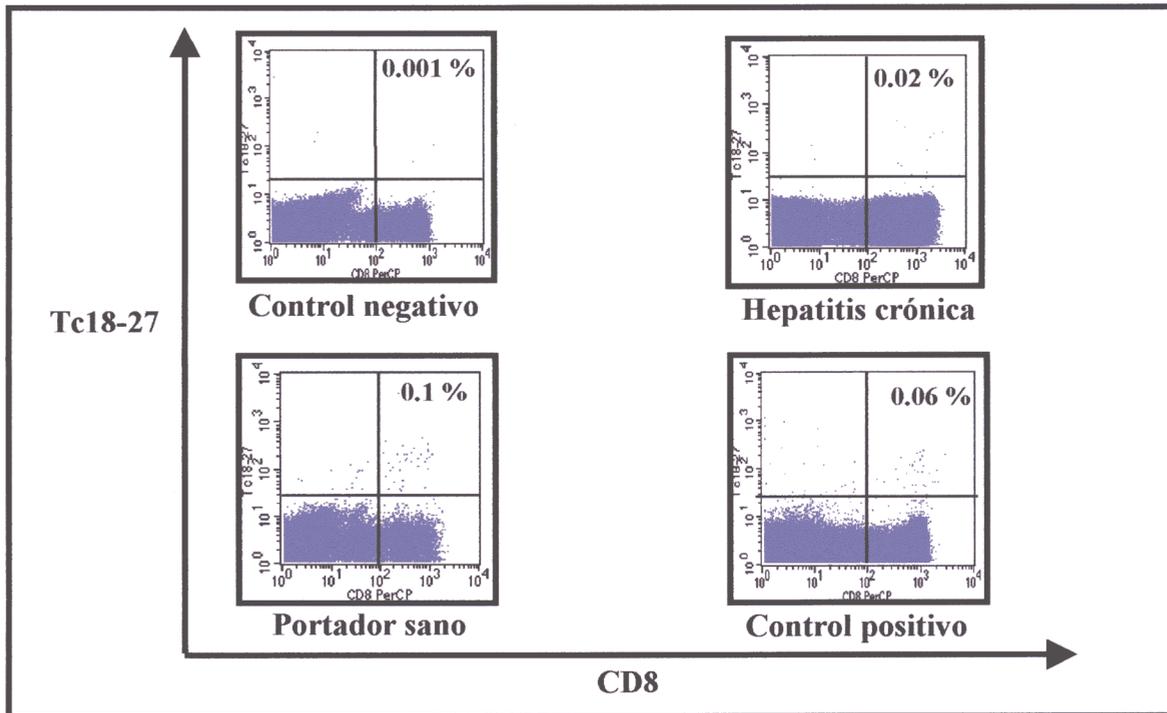


Fig. V.6. Diagramas de puntos del análisis citométrico de la frecuencia basal de células CD8/Tc18-27 en sangre periférica de cuatro pacientes del estudio.

V.2.3 Expansión *in vitro* de linfocitos Tc18-27.

Se ha sugerido mediante modelos matemáticos¹²⁰ que una de las principales variables que determina el control viral puede ser la capacidad de expansión clonal de las células CD8⁺ virus-específicas tras encontrar el virus. Por esta razón analizamos en nuestro estudio esta característica. Para ello planteamos el segundo objetivo de este trabajo que consistía en el análisis de la capacidad de expansión *in vitro* de las células CD8⁺ core 18-27 específicas tras estimulación antígeno específica.

En todos los sujetos del estudio se analizó la capacidad de expansión de las células CD8+ core 18-27 específicas tras estimulación durante 10 días con el péptido core 18-27. Desgraciadamente en tres sujetos PS y en otros tres pacientes con HCB^{e+} no se obtuvieron resultados porque los cultivos se contaminaron con bacteria y por tanto excluimos estos casos del análisis. No obstante, el resto de sujetos del estudio fue suficiente para observar la gran diferencia existente en la capacidad de expansión entre los distintos grupos. En el 75% de los sujetos del grupo PS y en el 67% de los controles positivos se obtuvo una expansión de células CD8+/Tc18-27+ tras la estimulación con el péptido core 18-27, mientras que esto solo ocurrió en el 13% de los pacientes con HCB^{e+} y en ninguno de los controles (Tabla V.6). Esta diferencia entre los distintos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$, test Chi cuadrado de tendencia lineal). A continuación, estimamos las diferencias entre las frecuencias de sujetos con expansión y las odds ratio de expansión entre los distintos grupos (Tabla V.7). El valor p considerado significativo se determinó mediante la corrección de Bonferroni ($p = 0.0083$).

Expansión		Control negativo	Hepatitis crónica	Portador sano	Control positivo
Negativa	Nº de casos	10	13	4	4
	Porcentaje	100%	87%	25%	33%
Positiva	Nº de casos	0	2	12	8
	Porcentaje	0%	13%	75%	67%
Total	Nº de casos	10	15	16	12

Tabla V.6.- Distribución de frecuencias de la variable "Expansión de los linfocitos CD8 core 18-27 específicos tras estimulación antígeno específica" en los distintos grupos del estudio.

Grupos	Diferencia proporción	IC 95% de la diferencia.	p valor	OR	IC 95% de la Odds Ratio	p valor
1. Hepat crónica / Control negativo	15%	(-4% a 35%)	0.194	2.1	(0.08 a 57)	0.660
2. Portador sano / Control negativo	75%	(54% a 96%)	<0.001	48.5	(2.3 a 1014)	<0.001
3. Control positivo / Control negativo	66%	(40% a 93%)	0.0012	32	(1.5 a 692)	<0.001
4. Portador sano / Hepatitis crónica	62%	(34% a 89%)	<0.001	19.5	(3 a 126)	0.0018
5. Control positivo / Hepatitis crónica	53%	(21% a 95%)	0.004	13	(1.9 a 88)	0.008
6. Control positivo / Portador sano	8%	(-25% a 42%)	0.630	1.5	(0.3 a 7.8)	0.630

Tabla V.7.- Diferencia de proporción y odds ratio inter-grupos de la frecuencia de sujetos con expansión de las células CD8+/Tc18-27+ tras estimulación antígeno específica. Se considera significativo una $p < 0.0083$ tras corregir el valor p mediante Bonferroni.

En la figura V.7 se muestra mediante diagrama de barras apiladas la proporción de sujetos en cada grupo con expansión de las células CD8+/Tc18-27+ tras estimulación antígeno específica. En la figura V.8 se representa los diagramas de puntos obtenidos mediante análisis por citometría de flujo de las CMSP teñidas con anticuerpos monoclonales anti-CD8 y con Tc18-27. Se muestra la frecuencia de linfocitos CD8+/core 18-27 antes y después de la estimulación en un paciente de cada grupo. En este ejemplo se observa como en el sujeto PS y en el control positivo se produce un incremento en la frecuencia de células antígeno específicas tras estimulación antígeno específica *in vitro*. En cambio, en el paciente con HCB⁺ y en el control negativo no se observa ninguna expansión.

Estos datos sugieren que, al menos *in vitro*, los linfocitos CD8+ VHB

específicos de sujetos capaces de controlar la infección viral muestran capacidad de expansión clonal cuando encuentran el virus. Sin embargo, esta característica no existe en aquellos pacientes con infección persistente y alto grado de replicación viral. No obstante, este análisis univariante no aclara si esta diferencia se debe a la ausencia de estas células en la sangre periférica de los pacientes con hepatitis crónica AgHBe+, o es secundaria a diferencias cualitativas de estas células entre los sujetos que controlan y los que no controlan la infección. Para evaluar este aspecto se realizó un análisis de regresión logística con las covariables grupo diagnóstico y frecuencia basal de células CD8+/Tc 18-27+. Este análisis se comenta en la sección de análisis multivariante.

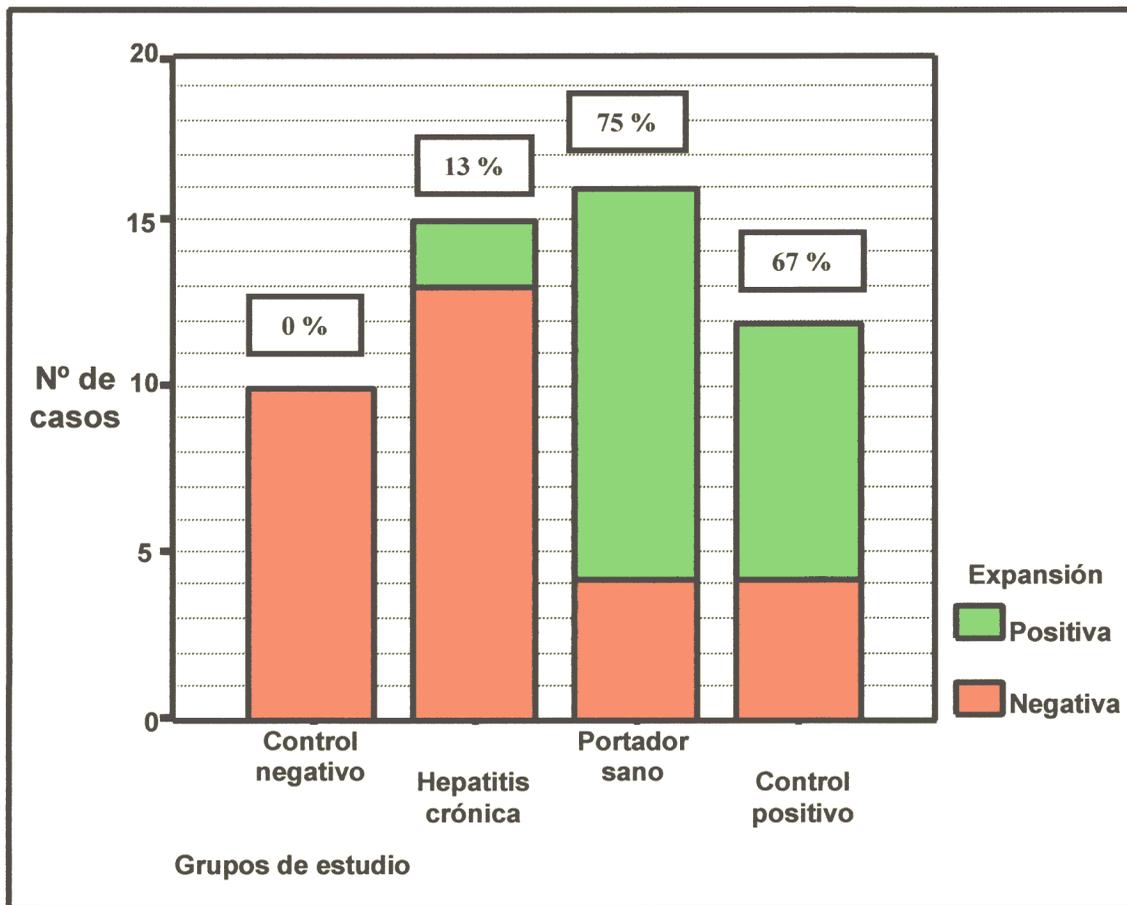


Fig. V.7- Diagrama de barras representando la proporción de sujetos de cada grupo con expansión de las células CD8+/Tc18-27+ tras estimulación *in vitro* con el péptido core 18-27.

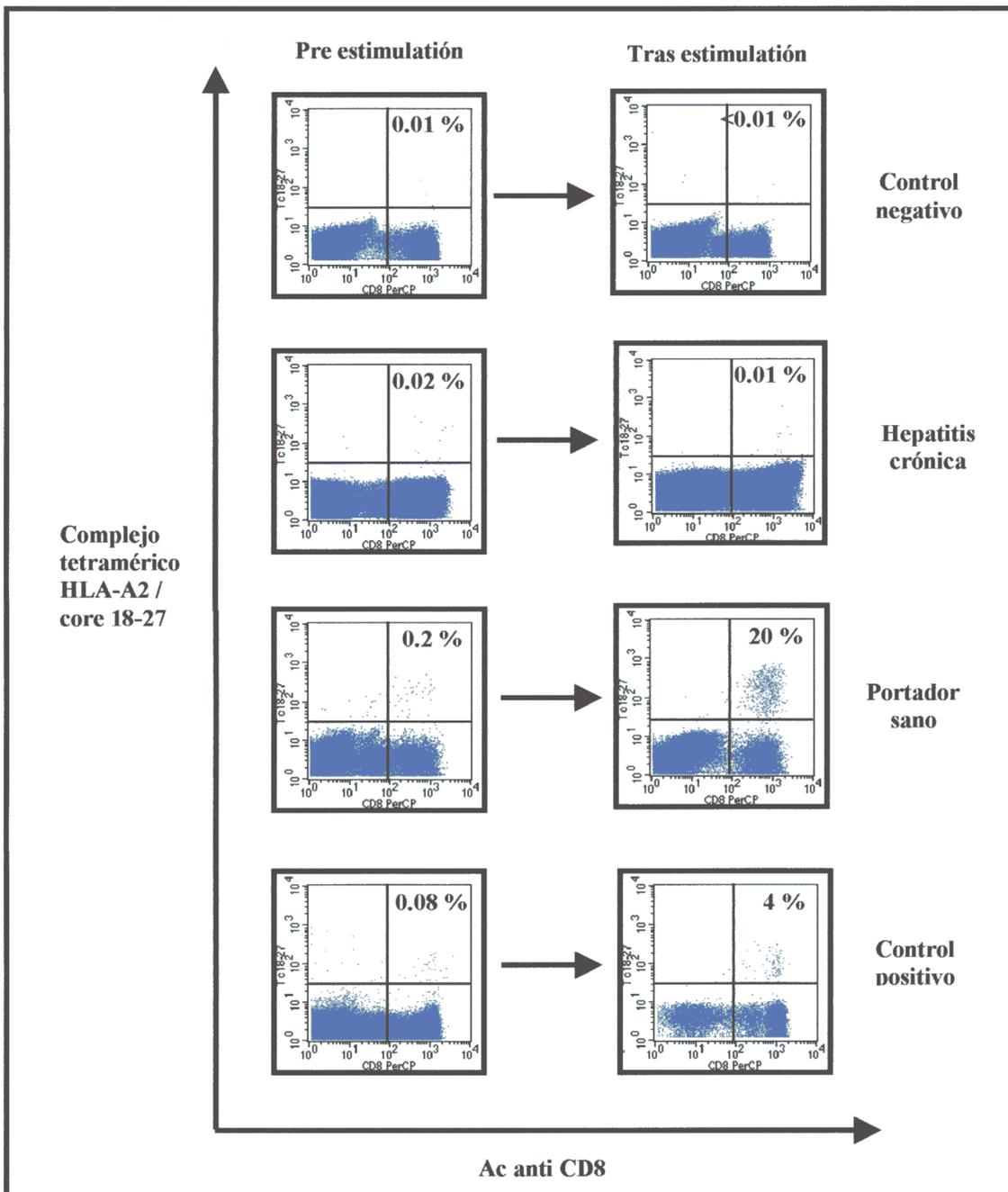


Figura V.8.- Gráfico de puntos que muestran los resultados de la estimulación con el péptido core 18-27 de las CMSP en un sujeto de cada grupo de estudio. Se puede observar como existe expansión de los linfocitos CD8+ VHB específicos del sujeto portador sano y en el control positivo, pero no en el paciente con hepatitis crónica ni en el control negativo.

V.2.4 Correlación de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ con los valores de viremia y transaminasa sérica.

Los análisis previos indicaban que había una relación del grado de replicación viral y daño hepático con la frecuencia de células CD8+/Tc18-27. Por ello decidimos estudiar la correlación existente entre estas variables en los sujetos con infección por VHB del estudio. Aunque en este trabajo no medimos la concentración de DNA VHB en los sujetos con inmunidad natural (grupo control positivo), se sabe que esta es mínima y que se puede detectar solamente en algunos casos en suero mediante técnicas muy sensibles como la "nested PCR"⁷⁷. Por tanto, podemos suponer con toda certeza que el valor de la concentración sérica de DNA VHB era inferior a 2 µg/mL en todos los sujetos de este grupo. Haciendo esta consideración, analizamos la correlación entre la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ con la carga viral y con la transaminemia en los sujetos del estudio infectados con el VHB. Puesto que la variable "frecuencia de células CD8+/Tc18-27+" no seguía una distribución normal, se utilizó el índice de correlación no paramétrico de Spearman. Los resultados de estos análisis se muestran en la tabla V.8 y en la figura V.9.

Correlación entre la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ con:	Número de casos	Coefficiente de correlación	p valor
ALT (UI/L)	49	-0.521	<0.001
DNA VHB sérico (µg/mL)	49	-0.506	<0.001

Tabla V.8.- Coeficientes de correlación de Spearman de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ con la carga viral y con el daño hepático.

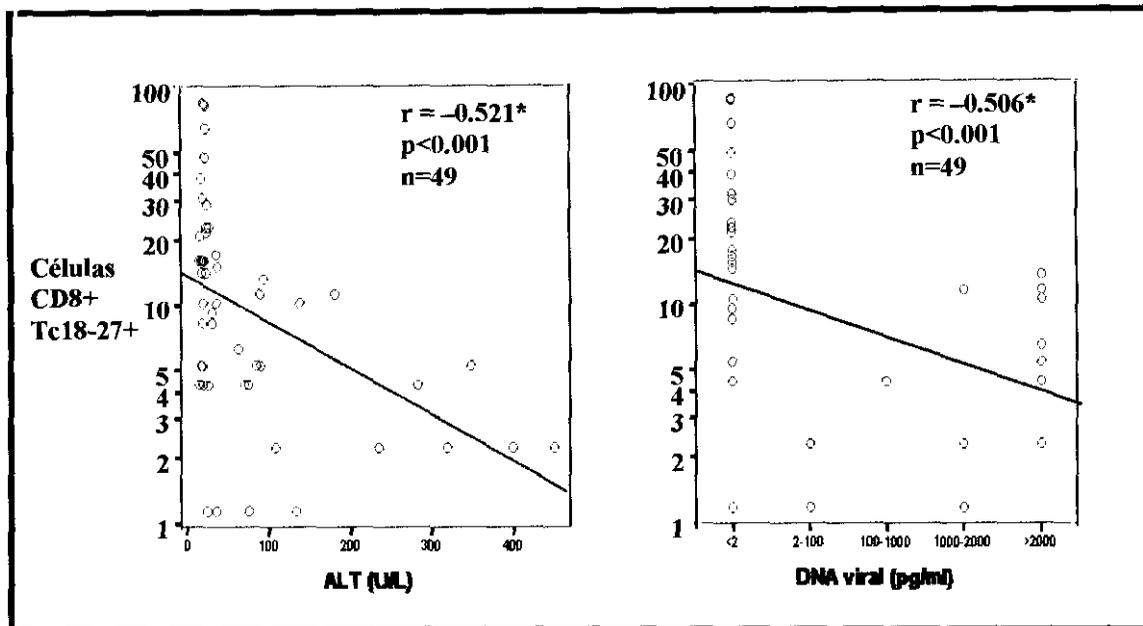


Fig. V.9. Diagramas de puntos que muestran la correlación de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ con la carga viral y la transaminemia. La variable “frecuencia de células CD8+/Tc18-27+” se encuentra representada en escala logarítmica para linealizarla. *El coeficiente de correlación utilizado en el análisis es el coeficiente rho de Spearman. Las dos líneas rojas representan las rectas de regresión estimadas con la variable “frecuencia de células CD8+/Tc18-27+” transformada.

En los diagramas de puntos se puede observar que existía una correlación negativa entre la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ y el daño hepático y también con la carga viral. Es decir, aquellos sujetos que tenían una mayor frecuencia de células VHB específicas presentaban menor viremia y menor daño hepático. Aunque los coeficientes de correlación son bastante altos (-0.521 para ALT y -0.506 para DNA VHB) no son excelentes. Sin embargo creemos que dada las características de la variable “frecuencia de células CD8+/Tc18-27” son aceptables, pues no debemos olvidar que un grupo de sujetos HLA-A2+ no desarrolla una respuesta contra el epítipo core 18-27, por lo que algunos de los valores bajos de la variable en los portadores sanos se puede deber sencillamente a la ausencia de esta respuesta contra este epítipo en estos sujetos, lo que no excluye que las células VHB específicas contra otros epítipos mantengan la misma correlación con el control viral y daño hepático.

V.3 GRÁFICOS Y TABLAS DESCRIPTIVAS.

Tabla descriptiva.

Tabla V.9. Descripción por grupos de los índices estadísticos de las variables del estudio. (Cuando se comparan cuatro grupos se da la significación de la comparación global. En el texto se comenta la comparación por parejas). (Hep. crónica: hepatitis crónica; Control Neg: control negativo; Control Pos: control positivo; Homocedist: homocedisticidad; Tend. lineal: tendencia lineal; N.D.: no disponible).

	Portador sano n=19	Hep. crónica n=18	Control Neg n=10	Control Pos n=12	Valor p	Normalidad/ Homocedist.	Tests
Edad: años cumplidos					0.684	SI/SI	ANOVA
Mediana	40	37	36	40			
Amplitud	(17-62)	(29-52)	(27-50)	(30-52)			
Raza: n (%)					0.838	-	Test Chi cuadrado. Tend. lineal
Caucásica	15 (79)	14 (78)	9 (90)	11 (92)			
Asiática	4 (21)	4 (22)	1 (10)	1 (8)			
Sexo: n (%)					0.683	-	Test Chi cuadrado. Tend. lineal
Masculino	11 (52)	12 (67)	6 (60)	5 (58)			
Vía de contagio: n (%)					0.064	-	Test Chi cuadrado. de Pearson
Sexual / Parenteral	8 (42)	9 (50)	-	11(92)			
Desconocida	8 (42)	5 (28)	-	0(0)			
Vertical/Infancia	3 (16)	4 (22)	-	1(8)			
ALT sérica (UI/L)					<0.001	NO/NO	Kruskal Wallis
Mediana (IQR)	24.9 (11)	101 (208.5)	23.5 (12)	18.5 (6.25)			
AST sérica (UI/L)					<0.001	NO/NO	U Mann Whitney
Mediana (IQR)	20 (7)	90 (139.5)	N.D.	N.D.			
Bilirrubina sérica (mg/dL)					0.273	SI/SI	t-Student
Media (DE)	0.774 (0.27)	0.83 (0.6)	N.D.	N.D.			
PCR VHB: n (%)					0.020	-	Test exacto de Fisher
Positiva	13 (68)	18 (100)-	N.D.	N.D.			
DNA VHB sérico: n (%)					<0.001	-	Test Chi cuadrado de Pearson
<2 µg/mL	19 (100)	0 (0)	N.D.	N.D.			
2-100µg/mL	-	2 (11)					
100-1000µg/mL	-	1 (6)					
1000-2000µg/mL	-	2 (11)					
>2000µg/mL	-	13 (72)					
Ac anti HBs sérico:n (%)					<0.001	-	Test Chi cuadrado de Pearson
Positivo	0(0)	0(0)	0(0)	12(100)			
AgHBs sérico: n (%)					<0.001	-	Test Chi cuadrado de Pearson
Positiva	19 (100)	18 (100)	0 (0)	0(0)			
AgHBc sérico: n (%)					<0.001	-	Test exacto de Fisher
Positiva	0 (0)	18 (100)	N.D.	N.D.			
Ac antiHBc sérico: n (%)					<0.001	-	Test exacto de Fisher
Positiva	19 (100)	0(0)	N.D.	N.D.			
Ac antiHBc sérico: n (%)					0.018	-	Test Chi cuadrado. Tend. lineal
Positiva	14 (82)	6 (35)	N.D.	9(75)			
Linfocitos CD8: (%)					0.16	SI/SI	ANOVA
Media (DE)	23 (4.29)	26.7 (7.18)	22 (6.25)	21.3 (5.3)			

Tabla V.10. Estimación poblacional de los parámetros de las variables más relevantes del estudio en los sujetos con infección persistente por VHB. I.C. 95%: Intervalo de confianza del 95%.

	Portador sanos IC 95%	Hepatitis crónica IC 95%
Edad: años cumplidos	34 a 42 años	34 a 40 años
Raza: (%)		
Caucásica	60 a 97 %	58 a 97 %
Sexo: (%)		
Masculino	36 a 80 %	45 a 88 %
Vía de contagio: (%)		
Sexual / Parenteral	20 a 64 %	27 a 73 %
Vertical / Infancia	20 a 64 %	7 a 48 %
Desconocida	3 a 40%	3 a 41 %
ALT sérica (UI/L)	21.1 a 26.8 UI/L	95.8 a 176.5 UI/L
DNA VHB sérico (microg/mL): (%)		
>2	0 a 17 %	82 a 100 %

Gráficos resumen de las características de los grupos del estudio.

Distribución de la variable edad (años cumplidos).

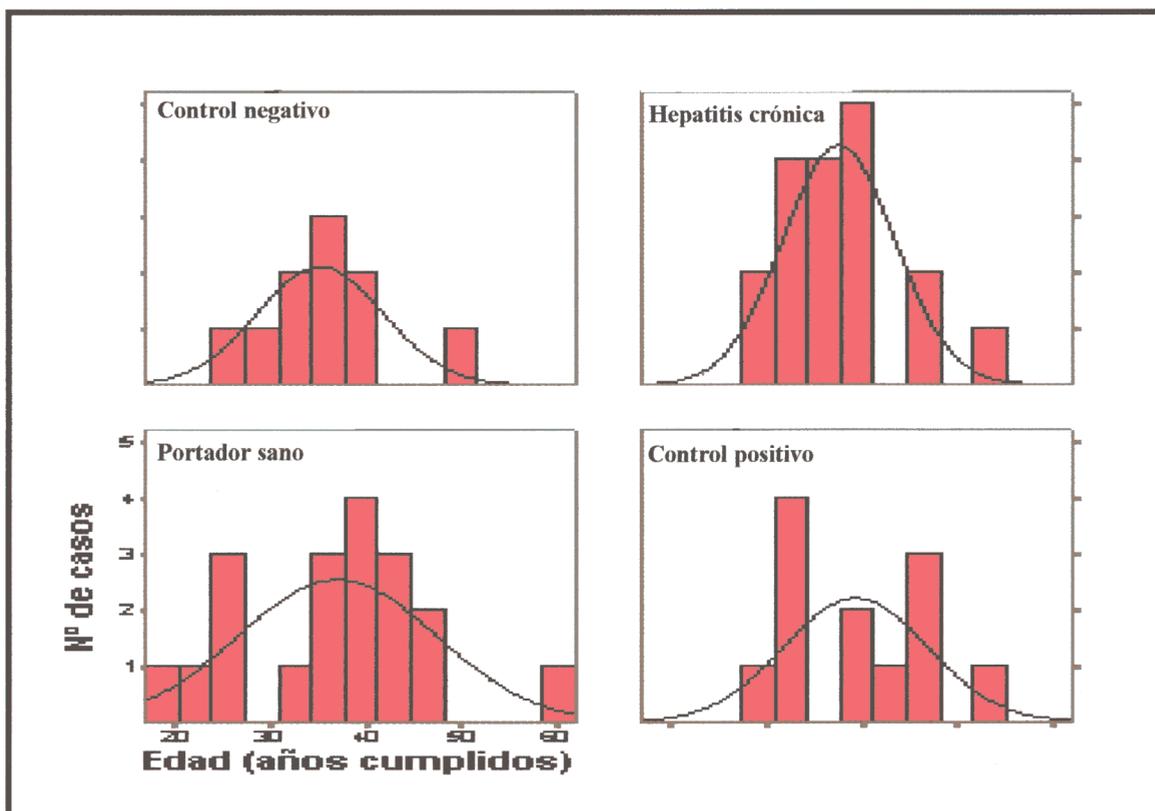


Fig V.10.- Histogramas de la variable edad en los distintos grupos estudiados.

Distribución de la variable sexo.

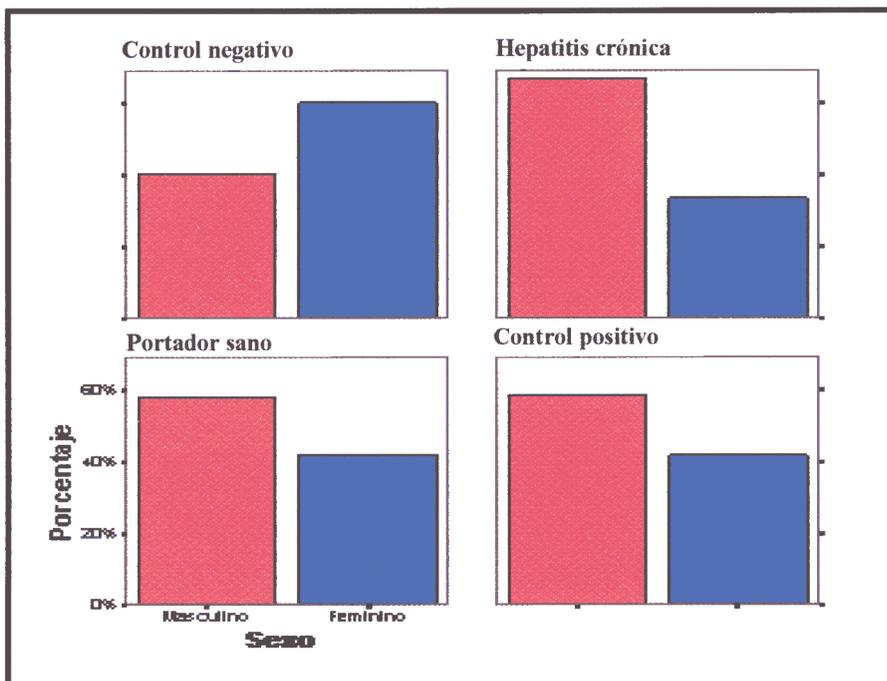


Fig.VII- Distribución de frecuencias de la variable sexo en los distintos grupos.

Distribución de la variable raza.

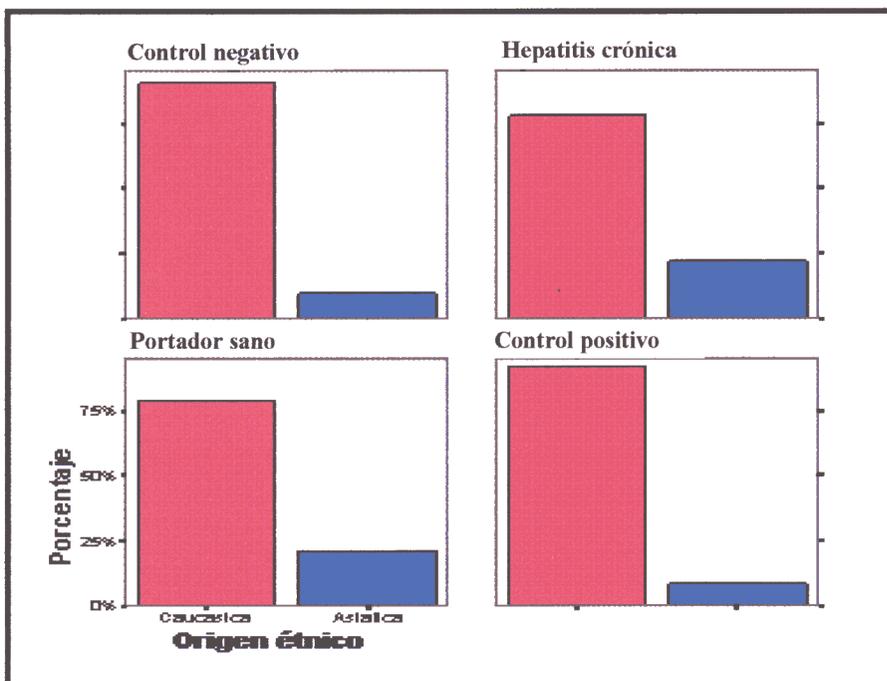


Fig.V.12 Distribución de frecuencias la variable raza en los distintos grupos.

Distribución de frecuencias de la variable ruta de contagio.

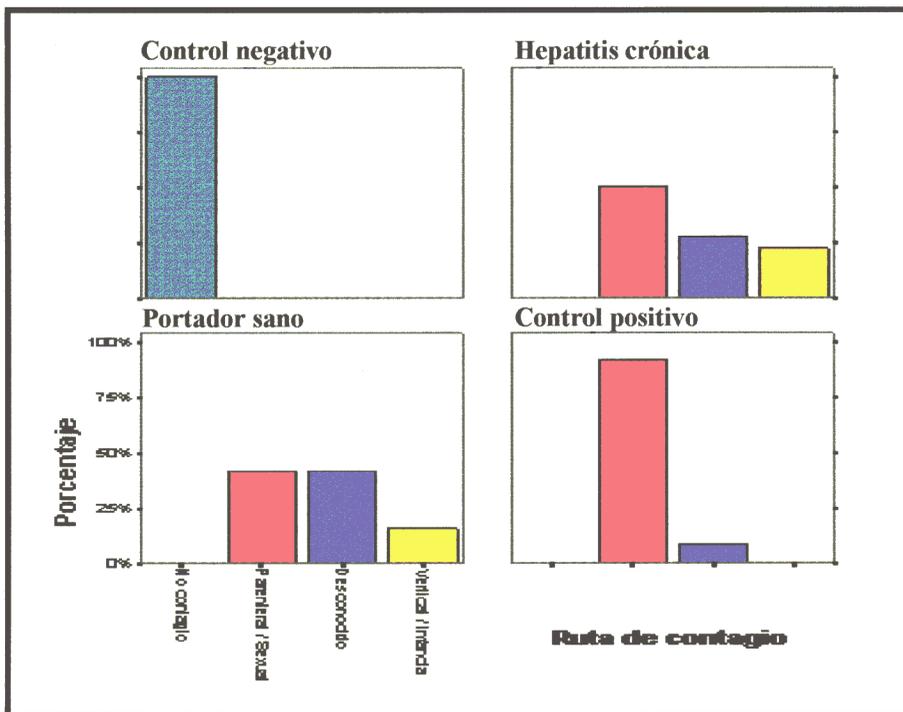


Fig.V.13 Distribución de frecuencias la variable ruta de contagio en los distintos grupos.

Distribución de la variable concentración sérica de ALT.

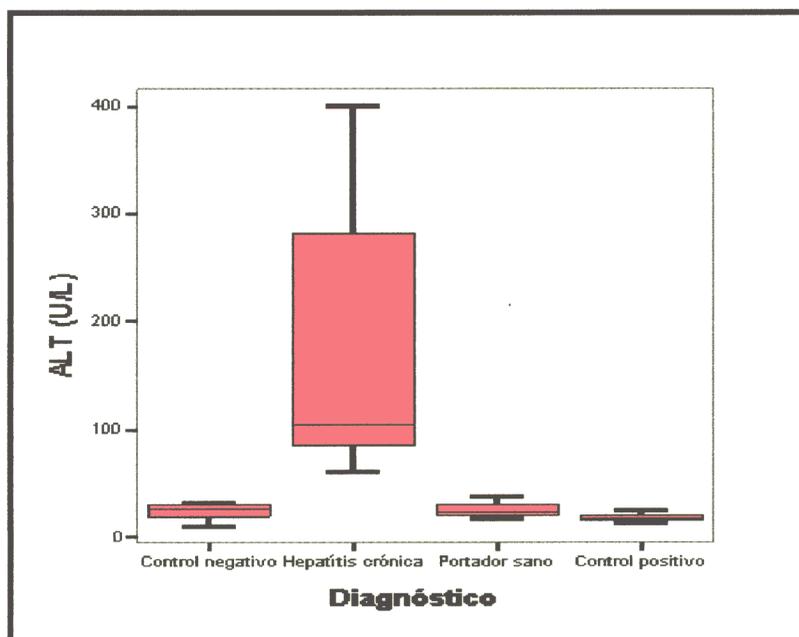


Fig.V.14- Diagramas de cajas de la variable concentración sérica de ALT.

Distribución de la variable concentración sérica de AST.

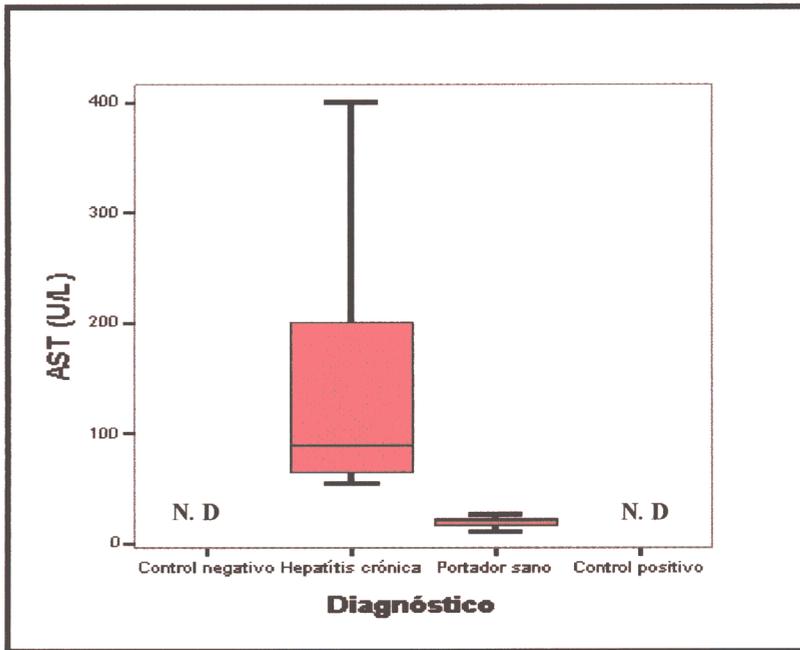


Fig. V.15.- Diagramas de cajas de la variable concentración sérica de ALT. (N.D.: no disponible).

Distribución de la variable bilirrubina sérica.

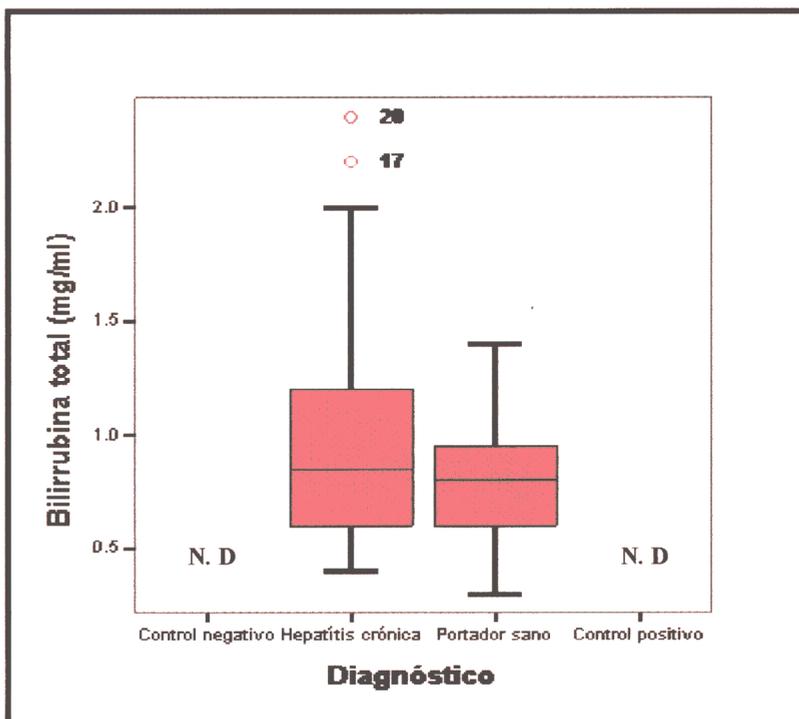


Fig. V.16.- Diagramas de cajas de la variable concentración sérica de bilirrubina. (N.D.: no disponible).

Distribución de la variable frecuencia de linfocitos CD8+ sobre el total de CMSP.

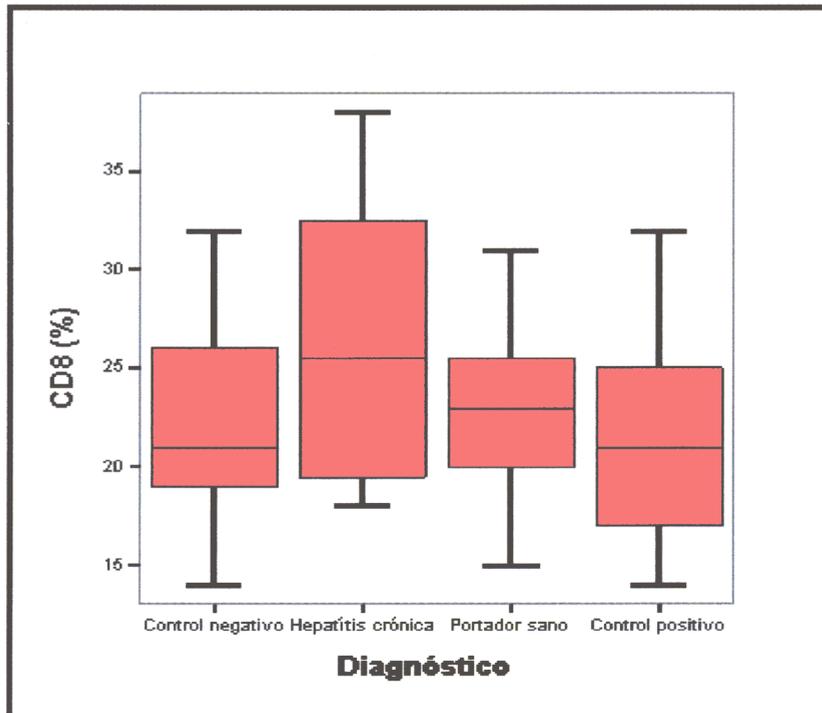


Fig. V.17.- Diagramas de cajas de la variable porcentaje relativo de linfocitos CD8+ sobre el total de CMSP.

V.4 ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

V.4.1 Análisis de la presencia de confusión e interacción en la comparación de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en los sujetos con infección persistente.

Se analizó el posible efecto modificador y confundiente de las variables sexo, edad, raza y ruta de contagio sobre la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en los sujetos con infección persistente por VHB utilizando la estrategia comentada en la sección de diseño estadístico. Como grupo de referencia se utilizó el grupo control positivo (sujetos inmunes). Para crear el modelo sólo se utilizaron los sujetos con infección por VHB, es decir se excluyó el grupo control negativo. Este análisis reveló que ninguna de estas variables ejercía efecto modificador y solamente la edad presentaba un mínimo efecto confusor. No obstante, el modelo se construyó incluyendo la variable edad porque estimaba de forma más precisa el intervalo de confianza de la odds ratio de la frecuencia de las células CD8+/Tc18-27+ entre los grupos que se comparaban. El modelo era estadísticamente significativo ($p < 0.001$) y el valor R^2 era de 0.35, es decir explicaba un 35% de la frecuencia de estas células en los distintos grupos. El modelo de regresión creado cumplía los supuestos de linealidad, homocedasticidad, independencia y normalidad.

	Valor p	Odds ratio	IC 95% Odds ratio
Control positivo / Hepatitis. crónica	0.001	4.5	(8.3 a 1.9)
Control positivo / Portador sano	0.598	1.36	(0.6 a 0.4)

Tabla V.11. Odds ratio de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ del grupo control positivo sobre el grupo "hepatitis crónica" y sobre el grupo "portador sano".

En la tabla V.11 se presentan los datos resumen de este análisis que es similar al obtenido con el análisis univariante al no existir prácticamente sesgo de confusión. Se observó de nuevo cómo el grupo control positivo (sujetos inmunes) mostraba una frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ 4.5 veces superior al grupo de sujetos con hepatitis crónica AgHBe+. Sin embargo, no se encontró diferencia entre los portadores sanos y el grupo control positivo.

V.4.2 Análisis de la capacidad de expansión de las células CD8/Tc18-27+ en los sujetos infectados por VHB ajustando por la frecuencia inicial de células CD8/Tc18-27+.

En el apartado de análisis univariante observamos cómo los linfocitos CD8+/Tc18-27+ de sujetos portadores sanos y de los controles positivos (inmunidad natural) mostraban mayor capacidad de expansión *in-vitro* tras estimulación antígeno específica. Pero también hemos comprobado como estos grupos muestran una frecuencia basal diferente de estas células en sangre periférica, por lo que no se puede descartar que esta distinta capacidad de expansión se deba al mayor número inicial de células antígeno específicas en los portadores sanos y sujetos inmunes. Para controlar este posible sesgo se realizó un análisis de regresión logística ajustando por la frecuencia basal de células CD8+/Tc18-27+ como se describió en el capítulo de material y métodos.

La prueba de razón de verosimilitud para estudiar la significación del modelo de regresión logística fue estadísticamente significativa ($p=0.009$). La prueba de significación de los parámetros del modelo mostró que ambas variables influían en la

capacidad de expansión (grupo diagnóstico $p=0.0209$; frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ $p=0.0327$). La bondad de ajuste del modelo, evaluada mediante el índice R^2 de Nagelkerke, fue del 44%. En la tabla V.12 se presentan las odds ratios de la capacidad de expansión del grupo portador sano y hepatitis crónica AgHBe+ respecto al grupo control positivo, ajustadas por la frecuencia basal de células CD8+/Tc18-27+.

	Valor p	Odds ratio	IC95% Odds ratio
Control positivo / Hepatitis crónica.	0.012	6.6	(1.5 a 29)
Control positivo / Portador sano.	0.634	0.7	(0.14 a 3.3)

Tabla V.12. Odds ratio de la capacidad de expansión de las células CD8+/Tc18-27+ de los sujetos con hepatitis crónica y portadores sanos respecto al grupo control positivo controlado por la frecuencia basal de células CD8+/Tc18-27+

Este análisis demostró otra vez que existía una relación entre la situación clínica y la capacidad de expansión de los linfocitos CD8 VHB específicos, aunque los valores de las odds ratio son inferiores a los obtenidos con el análisis univariante. Esto es debido al ajuste producido por la variable frecuencia de células CD8+/Tc18-27+. Sin embargo, tras este ajuste podemos observar como en una situación de igualdad basal de células CD8 VHB específicas un sujeto del grupo control positivo presenta un riesgo de expansión 6.6 veces superior que un sujeto con hepatitis crónica AgHBe+, mientras que este riesgo es similar entre portadores sanos y el grupo control positivo. Por tanto, este análisis sugiere que existen diferencias cualitativas entre las células CD8+/Tc18-27+ entre los sujetos portadores sanos y los pacientes con hepatitis crónica AgHBe+.

VI. DISCUSIÓN.

El control de la infección por VHB requiere la respuesta coordinada de los sistemas inmunes innato y adaptativo tanto humoral como celular, pero probablemente este virus no citopático nunca se elimina completamente del organismo. No obstante, en la mayoría de los casos el sistema inmune del huésped es capaz de controlar la infección^{77,133,79,134,76,135}, ocasionando un cuadro agudo autolimitado con desarrollo de una inmunidad celular y humoral protectora de larga duración. Esto mismo ocurre en otras infecciones virales persistentes, como la infección por VEB¹³⁶ o en la infección por HTLV-I¹³⁷, en las que una respuesta inmune eficaz controla la infección sin repercusiones clínicas, aunque no consigue el aclaramiento completo del virus. Sin embargo, en un porcentaje de individuos con infección por VHB el virus escapa al control inmunitario induciendo la aparición de una enfermedad hepática necroinflamatoria crónica de variable intensidad. Estos son los casos denominados infección crónica por VHB en la práctica clínica, caracterizados por la persistencia del AgHBs en suero.

Actualmente se considera que la capacidad de montar una eficiente respuesta inmune celular contra el virus B es un factor crítico para controlar la infección^{54,138}.

Concretamente, a la respuesta celular citotóxica VHB específica se le atribuye la función efectora esencial para el control viral, tanto por su capacidad de destruir la célula infectada como por su facultad para inhibir la replicación viral por mecanismos no citolíticos¹³⁹. Pero también se ha relacionado a estas células con la producción de daño hepático. Esta afirmación se basa en que el VHB es un virus no citopático y por tanto incapaz habitualmente de destruir el hepatocito. Se ha observado que no hay una relación entre la transaminasemia y la carga viral, pero si existe una correlación entre el infiltrado linfocitario hepático y la severidad de la hepatitis crónica. Además, durante la seroconversión del antígeno e se produce un incremento en la respuesta inmune que se acompaña de la elevación de las cifras de transaminemia⁷¹. Basándose en estas observaciones diversos autores han postulado que las células VHB específicas con actividad citolítica pudieran ser las causantes de este daño en la hepatitis crónica, especulando que su respuesta es débil para controlar el VHB pero suficiente para generar daño hepático⁵⁴.

La respuesta celular citotóxica VHB específica ha sido ampliamente estudiada en la infección aguda con control viral, observándose que se trata de una respuesta intensa, policlonal y multiespecífica⁵⁴ que coincide con la elevación máxima de las cifras de ALT¹⁰⁰ y precede al aclaramiento de los antígenos AgHBe y AgHBs y al desarrollo de anticuerpos neutralizantes¹⁴⁰. Sin embargo, en la infección crónica se ha advertido que esta respuesta es más débil o indetectable en sangre periférica⁵⁴, aunque se han conseguido aislar clones de células T VHB específicas a partir de linfocitos intrahepáticos^{84,141}.

De cualquier manera, es una realidad que no todos los sujetos con persistencia

del AgHBs presentan el mismo grado de daño hepático y de replicación viral¹⁵. Este rango de variación en estas dos variables puede ser debido a diferencias cuantitativas y cualitativas en la respuesta inmune y especialmente en la respuesta citotóxica. Por esta razón, en este trabajo estudiamos la respuesta celular citotóxica VHB específica en dos grupos de sujetos representativos de dos diferentes situaciones clínicas en la infección crónica por VHB. Por un lado estudiamos los individuos “portadores sanos”, caracterizados por baja viremia ($<2\mu\text{g/ml}$ en suero), ausencia de daño hepático (ALT normal) y AgHBe negativo, y por otro, analizamos los pacientes con hepatitis crónica AgHBe+, diferenciados por la elevada transaminemia y carga viral ($>800\mu\text{g/ml}$ en suero). Ambos grupos los comparamos con un conjunto de sujetos con inmunidad contra el VHB adquirida de forma natural, es decir, con anticuerpos anti HBs sin antecedente previo de vacunación. Este grupo nos sirvió de control positivo de referencia, puesto que se ha demostrado que los sujetos que controlan completamente la infección aguda por VHB desarrollan una respuesta CD8 VHB específica que se mantiene durante décadas y que es capaz de controlar continuamente la replicación viral⁷⁷.

Estos tres grupos presentaban similares características demográficas lo que permitía su comparabilidad. Obviamente eran diferentes en las características serológicas y virológicas que definían las distintas categorías (carga viral, transaminemia, AgHBs, AgHBe). Desde un punto de vista inmunológico es interesante resaltar que la frecuencia de sujetos con Ac. anti HBc era diferente entre el grupo “portador sano” y el grupo con hepatitis crónica e+. Esta diferencia puede reflejar la existencia de una distinta capacidad de respuesta celular T entre estos dos grupos. Se ha

demostrado con anterioridad que la producción de anticuerpos anti HBc es tanto una función independiente de las células T como dependiente de esta respuesta⁶⁷.

En estos sujetos con diferente control de la infección por VHB nos planteamos el análisis tanto de la frecuencia de las células CD8 VHB específicas como su habilidad de expansión clonal. Es cada vez más claro que la presencia de un reservorio de células CD8 virus específicas con capacidad de expansión clonal, de migración al lugar de la infección y de desarrollo de las adecuadas acciones efectoras es necesario para mantener al virus bajo control y responder rápidamente a las variaciones en la cinética de replicación viral¹²⁰. Estos parámetros definidos como eficiencia o capacidad de respuesta de los linfocitos T citotóxicos son más importantes que el número absoluto de células que posee el sujeto infectado. También investigamos si las características de esta respuesta en los diferentes grupos se asociaba con distintos grados de daño hepático, para comprobar si se cumplía la hipótesis ampliamente admitida de que son las células citotóxicas antígeno específicas las causantes del daño tisular⁸⁴.

Para llevar a cabo nuestros objetivos utilizamos como modelo la infección por VHB en sujetos HLA-A2 positivos. En estos sujetos se ha descrito con anterioridad múltiples epítomos HLA clase I restringidos⁵⁴. En nuestro trabajo, elegimos analizar la respuesta contra el péptido del core 18-27 del VHB, por haberse demostrado que está presente en la mayoría de casos agudos que controlan la infección^{97,100}, lo que nos hace suponer que se trata de un epítomo inmunodominante. Para visualizar estas células utilizamos los complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27. Esta tecnología se ha utilizado previamente en el estudio de pacientes con infección aguda por VHB, mostrando ser una técnica muy específica¹⁰⁰. Para definir el límite de detección de esta

técnica en nuestro estudio con sujetos con infección crónica, se utilizó un grupo de sujetos sanos HLA-A2+, sin antecedentes clínicos o serológicos de contacto con el VHB, cuyas CMSP fueron teñidas con complejos tetraméricos. El punto de corte de la técnica se situó en un 0.016% de células CD8 VHB específicas sobre el total de células CD8 en sangre periférica. Este valor mínimo de detección es similar al descrito por otros autores en el uso de complejos tetraméricos para el estudio de otras infecciones virales¹⁰⁹.

Utilizando este modelo de estudio hemos demostrado que en la mayoría de sujetos con infección persistente que controlan la infección viral existe un reservorio de células CD8+ VHB específicas. Este reservorio estaba presente de forma semejante tanto en los sujetos portadores sanos como inmunes. Concretamente, detectamos en alrededor del 70% de los individuos de ambos grupos estas células en sangre periférica. Es importante resaltar que la ausencia de células CD8 core 18-27 específicas en un 30% de estos casos no debe hacernos pensar en que no existe una respuesta celular citotóxica antígeno específica en estos individuos, sino que probablemente estos sujetos habrán desarrollado una respuesta contra otros epítomos virales que no podemos detectar al utilizar complejos tetraméricos dirigidos sólo contra el péptido core 18-27. De cualquier manera, tenemos que destacar que aunque estas células se detectaron en la sangre periférica de los pacientes que controlaban la replicación viral, su frecuencia, al menos para las células CD8 core 18-27 específicas, era muy baja y próxima al límite de detección de la técnica utilizada.

Sin embargo, estas células no se detectaron en la sangre periférica de la mayoría de pacientes con hepatitis crónica AgHBe+. La interpretación de este resultado negativo

es compleja. La primera opción es suponer que estas células están presentes en una frecuencia muy baja o están completamente ausentes. Se ha demostrado en modelos animales que la repetida estimulación con elevadas dosis de antígeno puede inducir la extenuación y la muerte celular³⁶. Se sabe que las células T tienen una capacidad limitada de división y pueden replicar solamente un número finito de generaciones (límite Hayflick), por tanto la continua estimulación antigénica podría ocasionar la desaparición de estas células¹⁴². Un mecanismo homeostático de control de la proliferación de las células T es la muerte celular mediada por Fas¹⁴³ (Figura VI.1). Esta vía se activa para eliminar las células que encuentran repetidamente a su antígeno, como ocurre con los linfocitos que reconocen autoantígenos. Estudios realizados por Ucker et al. en células T murinas no transformadas demostraron que diferencias cuantitativas en la cantidad de antígeno determinaban la respuesta celular en la dirección de muerte o proliferación celular¹⁴⁴. En este estudio la muerte celular era generada por altas concentraciones de antígeno. También se ha comprobado una situación similar en un modelo experimental de encefalomiелitis alérgica, una enfermedad autoinmune mediada por células CD4 específicas contra la proteína básica de la mielina (PBM). En este trabajo se ha observado que altas dosis de PBM son capaces de eliminar completamente *in-vivo* las células T PBM específicas¹⁴⁵. Una situación similar puede ocurrir en la infección crónica por VHB con elevado grado de replicación viral, donde el continuo estímulo antigénico podría inducir la delección de estas células. Datos procedentes de un trabajo de Nakamura et al. señalan que la frecuencia de linfocitos T de sangre periférica que muestran signos de apoptosis es muy baja en pacientes con hepatitis crónica cuando la concentración de ALT se incrementa y muy alta cuando la transaminemia desciende. Este hallazgo sugiere una correlación entre activación celular y muerte celular tras la activación¹⁴⁶. Además, estos mismos autores han demostrado

que la estimulación con AgHBc recombinante podía inducir la apoptosis de estas células *in vitro*, lo que induce a pensar que la apoptosis celular T inducida por la activación antigénica podría ser una causa de la deficiencia de estas células. Sin embargo, en el momento actual esta atractiva hipótesis permanece sin ser confirmada. No obstante, es difícil pensar que existe una delección completa de la respuesta celular CD8+ VHB específica en los sujetos con infección crónica AgHBc+, puesto que estas células se han aislado a partir de linfocitos intrahepáticos en otros estudios^{84,141} y se ha observado que están presentes en sangre periférica^{89,84} y pueden ser expandidas en casos de seroconversión espontánea o inducida por IFN alfa⁸³. Sin embargo, en estos trabajos no se ha analizado si las células encontradas respondían a células con fenotipo “memoria/efector” o se trataba de células de nueva generación. De cualquier manera, no se puede descartar que en los pacientes con hepatitis crónica estas células se vuelvan anérgicas¹⁴³ y no proliferen ni se diferencien correctamente como sucede en los sujetos inmunes o portadores sanos (Figura VI.1). Es muy probable que estos dos mecanismos (inducción de anergia y muerte celular inducida tras activación) previamente comentados ocurran a la vez en estos pacientes. Así, Gallimore et al. han observado en un modelo murino de infección por LCMV que altas dosis de carga viral inducen la desaparición de las células antígeno específicas, ya sea por ausencia del apropiado ambiente de citoquinas para estas células productoras de perforina o por apoptosis mediada por activación. Sin embargo, es interesante resaltar que en este modelo existe un periodo de anergia entre la inducción de la activación de los LTC y la delección de estas células³⁶.

Otra posibilidad para explicar la baja frecuencia de estas células en sangre periférica podría ser la compartimentalización en el lugar de la infección. El estudio del

compartimento periférico podría en este caso no ser representativo de lo que ocurre en el hígado¹⁴⁷. No obstante, debemos tener en cuenta que el compartimento periférico es una ruta obligada para los linfocitos CD8 VHB específicos desde los ganglios linfáticos al hígado, por lo que aun existiendo un secuestro hepático de estas células, el hecho de no encontrarlas en sangre periférica induce a pensar que están presentes en una frecuencia muy baja. De cualquier manera, son necesarios nuevos estudios de los linfocitos CD8 VHB específicos intrahepáticos para analizar si existe un alto grado de compartimentalización de estas células. Finalmente, otra razón para la ausencia de detección de estas células en los sujetos con hepatitis crónica podría ser debida a la regulación a la baja del TCR en los linfocitos citotóxicos VHB específicos sometidos a una elevada antigenemia⁴⁶. Este hecho podría provocar que el número de TCR en la superficie celular fuera insuficiente para dar una señal positiva con la técnica utilizada. Sin embargo, esta posibilidad la creemos poco probable. Estudios realizados *in vitro* en nuestro laboratorio estimulando CMSP de sujetos inmunes contra el VHB con dosis creciente de antígeno, mostró una discreta regulación a la baja del TCR que nunca evitó el reconocimiento de estas células con los complejos tetraméricos (datos no publicados).

Nuestros datos sugieren que en los sujetos con infección persistente por VHB, cualquiera que sea su situación clínica, existe una frecuencia de células CD8+ VHB específicas muy baja. Concretamente, para el epítipo core 18-27 en sujetos HLA-A2+ que controlan la infección, esta frecuencia se encuentra alrededor del 0.02% de los linfocitos CD8 y este valor está por debajo del 0.016% en los pacientes con hepatitis crónica eAg+. Esta similitud en la frecuencia de LTC VHB específicos en sangre periférica en presencia de distintos grados de control de la infección parece extraña, si es cierto que estas células son importantes en el control viral. Sin embargo, este

fenómeno se ajusta a las predicciones de los modelos matemáticos que describen la interacción entre las células T citotóxicas virus específicas y el virus. Este modelo expresa la clásica relación ecológica entre depredador y presa¹²⁰. De tal manera que, un eficiente depredador (LTC) reducirá rápidamente la cantidad de presa (virus) a una proporción tan baja que la falta de estímulo provocará la posterior reducción de la frecuencia del depredador. Sin embargo, en la situación opuesta con un depredador ineficiente (LTC), la presa (virus) se mantendrá siempre elevada y el depredador en una frecuencia mínima. Esto es exactamente lo que hemos observado en este estudio transversal. En este corte en el tiempo observamos como sujetos con distinto grado de control del VHB (inmunes, portadores sanos, hepatitis crónica eAg+) muestran una frecuencia de LTC VHB en sangre periférica muy baja y próxima en todos ellos.

En este mismo modelo matemático se predice que la capacidad de respuesta citotóxica, es decir la facultad de expansión clonal tras encontrar al virus, es un elemento más importante en el control de la infección que el número absoluto de LTC¹²⁰. Los datos de nuestro estudio se ajustan perfectamente a esta idea. En este trabajo se demuestra como tanto los sujetos con inmunidad natural como los portadores sanos disponen de LTC VHB específicos con capacidad de expansión clonal que no está presente en la mayoría de los pacientes con hepatitis crónica AgHBe+. La ausencia de expansión de los LTC VHB específicos encontrada en los pacientes con hepatitis crónica también ha sido descrita para estas células en la fase aguda de la primoinfección por VHB¹⁰⁰. En esta fase las células estudiadas mostraban un fenotipo de alto grado de activación (HLA-DR+, CD38+, CD45RA-, CD62L-) que probablemente indica que se trata de células efectoras que sufrirán apoptosis tras realizar su función. Esta situación puede ocurrir también en la hepatitis crónica B y puede ser la causa de la incapacidad de

expansión clonal de las células CD8+ VHB específicas. Sin embargo, se podría objetar que la ausencia de expansión se debe a la falta de células en el compartimento periférico en los pacientes con hepatitis crónica, puesto que este trabajo sólo indica que su frecuencia es inferior al 0.016% de las células CD8+. No obstante, cuando se realizó el análisis de la capacidad de expansión en los distintos grupos controlando por la frecuencia basal de LTC VHB específicos esta diferencia se mantuvo. Por tanto, estos datos sugieren que existe una desigualdad cualitativa en las poblaciones de células CD8 VHB específicas entre sujetos con y sin control viral.

Ante estos resultados es tentador especular que dependiendo de factores virales (inóculo, ruta de contagio, velocidad de replicación viral, presencia de mutaciones virales) y del huésped (tipo de respuesta T “helper”, microambiente de citoquinas, eficacia de las CPA) se inducirá o no una respuesta citotóxica adecuada durante la primoinfección. En el caso de desarrollarse una respuesta idónea, se reducirá la viremia hasta un valor inferior al necesario para inducir la activación masiva de los LTC. Sin embargo, cantidades variables del VHB permanecerán en el organismo de forma persistente. Estas trazas virales serán controladas por el reservorio periférico de LTC VHB específicos con capacidad de expansión clonal ante el encuentro con el virus. Probablemente estas células abandonan continuamente el compartimento periférico para dirigirse al hígado y controlar aquellos hepatocitos infectados. No debemos olvidar que en los sujetos inmunes también participan en el control viral los anticuerpos neutralizantes, pero no ocurre así en los “portadores sanos” que no presentan anticuerpos contra el AgHBs. En estos casos es probable que los LTC VHB específicos sean los únicos responsables de dominar la infección. Las trazas virales persistentes pueden actuar como un estímulo de baja intensidad que permite que se mantenga un

reservorio de células de memoria a partir de las que surgirán células efectoras para mantener controlada la infección¹⁴³. Este es el escenario que posiblemente ocurre en los portadores sanos y sujetos inmunes. Sin embargo, si la respuesta celular citotóxica específica en la primoinfección no es adecuada, no será capaz de reducir rápidamente la carga viral y se puede suponer que la estimulación continuada por la elevada antigenemia inducirá la anergia y/o muerte celular como ocurre en la infección murina por LCMV³⁵ o por CMV³⁶ respectivamente. Ésta es la situación que puede ocurrir en los sujetos con infección crónica por VHB AgHBe+ que presentan elevada replicación viral y elevada antigenemia.

Es interesante resaltar que los datos de esta tesis sugieren que el VHB persiste de forma indefinida en el organismo a pesar de una correcta respuesta inmune, como ha sido señalado por otros autores anteriormente⁷⁷. En nuestro estudio solo realizamos una búsqueda del VHB en suero mediante “nested PCR” en los sujetos con infección crónica, sin embargo el hallazgo de LTC VHB en sujetos inmunes mucho tiempo después de recuperarse de la infección aguda muestra que el VHB no es completamente eliminado a pesar del desarrollo de una respuesta inmune eficiente. Es decir, puesto que la respuesta citotóxica hallada en estos sujetos inmunes era específica contra proteínas del VHB que requieren la síntesis por las células infectadas, nuestros datos implican que existe un primado continuo de nuevos LTC por trazas transcripcionalmente activas del virus B. Por otro lado, en los sujetos “portadores sanos” observamos que a pesar de no detectar mediante técnica de hibridación el DNA viral en suero, sí fue posible descubrirlo en la mayoría de individuos mediante “nested PCR”. Por tanto, en este caso podemos comprobar como a pesar del control ejercido por el sistema inmune probablemente mediante los LTC VHB específicos el virus era aun detectable en suero.

El siguiente objetivo de nuestro trabajo era evaluar la relación que existía entre el daño hepático y la respuesta celular citotóxica. Como se ha comentado hasta ahora, los sujetos con control viral disponían de una respuesta CD8 VHB específica cualitativamente superior a los pacientes con elevada viremia. Sin embargo, tanto en los sujetos con inmunidad natural como en los portadores sanos, a pesar de la presencia de esta respuesta no existía daño hepático (transaminasemia normal), mientras que los pacientes con hepatitis crónica AgHBe+ con una respuesta inferior presentaban daño hepático. No obstante, se podría argumentar que esto no implica que los LTCs no produzcan el daño en la hepatitis crónica, puesto que la baja frecuencia de estas células en el compartimento periférico podría indicar que están secuestradas en el hígado donde producirían el daño tisular. Sin embargo, creemos que los datos de esta tesis son compatibles con observaciones obtenidas en investigación animal y humana que demuestran que puede existir un control viral por los LTCs virus específicos sin ocasionar daño hístico.

Cooper et al. han demostrado en chimpancés infectados con VHC que no existía correlación entre la actividad citotóxica de los linfocitos CD8 VHC específicos aislados del hígado y el valor de transaminemia¹¹⁷. En un modelo murino de hepatitis fulminante por VHB se ha observado que el daño hepático es generado por las células mononucleares del sistema innato que son reclutadas al lugar de la infección por mecanismos dependientes de IFN γ ⁷⁵. Esta situación también se produce en el modelo animal de hepatitis inducida por concavalina A¹⁴⁸ y en un modelo murino de infección por virus influenza²³. En otro modelo de infección pulmonar murina por virus influenza se ha demostrado como los linfocitos T citotóxicos virus específicos que presentaban las

correctas propiedades efectoras y migratorias eran capaces de controlar la infección sin provocar daño hístico, mientras que sí la respuesta citotóxica no era adecuada no se controlaba la infección y se producía un masivo infiltrado mononuclear pulmonar¹¹³. Estos trabajos sugieren que el daño proviene de las células no antígeno específicas que infiltran el órgano infectado en ausencia de control del patógeno. En la infección crónica por VHC en el hombre se ha observado, mediante el estudio con complejos tetraméricos contra varios epítodos, que la mayoría de los linfocitos CD8 intrahepáticos no son antígeno específicos como ocurría en los modelos murinos anteriores. Es por tanto probable que lo mismo ocurra en la hepatitis crónica B, es decir, en ausencia de control viral por los LTC VHB específicos se generará un infiltrado mononuclear por activación inespecífica que ocasionará el daño hepático, mientras que los sujetos con una respuesta adecuada citotóxica no desarrollarán este daño.

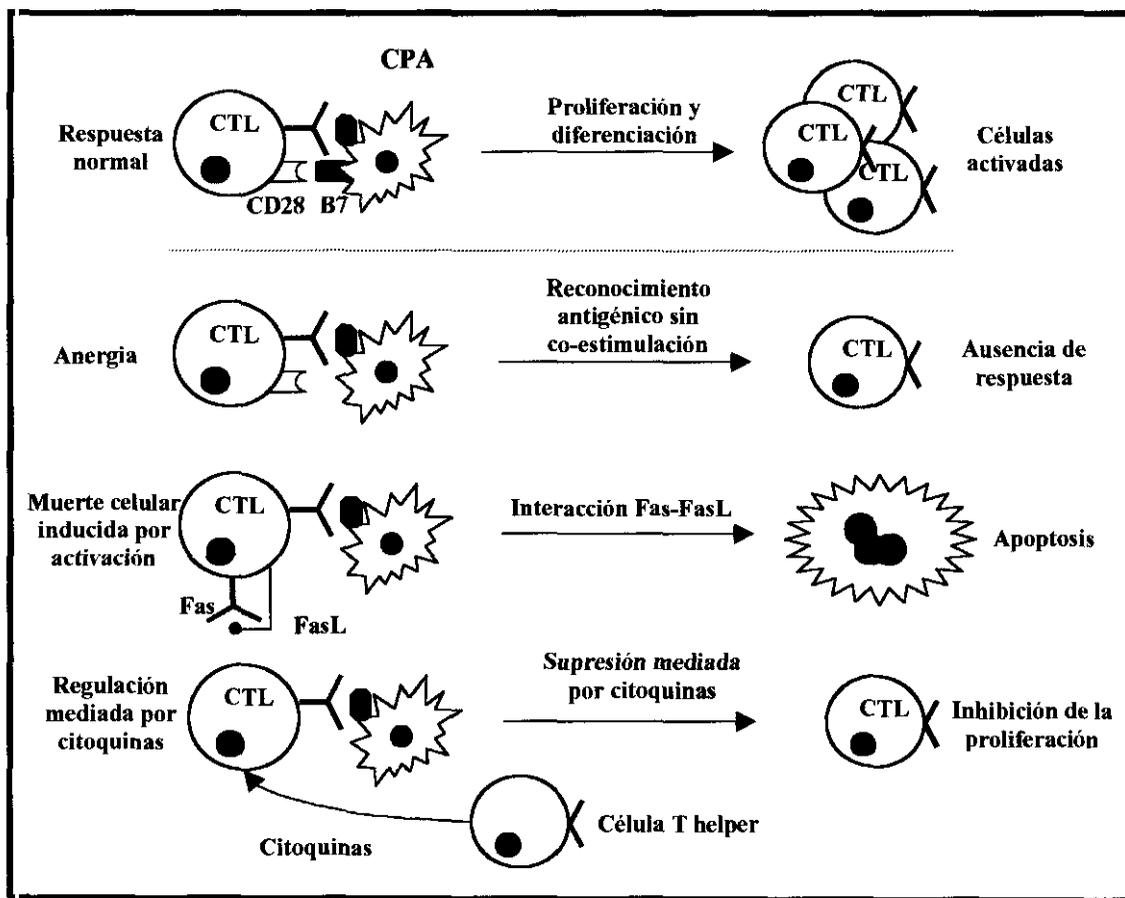


Fig. VI.1 - Diferentes respuestas de las células CD8 "naïve" tras reconocimiento del antígeno.

Además, recientes descubrimientos demuestran que las células CD8 VHB específicas son capaces de controlar la replicación viral por mecanismos no citolíticos¹³⁹. En los últimos años varios grupos han demostrado que cuando los virus infectan células hepáticas es más probable que el control viral se ejerza mediante inactivación intracelular mediada por citoquinas que a través de la destrucción de la célula infectada. Guidotti et al. han estudiado este mecanismo profundamente y han descrito que la replicación es abolida completamente mediante citoquinas tipo I en los hepatocitos de ratones transgénicos que expresan el VHB^{7,8}. Estas citoquinas son capaces de degradar completamente el genoma del virus B y aclarar la infección sin necesidad de destruir la célula infectada. Este método no citopático de aclaramiento viral no es particular del VHB. El control de la infección hepática por CMV¹⁴⁹ o por listeria monocitogenes¹⁵⁰ parece estar sobre todo mediado por IFN γ más que por vías dependientes de perforina. Guidotti et al. han demostrado que el LCMV es aclarado también de los hepatocitos por mecanismos no citolíticos que no son operativos en otras células⁷³. Todos estos trabajos sugieren que el control de los hepatocitos infectados no requiere una lisis masiva y quizás constituye una estrategia para preservar la integridad funcional hepática.

Recientemente se ha demostrado que durante la infección aguda por VHB en chimpancés, el aclaramiento del virus ocurre antes de que aparezca el pico de transaminemia e infiltración hepática. Este trabajo sugiere que la inactivación intracelular del VHB inducida por los LTC VHB específicos puede ser el mecanismo de control viral predominante en este modelo relacionado con el hombre⁷⁴. No obstante, se debe recordar que la lisis de hepatocitos vía Fas o perforina está claramente

demostrada¹⁵¹. Por tanto, cierto grado de apoptosis y consecuente regeneración de hepatocitos debe ocurrir. Esto se ha demostrado en la infección aguda y crónica por VHW en la marmota, en la que se observa la presencia de lisis durante el control de los hepatocitos infectados¹⁵².

En resumen, los datos de este trabajo muestran una correlación negativa de la frecuencia y capacidad de expansión de los LTC core 18-27 específicos en sangre periférica con la cifra de transaminasemia, que junto a los recientes descubrimientos sobre los mecanismos no citolíticos de control viral sugieren que es posible un control de la infección por las células CD8 VHB específicas sin producción de daño hepático.

Desde un punto de vista práctico, la información obtenida con este estudio nos invita a pensar que la restauración de la respuesta celular citotóxica VHB específica en los pacientes con hepatitis crónica e+ a los mismos niveles que aparece en los sujetos inmunes o portadores sanos, podría ayudar al control de la infección en estos casos. Si suponemos que la elevada antigenemia/carga viral puede provocar la anergia y/o delección de los LTC VHB específicos en la hepatitis crónica B, como ocurre en los modelos murinos previamente comentados^{36,35}, una posible estrategia para controlar la infección podría ser el uso de fármacos anti-virales que reduzcan la carga viral para permitir la recuperación de esta respuesta. En este sentido, el tratamiento con lamivudina ha demostrado ser capaz de disminuir la carga viral hasta valores prácticamente indetectables con técnicas de hibridación, aunque no consigue eliminar el cccDNA¹⁵³. El papel de este fármaco sobre la respuesta T helper VHB específica ha sido recientemente estudiado. Se ha observado que la lamivudina induce un incremento de esta respuesta, aunque esta situación no favoreció la seroconversión en la mayoría de

los casos¹⁵⁴. Es importante investigar en el futuro si este análogo de la deoxicitosina ejerce el mismo efecto sobre la respuesta celular citotóxica antígeno específica. Es posible que la reducción de la carga viral permita la recuperación de las células CD8 VHB específicas o la aparición de nuevos precursores a partir del compartimento tímico, como ocurre durante la terapia intensiva antiretroviral en la infección por VIH^{155,156}.

Otra interesante estrategia para restaurar la respuesta CD8 VHB específica puede ser la administración de vacunas, que induzcan una vigorosa respuesta celular citotóxica aprovechando el descenso de la viremia provocado por drogas que reduzcan la carga viral. Recientemente se han publicado los resultados de un estudio piloto con una vacuna basada en el epítipo core 18-27 que es capaz de incrementar la respuesta CD8 core 18-27 específica¹⁵⁷ aunque sin un efecto positivo sobre la seroconversión. No obstante, se necesitan más estudios para comprobar si estos esperanzadores hallazgos pueden convertir a estas estrategias terapéuticas en alternativas al interferón alfa. Es indudable que la utilización de los complejos tetraméricos HLA-I/péptido para cuantificar las células CD8 VHB específicas permitirá de forma sencilla valorar el efecto de estos tratamientos sobre la respuesta celular citotóxica.

En conclusión, la cuantificación de las células CD8 core 18-27 específicas del compartimento periférico, en pacientes con infección crónica por VHB con distinto control viral y diferente daño hepático, ha aportado nuevas perspectivas al conocimiento de la patogénesis de la infección por VHB. Los datos de este trabajo señalan que los sujetos con control del VHB muestran una activa respuesta citotóxica específica que no se observa en los pacientes con elevada carga viral. Además, se sugiere que los

linfocitos CD8 VHB específicos pueden controlar la infección sin generar lesión hepática. Estos resultados deben alentarnos a la búsqueda de tácticas que permitan restaurar esta respuesta en pacientes sin control de la infección.

VII. CONCLUSIONES.

1. La tinción de las células CD8⁺ de sangre periférica con complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27 en sujetos HLA-A2⁺ con infección persistente por VHB es una técnica válida para estudiar las células CD8⁺ VHB específicas.
2. Utilizando esta técnica es posible detectar un reservorio de linfocitos CD8 VHB específicos en sangre periférica de pacientes HLA-A2⁺ con infección persistente por VHB.
3. Este reservorio se detecta más frecuentemente en sujetos capaces de controlar la infección que en pacientes con elevada viremia y daño hepático.
4. No obstante, la frecuencia de células CD8⁺ core 18-27 específicas en sangre periférica de sujetos con infección persistente por VHB, independientemente de su situación clínica, es muy baja (inferior al 0.05% de la población de linfocitos CD8).
5. La capacidad de expansión clonal de las células CD8 VHB específicas tras entrar en contacto con los epítomos virales está presente en sujetos con infección persistente

por VHB que controlan la viremia, mientras que esta habilidad está ausente en la mayoría de pacientes con hepatitis crónica por VHB AgHBe+.

6. La distinta capacidad para elaborar una respuesta celular citotóxica VHB específica entre sujetos portadores sanos del VHB y pacientes con hepatitis crónica, puede ser un factor determinante en la diferente habilidad para controlar la infección que muestran ambos grupos de pacientes.
7. El desarrollo de una respuesta citotóxica VHB específica adecuada puede lograr el control viral sin producción de daño hepático.

VIII. PUBLICACIONES GENERADAS.

Los datos de esta tesis doctoral están publicados parcialmente en los artículos referenciados a continuación:

- M. Maini, C. Boni, G. Ogg, A. King, S. Reignat, C. K. Lee, **J. R. Larrubia**, G. Webster, A. McMichael, C. Ferrari, R. Williams, D. Vergani, A. Bertoletti. Direct ex-vivo analysis of hepatitis B virus specific CD8+ T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999; 117; 1386-1396.
- M. Maini, C. Boni, C. K. Lee, **J. R. Larrubia**, S. Reignat, G. S. Ogg, J. Herberg, R. Gilson, A. Alisa, R. Williams, D. Vergani, N. Naoumov, C. Ferrari, A. Bertoletti. The role of virus-specific CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191; 1269-1280.

IX. APÉNDICES.

IX.1 Abreviaturas utilizadas.

Ac anti HBc: anticuerpos contra el antígeno HBc.

Ac anti HBe: anticuerpos contra el antígeno HBe.

Ac anti HBs: anticuerpos contra el antígeno HBs.

Ag HBe: antígeno e del virus B.

Ag HBs: antígeno s del virus B.

ALT: alanina amino-transaminasa.

AST: aspartato amino-transaminasa.

cccDNA: DNA circular cerrado covalentemente.

CDR: región complementaria determinante.

Core 18-27: epítipo core 18-27 del VHB.

CMV: citomegalovirus.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

DAG: diacil-glicerol.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNA VHB: carga viral del VHB.

VEB: virus de Epstein Barr.

FasL: Fas-ligando.

Fc: fracción constante de la inmunoglobulina.

FLPSDFFPSV: fenilalanina-leucina-prolina-serina-aspartato-fenilalanina-fenilalanina-prolina-serina-valina.

Gag 75-85: epítipo gag 75-85 del VIH.

HCB_e+: hepatitis crónica B AgHBe+.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

HTLV-1: virus de la leucemia T humana I.

HLA: complejo mayor de histocompatibilidad humana.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleuquina.

IFN: interferón.

IP₃: inositol tri-fosfato.

ITAM: motivo de activación basado en tirosina.

LTC: linfocitos T citotóxicos.

LCMV: virus de la linfocoriomeningitis murina.

LDA: ensayo de dilución límite.

PBM: proteína básica de la mielina.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Pol 575-583: epítipo polimerasa 575-583 del VHB.

PTK: protein tirosin kinasa.

PS: portador sano.

RER: retículo endoplasmático rugoso.

RNA: ácido ribonucleico.

STF: suero de ternera fetal.

TAP: transportador asociado con el procesado del antígeno.

Tc 18-27: complejo tetramérico HLA-A2/core 18-27.

TCR: receptor de la célula T.

Th: linfocito T helper.

TNF: factor de necrosis tumoral.

VHB: virus de la hepatitis B.

VHC: virus de la hepatitis C.

VHD: virus de la hepatitis D.

ZAP: proteína asociada Z.

WHV: virus de la hepatitis de la *marmota monax*.

IX.2 Índice de gráficos.

	Página
1. Figura II.1: Esquema de la respuesta inmune	12
2. Figura II.2: Esquema de la interacción HLA-I / péptido-TCR.....	16
3. Figura II.3: Genoma del virus B	18
4. Figura II.4: Ciclo replicativo del virus B.....	20
5. Figura II.5: Esquema del complejo HLA-A2 / core 18-27.....	36
6. Figura II.6: Esquema de la tinción de células VHB específicas con complejos tetraméricos	41
7. Figura II.7: Tinción inmunohistoquímica de los linfocitos CD8+ intrahepáticos en un paciente con hepatitis crónica e+ y en sujeto portador sano	46
7. Figura II.8: Cinética viral y celular citotóxica según un modelo matemático	50
8. Figura IV.1: Histograma de la tinción para conocer el tipaje HLA-A2.....	66

9. Figura IV.2:	Esquema del complejo tetramérico HLA-A2 / core 18-27	67
10. Figura IV.3:	Esquema de los programas de las PCR utilizados para la amplificación del gen core 18-27	73
11. Figura V.1:	Gráfico de puntos de la tinción con complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27 de un clon de células CD8 core 18-27 específico y otro pol 575-583 específico	83
12. Figura V.2:	Gráfico de puntos de la tinción con complejos tetraméricos HLA-A2/core 18-27 de líneas celulares estimuladas con el péptido core 18-27 ó con gag 75-85	83
13. Figura V.3:	Frecuencia de las células CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica en los distintos grupos.....	90
14. Figura V.4:	Intervalo de confianza al 95% de la variable frecuencia de células CD8+/Tc18-27+.....	91
15. Figura V.5:	Diagrama de barras de la proporción de sujetos con una frecuencia de células CD8+/Tc18-27 superior al punto de corte de la técnica	93
16. Figura V.6:	Gráfico de puntos del resultado del análisis mediante citometría de flujo de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en un sujeto representativo de cada grupo....	94
17. Figura V.7:	Diagrama de barras de la proporción de sujetos con expansión de una población de células CD8+/Tc18-27+ tras estimulación <i>in-vitro</i> con el péptido core 18-27.....	97
18. Figura V.8:	Gráfico de puntos del resultado del análisis mediante citometría de flujo de la estimulación <i>in-vitro</i> con el péptido core 18-27 de las CMSP de un sujeto de cada grupo	99

19. Figura V.9: Diagrama de puntos. Correlación de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica con la transaminemia y con la carga viral.....	101
20. Figura V.10: Histograma de la distribución de la variable edad.....	104
21. Figura V.11: Gráfico de barras de la distribución de la variable sexo	105
22. Figura V.12: Gráfico de barras de la distribución de la variable raza.....	105
23. Figura V.13: Gráfico de barras de la distribución de la variable ruta de contagio	106
24. Figura V.14: Gráfico de cajas de la distribución de la variable ALT	106
25. Figura V.15: Gráfico de cajas de la distribución de la variable AST	107
26. Figura V.16: Gráfico de cajas de la distribución de la variable bilirrubina sérica	107
27. Figura V.17: Gráfico de cajas de la distribución de la variable frecuencia de linfocitos CD8+ en sangre periférica.....	108
28. Figura VI.1: Esquema de diferentes posibles efectos de la estimulación antigénica de los linfocitos CD8+ “naïve”	117

IX.3 Índice de tablas.

	Página
1. Tabla II.1: Características de las distintas fases de la infección por VHB	46
2. Tabla IV.1: Medios y soluciones utilizadas en los experimentos	74
3. Tabla V.1: Análisis de la normalidad de la variable frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ y de su transformación logarítmica	88
4. Tabla V.2: Razón de odds de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ entre los distintos grupos.....	89

5. Tabla V.3:	Intervalo de confianza al 95% de la media de la variable frecuencia de células CD8+/Tc18-27+	89
6. Tabla V.4:	Distribución de la proporción de sujetos con una frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica superior al punto de corte de la técnica	92
7. Tabla V.5:	Intervalo de confianza al 95% de la diferencia y de la razón de odds de la comparación inter-grupos de la proporción de sujetos con una frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ superior al punto de corte de la técnica.....	93
8. Tabla V.6:	Distribución de la frecuencia de la variable expansión de las células CD8+/Tc18-27+ tras estimulación <i>in-vitro</i> con el péptido core 18-27	96
9. Tabla V.7:	Comparación inter-grupos de la frecuencia de sujetos con expansión de las células CD8+/Tc18-27+ tras estimulación <i>in-vitro</i> con el péptido core 18-27	96
10. Tabla V.8:	Coeficientes de correlación de Spearman de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ en sangre periférica con la transaminemia y la carga viral.....	100
11. Tabla V.9:	Tabla descriptiva de las variables demográficas y clínicas del estudio en los distintos grupos.....	103
12. Tabla V.10:	Estimación poblacional de las variables demográfica más importantes en los sujetos del estudio antígeno HBs+	104
13. Tabla V.11:	Análisis de regresión lineal múltiple. Control de la confusión e interacción. Razón de odds de la frecuencia de células CD8+/Tc18-27+ de los grupos con AgHBs+ respecto al	

grupo control de referencia (sujetos inmunes) 109

14. Tabla V.12: Análisis de regresión logística. Control de la confusión e interacción. Razón de odds de la capacidad de expansión de las células CD8+/Tc18-27+ de los grupos con AgHBs+ respecto al grupo control de referencia (sujetos inmunes)..... 111

IX.4 Financiación del proyecto.

El trabajo fue financiado parcialmente mediante:

- Beca del Comité de Desarrollo e Investigación Clínica del University College London. Investigador principal: Dr. Antonio Bertoletti.
- Beca de Proyecto de Investigación de la Wellcome Trust. Investigador principal: Dr. Antonio Bertoletti.

El doctorando fue respaldado por el Ministerio de Sanidad y Consumo:

- Beca de Formación en Investigación (BEFI 98/9155) del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III.

X. REFERENCIAS.

¹ R. H. Purcell. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 1993; 104: 955-63.

² V.D. Marco, O. L. Iacono, C. Cammá, A. Vaccaro, M. Giunta, G. Martorana, P. Fuschi, P. L. Almasio, A. Craxi. The long term course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; 30: 257-264.

³ F. E. De Jongh, H. L. Janssen, R. A. De Man, W. C. Hop, S. W. Schalm, M. Van Blankestein. Survival and prognostic indicators in hepatitis B surface antigen-positive cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1992; 103: 1630-1635.

⁴ G. Fattovich, G. Giustina, S. W. Schalm, S. Hadziyannis, J. Sanchez-Tapias, P. Almasio, E. Christensen. Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in Western European patients with cirrhosis type B. *Hepatology* 1995; 21: 77-82.

⁵ W. M. Lee. Hepatitis B virus infection. *N Eng J Med* 1997; 337 (24): 1733- 1745.

⁶ R. N Germain. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76: 287-299.

⁷ L. G. Guidotti, T. Ishikawa, M. V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, F. V. Chisari. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25-36.

⁸ L. G. Guidotti, K. Ando, M. V. Hobbs, T. Ishikawa, L. Runkel, R. D. Schreiber, F. V. Chisari. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3764-3768.

⁹ R. M. Zinkernagel. Immunology taught by viruses. *Science* 1996; 271: 173-178.

¹⁰ D. T. Fearon, R. M. Locksley. The instructive role of innate immunity in acquired immune response. *Science* 1996; 272: 50-3.

¹¹ J. Bancherau, R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.

¹² D. R. Burton. Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends Biochem Sci* 1990; 15; 64-9.

¹³ F. Shakib (ed). The human IgG subclasses. Molecular analysis of structure, function and regulation. Oxford: Pergamon Press 1990.

¹⁴ B. J. Underdow, J. M. Schiff. Immunoglobulin A: strategic defence initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* 1986; 4: 389-417.

¹⁵ D. B. Williams, A. Vassilakos, W. K. Suh. Peptide presentation by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol* 1996; 14: 369-96.

¹⁶ I. A. York, K. L. Rock. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 369-96.

¹⁷ S. Romagnani. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18: 263-266.

¹⁸ S. Romagnani. Cytokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227-57.

¹⁹ S. L. Waldrop, K. A. Davis, V. C. Maino, L. J. Picker. Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol* 1998; 161: 5284-5295.

²⁰ D. Kägi, B. Ledermann, K. Bürki, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 207-32.

²¹ D. Kägi, F. Vignaux, B. Ledermann, K. Bürki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, P. Golstein. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265: 528-30.

²² C. M. Rooney, C. A. Smith, C. Y. C. Ng, S. Loftin, C. Li, R. A. Krance, M. K. Brenner, H. E. Heslop. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-13.

²³ D. Moskophidis, D. Kioussis. Contribution of virus-specific CD8⁺ cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model. *J Exp Med* 1998; 188: 223-232.

²⁴ K. Murali-Krishna, J. D. Altman, M. Suresh, D. J.D. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, R. Ahmed. Counting antigen-specific CD8 T cells: a re-evaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998; 8: 177-187.

²⁵ D. K. Wong, D. D. Dudley, N. H. Afdhal, J. Dienstag, C. M. Rice, L. Wang, M. Houghton, B.D. Walker, M. J. Koziel. Liver-derived CTL in hepatitis C virus infection: breadth and specificity of responses in a cohort of persons with chronic infection. *J Immunol* 1998; 160: 1479-1488.

²⁶ B. Rehermann, J. Person, A. Redeker, P. Fowler, M. Brown, A. Sette, B. Moss, F. V. Chisari. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes persists after recovery from acute hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 1995; 181: 1047-1058.

²⁷ R. A. Warnock, S. Askori, E. C. Butcher, U. H von Andrian. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1998; 187: 205-216.

²⁸ S. T. Ju, D. J. Ponka, H. Cui, R. Ettinga, M. El-Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanga, A. Morshak-Rothstein. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373: 345-347.

²⁹ G. A. Smith. Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends Microbiol* 1994; 2; 81-88.

³⁰ U. Protzer-Knolle, U. Naumann, R. Bartenschlager, T. Berg, U. Hopf, K. H. Meyer zum Buschenfelde, P. Neuhaus, G. Gerken. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 254-63.

³¹ J. Kato, K. Hasegawa, N. Torii, K. Yamauchi, N. Hayashi. A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 1996; 23: 389-95.

³² M. G. Masucci, Q. J. Zhang, R. Gavioli, P. O. De Campos-Lima, R. J. Murray, J. Brooks, H. Griffin, H. Ploegh, A. B. Rickinson. Immune escape by Epstein-Barr virus carrying Burkitt's lymphoma: in vitro reconstitution of sensitivity to VEB-specific cytotoxic T cells. *Int Immunol* 1992; 4: 1283-92.

³³ R. Rotem-Yehudar, S. Winograd, S. Sela, J. E. Coligan, R. Ehrlich. Downregulation of peptide transporter genes in cell lines transformed with the highly oncogenic adenovirus 12. *J. Exp Med* 1994; 180: 477-88.

-
- ³⁴ R. H. Schwartz. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 351-57.
- ³⁵ A. J. Zajac, J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. D. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman, R. Ahmed. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998; 12: 2205-2213.
- ³⁶ A. Gallimore, A. Glithero, A. Godkin, A. C. Tissot, A. Plucktun, T. Elliot, H. Hengartner, R. Zirkernagel. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility class I-peptide coomplexes. *J Exp Med* 1998; 187: 1383-1393.
- ³⁷ C. Tanchot, S. Guillaume, J. Delon, C. Bourgeois, A. Franzke, A. Sarukhan, A. Trautmann, B. Rocha. Modifications of CD8 T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 1998; 8: 581-590.
- ³⁸ R. de Waal Malefyt, J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, J. E. de Vries. Interleukin 10 and viral interleukin 10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915-24.
- ³⁹ G. A. Bentley, R. A. Mariuzza. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 563-90.

⁴⁰ K. C. Garcia, M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P.A. Peterson, L. Teyton, I. A. Wilson. An $\alpha\beta$ T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 1996; 274: 209-19.

⁴¹ A. C. Chan, A. S. Shaw. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 394-401.

⁴² A. Weiss, D. R. Littman. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994; 76: 263-274.

⁴³ S. Valitutti, A. Lanzavecchia. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol Today* 1997; 6: 299-304.

⁴⁴ C. A. Janeway, K. Bottomly. Signal and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994; 76: 275-285.

⁴⁵ D. R. Madden, D. N. Garboczi, D. C. Wiley. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 1993; 75: 693-708.

⁴⁶ A. S. Shaw, M. L. Dustin. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 1997; 6: 361-69.

⁴⁷ T. M. Kundig, A. Shahinian, K. Kawai, H. W. Mittrucker, E. Sebzda, M. F. Bachmann, T. W. Mak, P. S. Ohashi. Duration of TCR stimulation determinates costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 1996; 5: 41-52.

⁴⁸ A. Bertoletti, A. Sette, F. V. Chisari, A. Penna, M. Levrero, M. De Carli, F. Fiaccadori, C. Ferrari. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994; 369: 407-410.

⁴⁹ F. V. Chisari, C. Ferrari, M. U. Mondelli. Hepatitis B virus structure and biology. *Microb Pathog* 1989; 6: 311-325.

⁵⁰ J. Y. Nau, T. L. Wright. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-1339.

⁵¹ Z. J. Gong, S. De Meyer, J. van Pelt, K. Hertogs, E. Depla, A. Soumillion, J. Feverej, S. H. Yap. Transfection of rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 576-84.

⁵² H. S. Chen, M. C. Kew, W. E. Hornbuckle, B. C. Tennant, P. J. Cote, J. L. Gerin, R. H. Purcell, R. H. Miller. The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J Virol* 1992; 66: 5682-5684.

⁵³ K. Okada, I. Kamiyama, M. Imomata, M. Imai, Y. Miyakawa, M. Majumi. E antigen and anti e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and

negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Engl J Med* 1976; 294: 946-949.

⁵⁴ F. V. Chisari, C. Ferrari. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.

⁵⁵ P. N. Gilles, D. L. Guerrete, R. J. Ulevitch, R. D. Schreiber, F. V. Chisari. Hepatitis B surface antigen retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiologic concentration of gamma interferon. *Hepatology* 1992; 16: 655-663.

⁵⁶ W. H. Gerlich, X. Lu, K. H. Heermann. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J Hepatol* 1993; 17: S10-S14.

⁵⁷ K. Hertogs, W. P. Leenders, E. Depla, W. C. De Bruin, L. Meheus, J. Raymackers, H. Moshage, S. H. Yap. Endotoxin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus envelope protein. *Virology* 1993; 197: 549-57.

⁵⁸ M. Höne, S. Schaefer, M. Seifer, M.A. Feitelson, D. Paul, W. H. Gerlich. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J* 1990; 9:1137-1145.

⁵⁹ K. Koike, K. Moriya, S. Iino, H. Yotsuyanagi, Y. Endo, T. Miyamura, K. Hurokawa. High level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994; 19: 810-819.

⁶⁰ N. Schek, R. Bartenschlager, C. Kuhn, H. Schaller. Phosphorylation and rapid turnover of hepatitis B virus X-protein expressed in HepG2 cells from a recombinant vaccinia virus. *Oncogene* 1991; 6: 1735-1744.

⁶¹ M. C. Jung, M. Stemler, T. Weimer, U. Spengler, J. Dohrmann, R. Hoffmann, D. Eichenlaub, J. Eisenburg, G. Paumgartner, G. Reitmuller, H. Will, G. R. Pape. Immune response of peripheral blood mononuclear cells to HBx antigen of hepatitis B virus. *Hepatology* 1990; 13: 637-643.

⁶² K-Q. Hu, C. H. Yu, J. M. Vierling. Up-regulation of intracellular adhesion molecule-I transcription by hepatitis B virus X protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11441-11445.

⁶³ N. Yuki, N. Hayashi, A. Kasahara, K. Katayama, K. Ubeda, H. Fusamoto, T. Kamada. Detection of antibodies against the polymerase gene product in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1990; 12: 193-198.

⁶⁴ G. R. Foster, A. M. Ackrill, R. D. Goldin, I. M. Kerr, H. C. Thomas, G. R. Stark. Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferons alpha and gamma and double stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2888-2892.

-
- ⁶⁵ L. Moretta, E. Ciccione, M. C. Mingari, R. Biassoni, A. Moretta. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity and regulation. *Adv Immunol* 1994; 55: 341-380.
- ⁶⁶ R. Koshy, W.H. Caselman (Eds.). *Hepatitis B virus molecular mechanisms in disease and novel strategies for therapy*. Imperial College Press, London 1998: 111-132.
- ⁶⁷ D. R. Milich, A. McLachlan. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell independent and T cell dependent antigen. *Science* 1986; 234: 1398-1401.
- ⁶⁸ T. Weimer, F. Schödel, M. C. Jung, G. R. Pape, A. Alberti, G. Fattovich, H. Beljaars, P. M. C. Eerd, H. Will. Antibodies to the Rnase H domain of hepatitis B virus P protein are associated with ongoing viral replication. *J Virol* 1990; 64: 5665-5668.
- ⁶⁹ S. Vento, E. G. Rondanelli, S. Ranieri, C. J. O'Brien, R. Williams, A. L. Eddelston. *Prospective study of cellular immunity to hepatitis B virus antigens from the early incubation phase of acute hepatitis B*. *Lancet* 1987; 2: 119-122.
- ⁷⁰ D. R. Milich, A. McLachlan, G. B. Thorton, J. L. Hughes. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 1987; 329: 547-549.
- ⁷¹ S. L. Tsai, P. J. Chen, M. Y. Lai, P. M. Yang, J. L. Sung, J. H. Huang, L. H. Hwang, T. H. Chang, D. S. Chen. Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are

accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens?. Implications for hepatitis B e antigen seroconversion. *J Clin Invest* 1992; 89: 87-96.

⁷² K. Ando, L. G. Guidotti, S. Wirth, T. Ishkawa, G. Missale, T. Moriyama, R. D. Schreiber, H-J. Schlicht, S. Huang, F. V. Chisari. Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol* 1994; 152: 3245-3253.

⁷³ L. G. Guidotti, P. Borrow, A. Brown, H. McClary, R. Koch, F. V. Chisari. Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from hepatocyte. *J Exp Med* 1999; 189: 1555-1564.

⁷⁴ L. G. Guidotti, R. Rochford, J. Chung, M. Shapiro, R. Purcell, F. V. Chisari. Viral clearance without destruction of infected cells during acute VHB infection. *Science* 1999; 284: 825-829.

⁷⁵ K. Ando, T. Moriyama, L. G. Guidotti, S. Wirth, R. D. Schreiber, H. J. Schlicht, S. Huang, F. V. Chisari. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993; 178: 1541.

⁷⁶ A. Penna, M. Artini, A. Cavalli, M. Levrero, A. Bertolotti, M. Pilli, F. V. Chisari, B. Rehermann, G. Del Prete, F. Fiaccadori, C. Ferrari. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996; 98: 1185-1194.

⁷⁷ B. Rehermann, C. Ferrari, C. Pasquinelli, F. Chisari. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996; 2: 1104-1108.

⁷⁸ C. S. Coffin, T. I. Michalak. Persistence of infectious hepadnavirus in the offspring of woodchuck mothers recovered from viral hepatitis. *J Clin Invest* 1999; 104: 203-212.

⁷⁹ O. Chazouilleres D. Mamish, M. Kim, K. Carey, L. Ferrel, J. Roberts, N. Acsher. Occult hepatitis B virus as a source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994; 343: 142-146.

⁸⁰ A. Bertoletti, C. Ferrarai, F. Ficcadori, A. Penna, R. Margolskee, H. J. Schlicht, P. Fowler, S. Guilhot, F. V. Chisari. HLA-class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 10445-10499.

⁸¹ G. Missale, A. Redeker, J. Person, P. Fowler, S. Guilhot, H-J Schlicht, C. Ferrari, F. V. Chisari. HLA-A31 and HLA-Aw68 restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1993; 177: 751-762.

⁸² R. Nayersina, P. Fowler, S. Guilhot, G. Missale, A. Cerny, H-J. Schlicht, A. Vitello, R. Chesnut, J. L. Person, A. G. Redeker, F. V. Chisari. HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1993; 150: 4659-4671.

⁸³ B. Rehermann, D. Lau, J. H. Hoofnagle, F. V. Chisari. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1996; 97: 1655-1665.

⁸⁴ C. Ferrari, A. Penna, T. Giuberti, M. J. Tong, E. Ribera, F. Ficcadori, F. V. Chisari. Intrahepatic, nucleocapsid antigen-specific T cells in chronic active hepatitis B. *J Immunol* 1987; 139: 2050-58.

⁸⁵ D. R. Milich, J. E. Jones, J. L. Hughes, J. Price, A. K. Raney, A. McLachlan. 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.

⁸⁶ D. R. Milich, K. C. Margaret, J. L. Hughes, J. E. Jones. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998; 160: 2013-2021.

⁸⁷ P. R. Galle, W. J. Hofmann, H. Walczak, H. Schaller, G. Otto, W. Stremmel, P. H. Krammer, L. Runkell. Involvement of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182: 1223-30.

⁸⁸ B. Rehermann, C. Pasquinelli, S. M. Moisiere, F. V. Chisari. Hepatitis B (VHB) sequence variation in cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic VHB infection. *J Clin Invest* 1995; 96: 1527-1534.

-
- ⁸⁹ A. Bertolotti, A. Costanzo, F. V. Chisari, M. Levrero, M. Artini, A. Sette, A. Penna, T. Giuberti, F. Ficadori, C. Ferrari. Cytotoxic T lymphocyte response to a silvestre hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med* 1994; 180: 933-943.
- ⁹⁰ P. P. Scaglioni, M. Melegari, J. R. Wands. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J Virol* 1997; 71: 345-353.
- ⁹¹ L. G. Guidotti, B. Matzke, C. Pasquinelli, J. M. Shoenberger, C. Rogler, F. V. Chisari. The hepatitis B virus (VHB) precore protein inhibits VHB replication in transgenic mice. *J Virol* 1996; 70: 7056-7061.
- ⁹² A. Penna, F. Chisari, A. Bertolotti, G. Missale, P. Fowler, T. Giuberti, F. Ficcardori, C. Ferrari. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2 restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174: 1565-1570.
- ⁹³ A. Bertolotti, F. V. Chisari, A. Penna, S. Guilhot, L. Galati, G. Missale, P. Fowler, H. J. Schlicht, A. Vitello, R. C. Chesnut, F. Ficadori, C. Ferrari. Definition of a minimal optimal cytotoxic T cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J Virol* 1993; 67: 2376-2380.
- ⁹⁴ A. Bertolotti, S. Southwood, R. Chesnut, A. Sette, M. Falco, G. B. Ferrara, A. Penna, C. Boni, F. Ficcardori, C. Ferrari. Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 18-27: interaction with HLA and T receptor. *Hepatology* 1997; 26: 1027-1034.

⁹⁵ J. Ruppert, J. Sidney, E. Celis, R. T. Kubo, H. M. Grey, A. Sette. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 1993; 74: 929-937.

⁹⁶ M. F. Del Guercio, J. Sidney, G. Hermanson, C. Perez, H. M. Grey, R. T. Kubo, A. Sette. Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype. *J Immunol* 1995; 154: 685-693.

⁹⁷ A. Sette, A. Vitiello, B. Rehman, P. Fowler, R. Nayarsina, W. Martin Kast, C. J. M. Melief, C. Oseroff, L. Yuan, J. Ruppert, J. Sidney, M-F. del Guercio, S. Southwood, R. T. Kubo, R. W. Chesnut, H. M. Grey, F. Chisari. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 1994; 153: 5586-5592.

⁹⁸ B. D. Livingston, J. Alexander, C. Crimi, C. Oseroff, E. Celis, K. Daly, L. G. Guidotti, F. V. Chisari, J. Fikes, R. W. Chesnut, A. Sette. 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.

⁹⁹ A. Vitiello, G. Ishioka, H. M. Grey, R. Rose, P. Farness, R. La Fond, L. Yuan, F. V. Chisari, J. Furze, R. Bartholomeuz, R. W. Chesnut. Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic VHB infection. *J Clin Invest* 1995; 1; 351-349.

¹⁰⁰ M. Maini, C. Boni, G. Ogg, A. King, S. Reignat, C. Lee, J. Larrubia, G. Webster, A. McMichael, C. Ferrari, R. Williams, D. Vergani, A. Bertoletti. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus specific CD8+ T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999; 117: 1386-1396.

¹⁰¹ F. M. Gotch, D. F. Nixon, N. Alp, A. J. McMichael, L. K. Borysiewicz. High frequency of memory and effector gag specific cytotoxic T lymphocytes in VIH seropositive individuals. *Int Immunol* 1990; 2: 707-712.

¹⁰² P. A. H. Moss, S. L. Rowland-Jones, P. M. Frodsham, S. McAdam, P. Giangrande, A. J. McMichael, J. I. Bell. Persistent high frequency of human immunodeficiency virus specific T cells in peripheral blood of infected donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5773-5777.

¹⁰³ A. Lalvani, R. Brookes, S. Hambleton, W. J. Britton, A. V. S. Hill, A. J. McMichael. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med* 1997; 186: 859-865.

¹⁰⁴ E. A. Butz, M. J. Bevan. Massive expansion of antigen specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 1998; 8: 167-175.

¹⁰⁵ K. Matsui, J. J. Boniface, P. Steffner, P. A. Reay, M. M. Davis. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12862-12866.

¹⁰⁶ S. Valitutti, S. Muller, M. Cella, E. Padoven, A. Lanzavecchia. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995; 375: 148-151.

¹⁰⁷ J. D. Altaman, P.A.H. Moss, P.J. Goulder, D.H. Barouch , M.G. McHeyzer Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael, M.M. Davis. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274: 94-96.

¹⁰⁸ A. J. McMichael, C. A. O'Callaghan. A new look at T cells. *J Exp Med* 1998; 187: 1367-1371.

¹⁰⁹ G. Ogg, X. Jin, S. Bonhoeffer, P. Dunbar, M. Nowak, S. Monard, J. Segal, Y. Cao, S. Rowland-Jones, V. Cernudolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho, D. F. Nixon, A. J. McMichael. Quantification of VIH-1 specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; 279: 2103-2106.

¹¹⁰ P.P. Lee, Y. Cassian, P. A. Savage, L. Fong, D. Brockstedt, J. S. Weber, D. Johnson, S. Swetter, J. Thomportador sanoon, P. D. Greenberg, M. Roederer, M. Davis. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999; 5 (6): 677-684.

¹¹¹ P. Romero, P. R. Dunbar, D. Valmori, M. Pittet, G. S. Ogg, D. Rimoldi, J. Chen, D. Liénard, J-C. Cerottini, V. Cerundolo. *Ex-vivo* staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188: 1641-50.

-
- ¹¹² P. R. Dunbar, G. S. Ogg, J. Chen, N. Rust, P. van der Bruggen, V. Cernudolo. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr Biol* 1998; 8; 413-416.
- ¹¹³ A. Cerwenka, T. M. Morgan, A. G. Harmsen, R. W. Dutton. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. *J Exp Med* 1999; 189: 423.
- ¹¹⁴ A. Laras, J. Koskinas, K. Avgidis, S. J. Hadziyannis. Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e-antigen negative patients. *J Viral Hepat* 1998, 5: 241-8.
- ¹¹⁵ J. H. Hoofnagle, D. A. Schafritz, H. Popper. Chronic type B hepatitis and the "healthy" AgHBs carrier state. *Hepatology* 1987; 7: 758.
- ¹¹⁶ F. J. Dudley, R. A. Fox, S. Sherlock. Cellular immunity and hepatitis-associated australia antigen liver disease. *Lancet* 1972; 1:723-726.
- ¹¹⁷ S. Cooper, A. Erickson, E. Adams, J. Kansopon, A. Weiner, D. Chien, M. Houghton, P. Parham, C. Walker. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10: 439-449.
- ¹¹⁸ K. Jeffery, S. Usuku, S. Hall, W. Matsumoto, G. Taylor, J. Procter, M. Bunce, G. Ogg, K. Welsh, J. Weber, A. Lloyd, M. Nowak, M. Nagai, D. Kodama, S. Izumo, M. Osame, C. Bangham. HLA alleles determine T-lymphotropic virus I (HTLV I) proviral load and the risk of HTLV-I associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1999; 96:3348-3853.
- ¹¹⁹ S. Niewiesk, S. Daenke, C. E. Parker, G. Taylor, J. Weber, S. Nigthingale, C. R. Bangham. The transactivator gene of human T-cell leukemia virus type I is more variable within and between healthy carriers than patients with tropical spastic paraparesis. *J Virol* 1994; 68: 6778-6781.

¹²⁰ M. A. Nowak, C. R. M. Bangham. Population dynamics of immune responses to persistent viruses. *Science* 1996; 272: 74-79.

¹²¹ F. Bolumar, M. Delgado. *Diseño de investigaciones en ciencias de la salud*. Barcelona, Signo 1999; 2 (4): 43-54.

¹²² S. Terazawa, M. Kojima, T. Yamanka, S. Yotsumoto, H. Okamoto, F. Tsuda, Y. Miyakawa, M. Mayumi. Hepatitis B virus mutants with precore-region defects in two babies with fulminant hepatitis and their mothers positive for antibody to hepatitis B e antigen. *Pediatr Res* 1991; 29: 5-9.

¹²³ M. R. Brunetto, M. M. Giarin, , F. Oliveri, E. Chiaberge, M. Baldi, A. Alfarano, A. Serra, G. Saracco, G. Verme, H. Hill, F. Bonino. Silvestre and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4186-4190.

¹²⁴ A. S. F. Lok, C. L. Lai. A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. *Hepatology* 1988; 8: 1130-3.

¹²⁵ J. M. Domenech. *Métodos estadísticos en ciencias de la salud*. Barcelona, Signo 1998; Ud: 8 (5): 51-58.

¹²⁶ F. Bolumar, M. Delgado. *Diseño de investigaciones en ciencias de la salud*. Barcelona, Signo 1999; Ud:1 (2): 20-21.

¹²⁷ S. Sherlock, J. Dooley. Diseases of the liver and biliary system. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1993; 269-80.

¹²⁸ D. A. Hendricks, B. J. Stowe, B. S. Hoo, J. Kolberg, B. D. Irvine, P. D. Neuwald, M. S. Urdea, R. P. Perillo. Quantitation of DNA VHB in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 537-46.

¹²⁹ N. Naumov, M. Thomas, A. Mason, S. Chokshi, C. Bodicky, F. Farzaneh, R. Williams, R. Perrillo. Genomic variations in the hepatitis B virus core gene: a possible factor influencing response to interferon alfa treatment. *Gastroenterology* 1995; 108; 505-514.

¹³⁰ J. M. Domenech. Métodos estadísticos en ciencias de la salud. Barcelona, Signo 1998; Ud: 1-2.

¹³¹ J. M. Domenech. Métodos estadísticos en ciencias de la salud. Barcelona, Signo 1998; Ud: 10-11-12.

¹³² J. M. Domenech. Análisis multivariante: modelos de regresión. Barcelona, Signo 2000; Ud: 6 y 9.

¹³³ I. Cacciola, T. Pollicino, G. Squadrito, G. Cerenzia, M. E. Orlando, G. Raimondo. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Eng J Med* 1999; 341: 22-26.

¹³⁴ T. Michalak, S. Pasquinelli, S. Guilhot, F. Chisari. Hepatitis B virus persistence after recovery of acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994; 93: 230-239.

¹³⁵ H. Marusawa, S. Uemoto, M. Hijikata, Y. Ueda, K. Tanaka, K. Shimothono, T. Chiba. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000; 31: 488-495.

¹³⁶ L. Tan, N. Guggeon, N. Annels, P. Hansasuta, C. O'Callaghan, S. Rowland-Jones, A. McMichael, A. Rickinson, M. Callan. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for VEB in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999; 162: 1827-1835.

¹³⁷ C. Parker, S. Nightingale, G. Taylor, J. Weber, C. Bangham. Circulating anti-Tax cytotoxic T lymphocytes from human T-cell leukemia virus type I-infected people, with and without Tropical spastic parapresis, recognize multiple epitopes simultaneously. *J Virol* 1994; 68: 2860-2868.

¹³⁸ F. V. Chisari. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 99: 1472-1477.

¹³⁹ L. Guidotti, F. V. Chisari. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Op Immunol* 1996; 8: 478-483.

¹⁴⁰ B. Rehermann, P. Fowler, J. Sidney, P. Person, A. Redeker, M. Brown, B. Moss, A. Sette, F. V. Chisari. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus

polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1995; 181: 1047-1058.

¹⁴¹ V. Barnaba, A. Franco, B. Alberti, C. Balsano, R. Benavuto, F. Balsano. Recognition of hepatitis B envelope proteins by liver infiltrating T lymphocytes in chronic HBV infection. *J Immunol* 1989; 143: 2650-2655.

¹⁴² S. Pilyugin, J. Mittler, R. Antia. Modeling T-cell proliferation: an investigation of the consequence of the Hayflick limit. *J Theor Biol* 1997; 186: 117-129.

¹⁴³ L. Van Parijs, A. K. Abbas. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280: 243-248.

¹⁴⁴ D. S. Ucker, J. Meyers, P. S. Obermiller. Activation driven T cell death II. Quantitative differences alone distinguish stimuli triggering nontransformed T cell proliferation or death. *J Immunol* 1992; 149: 1583-1592.

¹⁴⁵ J. M. Critchfield, M. K. Racke, J. C. Zúñiga-Pflücker, B. Cannella, C. S. Raine, J. Goverman, M. J. Lenardo. T cell deletion in high dose antigen therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 263: 1139-1142.

¹⁴⁶ K. Nakamura, K. Yuh, S. Sugyo, H. Shijo, N. Kimura, M. Okumura. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1996; 111: 156-164.

¹⁴⁷ J. Westermann, R. Pabst. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system?. *Immunol Today* 1990; 11: 406-410.

¹⁴⁸ S. Kusters, F. Ganter, G. Kunstle, G. Tiegs. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concavalin A. *Gastroenterology* 1996; 111: 462-471.

¹⁴⁹ C. Tay, R. Welsh. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 1997; 71: 267-275.

¹⁵⁰ D. Kagi, B. Ledermann, H. Burki, H. Hengartner, R. Zinkernagel. CD8+ T-cell mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1994; 24: 3068-3072.

¹⁵¹ T. Kondo, T. Suda, H. Fukuyama, M. Adachi, S. Nagata. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 1997; 3: 409-413.

¹⁵² J. Guo, H. Zhou, C. Liu, C. Aldrich, J. Saputelli, T. Whitaker, M. I. Barrasa, W. Mason, C. Seeger. Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J Virol* 2000; 74: 1495-1505.

¹⁵³ C. L. Lai, R. N. Chien, N. W. Y. Leung, T. T. Chang, R. Guan, D. I. Tai, K. Y. Ng, P. C. Wu, J. C. Dent, J. Barber, S. L. Stephenson, D. F. Gray. A one year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Eng J Med* 1998; 339: 61-68.

¹⁵⁴ C. Boni, A. Bertoletti, A. Penna, A. Cavalli, M. Pilli, S. Urbani, P. Scognamiglio, R. Boehme, R. Panebianco, F. Ficcadori, C. Ferrari. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998; 102: 968-975.

¹⁵⁵ D. C. Douek, R. D. McFarland, P. H. Keiser, E. A. Gage, J. M. Massey, B. F. Haynes, M. A. Polis, A. T. Haase, M. B. Feinberg, J. L. Sullivan, B. D. Jaimeson, J. A. Zack, L. J. Picker, R. A. Koup. Changes in thymic function with age and during the treatment of VIH infection. *Nature* 1998; 396: 690-695.

¹⁵⁶ A. Vigano, S. Vella, M. Sarasella, A. Vanzulli, D. Bricalli, S. Di Fabio, M. Ferrari, M. Pirillo, L. G. Dally, M. Clerici, N. Principi. Early immune reconstitution after potent antiretroviral therapy in VIH-infected children correlates with the increase in thymus volume. *AIDS* 2000; 14: 251-261.

¹⁵⁷ J. Heathcote, J. McHutchison, S. Lee, M. Tong, K. Benner, G. Minuk, T. Wright, J. Fikes, B. Livingston, A. Sette, R. Chestnut. A pilot study of the CY-1899 T-cell vaccine in subjects chronically infected with hepatitis B virus. The CY1899 T cell vaccine study group. *Hepatology* 1999; 30: 531-536.