

# Función inmunológica del hígado desde la perspectiva de la vacunación terapéutica

✉ Julio C Aguilar

Departamento de Hepatitis B, División de Vacunas  
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 10400, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: julio.aguilar@cigb.edu.cu

## RESUMEN

La vacunación terapéutica contra las enfermedades infecciosas crónicas se ha explorado ampliamente porque se estima que podría contribuir en mucho a combatirlas. Resulta interesante la vacunación contra la infección crónica por el virus de la hepatitis B, enfermedad que se caracteriza por un proceso necroinflamatorio sostenido del hígado, que puede evolucionar a formas severas de la enfermedad, entre ellas la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. La función esencial del sistema inmune en la curación de la infección crónica por ese virus, bien de modo espontáneo o como resultado de tratamientos antivirales, sugiere que es un escenario propicio para el tratamiento inmunoterapéutico. Sin embargo, aún no hay una vacuna que cure esta u otra infección crónica; aunque sí se ha ensayado un grupo elevado de candidatos vacunales. El conocimiento acerca del funcionamiento del hígado como órgano linfoide, y los limitados avances en la vacunación terapéutica, obligan a revisar la racionalidad de los candidatos vacunales actuales. En los últimos diez años ha habido un desarrollo impetuoso del conocimiento de la inmunidad innata y los mecanismos de señalización intra y extrahepáticos, que permiten un diseño racional de las estrategias vacunales. Los precios elevados, la baja efectividad de los tratamientos convencionales y la gran cantidad de pacientes portadores crónicos de este virus, indican que hay un nicho oportuno para el desarrollo de un producto inmunoterapéutico contra la hepatitis B crónica. Es posible predecir que las estrategias de adyuvación que estén en línea con las características del hígado como órgano linfoide, tendrán un impacto en el desarrollo de esta rama de la vacunología.

**Palabras clave:** Hígado, vacunación terapéutica, respuesta inmune, antígenos, receptores, inmunidad innata

*Biotecnología Aplicada 2009;26:1-9*

## ABSTRACT

**A therapeutic perspective of the immunological function of the liver.** Therapeutic vaccination of chronic infectious diseases has been extensively explored because of its possible contribution to their eradication. In particular, therapeutic vaccination of hepatitis B virus chronic infections is especially interesting since this disease is characterized by a sustained necro-inflammatory process of the liver that may evolve into more severe conditions including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The basic role of the immune system in the healing process of this chronic infection suggests that it offers a favorable setting for immunotherapeutic treatments, either spontaneously or as a result of antiviral therapy. However, no vaccine has been able to cure this or any other chronic infection in spite of the large number of vaccine candidates tested. The knowledge of the liver as a lymphoid organ and the limited advances of therapeutic vaccination demand more thorough analyses within the rationale of current vaccine candidates. In the last ten years there has been an increased knowledge of innate immunity and intra- and extra-hepatic signaling mechanisms, to support a rational design of vaccine strategies. The high costs and low effectiveness of conventional treatments, and the large amount of chronic carrier patients for this virus, indicate a favorable setting for the development of immunotherapeutic products against chronic hepatitis B. It is possible to predict that adjuvant strategies that take into account the properties of the liver as a lymphoid organ would have an impact in the development of this new field of therapeutic vaccines.

**Keywords:** Liver, therapeutic vaccination, immune response, antigens, receptors, innate immunity

## Introducción

El hígado es un órgano anatómicamente “estratégico”, cuyas funciones son muy importantes para el organismo. Tiene una función crítica en el metabolismo intermediario de los carbohidratos, aminoácidos y lípidos, en la síntesis y secreción de varias proteínas del plasma, de lípidos y de glicolípidos, entre ellos, las enzimas, así como las sales biliares. Es el órgano principal en la regulación de los niveles de la mayoría de los componentes de la sangre.

Cerca del 25% de la sangre que bombea el corazón pasa a través del hígado. Este órgano recibe un doble flujo de sangre: la arteria hepática, que lleva la sangre arterial, interseca con la sangre venosa que ha transi-

tado a través del intestino y el bazo, y que es llevada por la vena portal. Por tanto, los compuestos tóxicos ingeridos junto con la comida, se transportan al hígado desde los intestinos a través de la vena portal y allí se detoxifican [1].

Hasta el año 2000 era poco reconocido que el hígado tiene mecanismos propios y especializados para defenderse de agentes infecciosos, toxinas y otros productos bacterianos. También debe protegerse de respuestas indeseadas frente a proteínas no dañinas de la dieta o frente a células malignas transportadas por un flujo sanguíneo masivo. De hecho, es probable que como resultado de la detoxificación de

1. MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution *in vivo* microscopy. *Am J Physiol* 1995;269(5 Pt 1):G692-8.

compuestos potencialmente dañinos de la dieta, se produzca una exposición regular a carcinógenos, los que en combinación con el alto recambio celular de este órgano, pudieran provocar muchas mutaciones, y requerir un mecanismo especializado de vigilancia contra tumores [2].

Para diseñar un candidato vacunal terapéutico contra la hepatitis B crónica (HBC), se debe considerar el singular sistema inmune hepático, en el cual se desarrollan mecanismos de tolerancia e inducción de respuesta inmune, cuyo código de señales ha evolucionado, para permitir la adaptación del hígado como órgano receptor de sangre venosa proveniente del intestino, y al mismo tiempo garantizar funciones complejas y vitales.

La estrategia de adyuvación en la vacunación terapéutica contra la HBC requiere el conocimiento del sistema de señalización, que en condiciones normales favorece la inducción de tolerancia o respuesta inmune en este órgano. Un primer acercamiento a los componentes celulares permite comprender que es necesario que las células efectoras antivirales no solamente sean rescatadas de los estados de tolerancia inmunológica en que se encuentran producto de la infección crónica, sino que deben migrar al interior del parénquima hepático, donde deben ejercer su función y sobrevivir al estado tolerogénico del órgano.

### Principales tipos celulares del hígado relacionados con la respuesta inmune

La complejidad del sistema inmune hepático está dada por la presencia de tipos celulares convencionales y no convencionales, y por su función en la respuesta inmune producida en el hígado, ya sea de activación como de inhibición.

Los hepatocitos constituyen aproximadamente las dos terceras partes del total de células del hígado; el resto son células que no forman el parénquima hepático, y cuya función está muy relacionada con la defensa del órgano. Esta tercera parte se subdivide en células endoteliales (50%); células de Kupffer (CK; 20%); linfocitos (25%); células biliares (5%) y células estrelladas (menos del 1%)[3].

Los linfocitos están dispersos en el parénquima así como en los tractos portales. El hígado humano normal contiene alrededor de  $10^{10}$  linfocitos, donde se incluyen poblaciones de linfocitos convencionales y no convencionales, tanto del sistema innato como del adaptativo [3].

Las células T convencionales comprenden las células T CD4+ y CD8+. Ambas poblaciones poseen un diverso repertorio de células con receptores de células T con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , los que reconocen a los antígenos en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II, respectivamente. El número de células CD8+ sobrepasa el número de células CD4+ y la proporción de células (efectoras: memoria) es superior a la de la sangre.

Las células T no convencionales comprenden varios tipos celulares, que se pueden categorizar en dos poblaciones: las que poseen marcadores de células citotóxicas naturales, o NKT, y las que no.

Entre las células NKT, hay clásicas y no clásicas: las primeras provienen del timo, y poseen un repertorio de células T que es muy restringido, típicamente

el receptor de células T con subunidades V $\alpha$ 24 y el V $\beta$ 11) y reconoce antígenos en el contexto de las moléculas CD1. Las células NKT clásicas se activan con  $\alpha$ -galactosil-ceramida. Estas células NKT pueden ser tanto CD4+ como CD4 y CD8 doble negativas.

Las células NKT no clásicas son más abundantes en el hígado que en otros órganos, y pueden constituir hasta el 30% de la población de linfocitos intrahepáticos [4]. Su migración al hígado, así como su expansión en este órgano, están controladas por las células NK [5], las que están en una inusualmente alta frecuencia entre los linfocitos residentes en el hígado. Las células NK representan una población linfoide con actividad citolítica contra las células tumorales o infectadas por virus. Su función está regulada por receptores activadores e inhibitorios, con la inhibición como señal dominante.

Las células T no convencionales, que no expresan los marcadores celulares de células NK, incluyen al grupo de células T con subunidades  $\gamma\delta$  (células T $\gamma\delta$ ). Este grupo representa del 15 al 25% de todas las células T intrahepáticas. Ello convierte al hígado en una de las principales fuentes de células T $\gamma\delta$  del cuerpo. Estas células poseen receptores de células T invariantes u oligoclonales, que reconocen un rango limitado de antígenos como son proteínas de estrés y antígenos no proteicos.

La complejidad del sistema inmune hepático también se manifiesta a nivel de células presentadoras de antígenos. El hígado posee varios tipos de células presentadoras de antígenos (CPA), las que pueden capturar los antígenos que pasan por los sinusoides o aquellos que son liberados cuando los hepatocitos infectados por patógenos mueren. Las CPA residentes incluyen las CK, las células endoteliales sinusoidales del hígado (CESH) que representan un tipo de célula endotelial vascular inusual, y las células dendríticas (CD). Se considera que estos tres tipos de CPA son esenciales para la inducción de tolerancia en condiciones no inflamatorias [6].

Las CK son el mayor grupo de macrófagos fijos del cuerpo y se derivan de monocitos circulantes que provienen de progenitores de médula ósea [7]. Estas células se sitúan en el espacio vascular sinusoidal, y predominan en el espacio periportal. En este lugar están perfectamente situadas para eliminar las endotoxinas de la sangre que pasa por los sinusoides, igual para fagocitar el debris y los microorganismos. Su lenta migración a través de los sinusoides causa perturbaciones frecuentes del flujo, que se detiene por ratos, y facilita el contacto entre los linfocitos que pasan y el resto de los tipos celulares presentes. Las CK pueden pasar a través del espacio de Dissé y hacer contacto directo con los hepatocitos; y cuando estos son apoptóticos, los fagocitan.

Las células endoteliales sinusoidales del hígado (CESH) se alinean al sinusoide de modo similar al endotelio vascular de las arterias y de las venas portal y central. Sin embargo, su morfología difiere considerablemente, formando un endotelio fenestrado con aspecto de filtro. Este endotelio expresa moléculas que promueven la asimilación de antígenos, incluyendo el receptor de manosa y el receptor *scavenger*; y presenta moléculas que promueven la presentación antigénica, incluyendo las moléculas coestimuladoras

2. O'Farrelly C, Crispe IN. Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system. *Immunol Today* 1999;20(9):394-8.

3. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006; 43(5):S54-S62.

4. Exley MA, Koziel MJ. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 2004;40(5):1033-40.

5. Emoto M, Zerrahn J, Miyamoto M, Pérarnau B, Kaufmann SH. Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells. *Eur J Immunol* 2000;30(8):2300-11.

6. Bertolino P, Trescol-Biémont MC, Ra-bourdin-Combe C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 1998;28(1):221-36.

7. Gale RP, Sparkes RS, Golde DW. Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* 1978;201(4359):937-8.

CD40, CD80 y CD86. La endocitosis y fagocitosis mediada por receptor, el procesamiento de antígenos y la presentación antigénica de las células endoteliales sinusoidales ocurren con una eficiencia similar a la de las células dendríticas [8].

Producto del diámetro pequeño de los sinusoides, ligeramente superior al de los linfocitos, los mínimos incrementos en la presión venosa sistémica y las perturbaciones del flujo sinusoidal provocan una detención del flujo que aumenta el contacto entre los linfocitos y las células presentadoras de antígenos, lo que promueve la extravasación de los linfocitos. Esta extravasación es facilitada por las fenestraciones de las células del endotelio sinusoidal, que permiten a los linfocitos el acceso al espacio de Dissé y el contacto con la matriz extracelular, las células estrelladas, las células dendríticas residentes en el hígado, las CK, las células endoteliales y los hepatocitos. Esta morfología tisular característica del hígado facilita la sensibilización directa o indirecta de los linfocitos, modula la respuesta inmune a los patógenos hepatotrópicos, y contribuye a la respuesta inmune inducida por este órgano [2].

Las células dendríticas residentes se derivan de la médula ósea [9], y se localizan alrededor de las venas centrales y tractos portales. En el hígado normal, las células dendríticas son predominantemente inmaduras [10], y se dedican a capturar y procesar antígenos. Las células del endotelio sinusoidal, así como las células de Kupffer producen interleuquina 10 (IL10) y factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ), y además, estas citoquinas son inducibles en células estrelladas; por tanto, el hígado sano posee un microambiente de citoquinas único que puede convertir a las células dendríticas residentes en tolerogénicas [10, 11]. Las células dendríticas que no están activadas pueden inhibir la proliferación y producción de citoquinas de linfocitos infiltrantes a través de las proteínas de superficie celular CTLA-4 y de PD-1 [12]; en cambio, cuando están activadas subregulan estos receptores y aumentan su capacidad de migración a través del espacio de Dissé hacia los vasos linfáticos en los tractos portales, y finalmente a los linfonodos extrahepáticos [12].

## Biología de la respuesta inmune en el hígado

Muchas células del hígado tienen una potencial capacidad de presentación antigénica; entre ellas las CESH, los hepatocitos, las CD, las CK, y más recientemente, se detectó esta propiedad en las células estrelladas. Todas ellas presentan antígenos a las células T vírgenes [13]; sin embargo, las CK y las CESH están ubicadas para interactuar con las células T vírgenes que provienen de la sangre y que circulan en los sinusoides. En este acápite analizaremos primeramente qué ocurre con las células dendríticas en el hígado, luego se presentarán los otros tipos celulares.

### El papel de las células dendríticas

Independientemente del tipo de CPA involucrada en la presentación, todas compiten con las CD de tejidos linfoides por la activación de células T vírgenes. Hay dos vías de activación dirigidas en sentidos diferentes. Mientras las células T activadas en los linfonodos adquieren una función efectora completa y participan

en la inmunidad, las células activadas en el hígado se convierten en no respondedoras o son eliminadas, proceso que resulta en una tolerancia Ag-específica [14]. Este modelo explica por qué puede existir respuesta inmune efectiva en el hígado contra algunos agentes patógenos, mientras en este órgano se mantiene una capacidad intrínseca para inducir tolerancia.

Las CD recién aisladas del hígado son relativamente inmaduras y menos inmunogénicas que las CD esplénicas. Se considera que las CD intrahepáticas son importantes en la función tolerogénica del hígado [15]. Ello está dado porque las CD del hígado secretan altos niveles de IL10 y de TGF $\beta$ , y regula negativamente la respuesta inmune e induce una respuesta de células T reguladoras [16].

La mayoría de las CD del hígado están secuestradas en los tractos portales en vez de en los sinusoides [17]. En este contexto es poco probable el contacto de estas células dendríticas inmaduras con las células vírgenes circulantes. Sin embargo, se ha podido comprobar que algunas CD translocan a través de los sinusoides [18]. Existe por tanto la probabilidad de que CD maduras activen células T CD8+ vírgenes circulantes. El hallazgo de que las CESH interfieren con la capacidad presentadora de las CD, y que específicamente afectan su capacidad coestimuladora –requerida para la activación de células CD8-, pudiera ser una solución adaptativa del hígado. De modo inverso, en ausencia de interacción con las CESH, las CD recuperan su capacidad para inducir proliferación celular. Esta propiedad de las CESH no la tienen ni los hepatocitos ni las células B. Se conoce que el contacto de las CESH con las CD reduce los niveles de expresión de CD80, CD86 y de IL12; es decir, las CESH no solo tienen la capacidad de tolerogenizar a las células T directamente (véase más adelante), sino que también suprimen la capacidad de inducción de inmunidad de células T en las CD de su vecindad [19].

Es importante aclarar que a pesar de este descubrimiento importante que pone de manifiesto la capacidad reguladora de las CESH sobre las CD, ya las CD que se encuentran en su mayoría en los tractos portales, son poco estimuladoras, como resultado de su estado inmaduro más que producto de un veto durante su paso por el sinusoides hepático.

Este conjunto de mecanismos regulatorios sobre las CD evidencian el control del hígado al desarrollo de una respuesta inmune citolítica potencialmente dañina y su predominante actividad tolerogénica, la que es aprovechada por el agente patógeno para el desarrollo de una infección persistente.

Un candidato vacunal que pretenda convertirse en una vacuna terapéutica debe sortear estos mecanismos regulatorios del órgano sobre la respuesta inmune, para contribuir a la eliminación de un agente patógeno persistente en el hígado.

### Función inmunológica de las células endoteliales sinusoidales del hígado

Varios estudios se han centrado en las CESH, puesto que son células con receptores *scavenger*, que capturan de modo eficiente y presentan antígenos circulantes. En ratones se ha podido comprobar que estas células expresan bajos niveles de MHC clase II y de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Adicional-

8. Steffan AM, Gendraut JL, McCuskey RS, McCuskey PA, Kirn A. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* 1986;6(5):830-6.

9. Valdivia LA, Demetris AJ, Langer AM, Celli S, Fung JJ, Starzl TE. Dendritic cell replacement in long-surviving liver and cardiac xenografts. *Transplantation* 1993; 56(2):482-4.

10. Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003;52(2):307-14.

11. Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2000;164(3): 1346-54.

12. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 2005;6(3):280-6.

13. Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 2002;80(1):84-92.

14. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004; 114(5):701-12.

15. Sumpter TL, Abe M, Tokita D, Thomson AW. Dendritic cells, the liver, and transplantation. *Hepatology* 2007;46(6):2021-31.

16. Bertolino P. Impaired function of dendritic cells translocating the liver sinusoids: a veto effect contributing to intrahepatic tolerance? *Eur J Immunol* 2008;38(4): 938-41.

17. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(8):610-21.

18. Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 1997;185(4):777-84.

19. Schildberg FA, Hegenbarth SI, Schumak B, Scholz K, Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Immunol* 2008;38(4):957-67.

mente, se ha demostrado su capacidad para presentar y presentación cruzada de antígenos a células CD4+ y CD8+, lo cual favorece la inducción de tolerancia [20, 21].

La presentación de antígenos por parte de las CESH a células CD4 vírgenes, las induce a producir IL4 e IL10 en vez de IL2 e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). La dominancia de la IL10 en el hígado no sólo es producida por las células CD4, sino también por las CK y –como se ha demostrado mucho más recientemente–, por células T CD8+ intrahepáticas [22]. Este ambiente altera la expresión de receptores de quemoquinas en las células dendríticas, reduciendo su migración a linfonodos de drenaje [23]. La sensibilización de las células T en presencia de IL10 reduce su capacidad productora de citoquinas y sus funciones efectoras [24].

La presentación de antígenos por las CESH a las células CD8 también resulta en tolerancia más que en función efectora. Las células CD8+ que son co-cultivadas con las CESH, exhiben una baja capacidad de producción de IL2 e IFN $\gamma$ , baja actividad citotóxica, baja capacidad proliferativa y tendencia a la apoptosis. Estas propiedades pueden restablecerse por la adición de IL2 exógena a los co-cultivos de CESH y células CD8 [21].

En condiciones no inflamatorias, en ausencia de IL2, la presentación antigénica por parte de las CESH contribuye a la tolerancia. Por el contrario, en un contexto proinflamatorio, las CESH regulan negativamente la expresión del MHC y reduce su efecto tolerogénico [21].

### Función de las células de Kupffer

Las CK se activan por varios estímulos bacterianos, incluidos los lipopolisacáridos y los superantígenos bacterianos. Las citoquinas derivadas de las CK son importantes en la modulación de la proliferación y diferenciación de otras células. En respuesta a concentraciones fisiológicas de LPS, estas células producen factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL10 [25], que subregulan la asimilación de antígenos, mediada por receptores y la expresión de MHC clase II por las CESH y CD, lo que disminuye la activación de las células T [24].

Las CK también producen prostanoides, óxido nítrico e intermediarios reactivos del oxígeno que suprimen la activación de células T [26]. De hecho, la tolerancia sistémica a los antígenos en la vena portal depende de las CK, puesto que esta se afecta considerablemente si se eliminan estas células [27].

Se conoce que las CK producen IL12 e IL18, citoquinas que regulan la diferenciación de las células NK y promueven la expansión local de células NK, que a su vez expresan grandes cantidades de IFN $\gamma$  antiviral. Otras citoquinas derivadas de CK promueven la infiltración y actividad antimicrobiana de los neutrófilos.

Las células NK modulan el daño hepático al balancear la producción local de citoquinas proinflamatorias (Th1) y antiinflamatorias (Th2), una vez que son activadas a través de sus receptores activadores e inhibitorios.

Teniendo en cuenta el efecto de los LPS sobre las CK y su importancia en la inmunidad del hígado, cabría preguntarse si el lípido A monofosforilado (MPL) –compuesto derivado del lipopolisacárido (LPS)– pue-

de considerarse un adyuvante o inmunomodulador óptimo cuando se pretende diseñar un candidato vacunal terapéutico para romper la tolerancia al VHB en este órgano. Es de suponer que la asociación de MPL al antígeno vacunal en el seno de una formulación oleosa pueda ir a la sangre, y ser asimilado en el hígado en un determinado porcentaje. Esto no generará una señal contraria a la que normalmente induce el LPS, el que estimula la secreción de IL10 y TNF $\alpha$  y como resultado produce un ambiente tolerogénico en el hígado, que es contrario a la requerida activación de células T. Por otra parte, se ha descrito que la señal que favorece la migración de células T CD8+ específicas y activas al interior del hígado está relacionada con la activación vía receptor de tipo Toll 3 (TLR-3), como se explicará más adelante.

### Función de las células NK

Las células NK del hígado modulan el daño hepático al balancear la producción local de citoquinas pro y antiinflamatorias a través de sus receptores activadores o inhibitorios. En ausencia de señales inhibitorias y en presencia de señales como IFN de tipo I y el ligando de quimiocinas tipo 3 (CCL3) inducible por IFN, se activan receptores que resultan en la activación de las células NK y la lisis de células blanco [28]. La activación también implica la rápida producción de IFN $\gamma$ , que estimula a los hepatocitos y a las CESH a secretar la quimiocina CXCL9 y a través de esta reclutar células T al hígado.

### Función de las células NKT

La mayoría de las células NKT reconocen blancos antigénicos no peptídicos, como los lípidos y glicolípidos de las paredes celulares de microorganismos. El reconocimiento es restringido a la glicoproteína de superficie CD1, molécula que puede ser expresada por hepatocitos y por las CPA como son las CD, macrófagos y células B. La mayoría de las células NKT clásicas son activadas por la IL12, la cual es producida por las CD y las CK y como resultado, por lo general, ocurre una lisis mediada por Fas [29, 30]. Dada la capacidad de las células NKT para producir grandes cantidades de IFN $\gamma$  e IL4, se considera que estas células están relacionadas con la polarización de la respuesta inmune adaptativa local y sistémica tanto en el sentido pro como antiinflamatorio. Estas células realizan una importante función en las infecciones del hígado, porque los ratones deficientes en células NKT o en CD1d son más susceptibles a ciertas infecciones virales [31] y bacterianas [32]. Además, en el modelo de ratón transgénico se demostró que la activación de las células NKT con el ligando sintético de CD1d: ceramida  $\alpha$ -galactosilada ( $\alpha$ -GalCer) incrementa la producción de IFN $\gamma$ , al regular negativamente la replicación del virus de la hepatitis B (VHB) [33]. Esta característica de las células NKT y específicamente el resultado de Kakimi y colaboradores, abren una ventana de posibilidades al empleo de la activación de las células NKT como herramienta terapéutica. Más recientemente, en el año 2008, se reportó que el empleo de  $\alpha$ -GalCer junto con el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) potenció la inducción y proliferación de células T citotóxicas anti-HBsAg [34]. Este resultado puede abrir un nuevo método de adyuvación

20. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:21-34.

21. Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000;6(12):1348-54.

22. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004; 113(7):963-72.

23. Takayama T, Morelli AE, Onai N, Hirao M, Matsushima K, Tahara H, Thomson AW. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J Immunol* 2001;166(12):7136-43.

24. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996; 184(1):19-29.

25. Knolle P, Schlaack J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995;22:226-9.

26. Roland CR, Walp L, Stack RM, Flye MW. Outcome of Kupffer cell antigen presentation to a cloned murine Th1 lymphocyte depends on the inducibility of nitric oxide synthase by IFN-gamma. *J Immunol* 1994; 153(12):5453-64.

27. Roland CR, Mangino MJ, Duffy BF, Flye MW. Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation* 1993;55(5):1151-8.

28. Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med* 1998;187(1):1-14.

29. Bendelac A. CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science*. 1995;269(5221):185-6.

30. Kumagai K, Takeda K, Hashimoto W, Seki S, Ogasawara K, Anzai R, et al. Interleukin-12 as an inducer of cytotoxic effectors in anti-tumor immunity. *Int Rev Immunol* 1997;14(2-3):229-56.

31. Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G, Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* 2003;170(3):1430-4.

32. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1d or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1999;189(12):1973-80.

33. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000;192(7):921-30.

en la vacunación terapéutica contra la HBC, más apropiado para este patógeno hepatotrópico, pues emplea el conocimiento de la inmunología del hígado.

## La respuesta T en el hígado y las potencialidades de NASVAC

La protección mediada por células T contra virus que se caracterizan por su tropismo hepático, como es el VHB o del VHC, depende de una respuesta inmune de células T CD8+ que pueden controlar la emergencia, distribución y expansión del agente patógeno. Aunque una serie de estudios se han centrado en la caracterización de las células T patógeno-específicas desde el punto de vista fenotípico y funcional, tanto en sangre como en hígado, solo unos pocos han analizado los mecanismos por los cuales los antígenos intrahepáticos se convierten en disponibles para la inducción de una respuesta mediada por células T y los sitios donde ellos son presentados a las células T CD8+ *in vivo*.

Las células T CD8+ no sensibilizadas se localizan en compartimientos linfoides secundarios, y requieren dos señales independientes para convertirse en células completamente activadas. La primera señal es provista por la interacción con el complejo péptido-MHC clase I a través del receptor de células T específico. La segunda señal, la coestimuladora, es independiente del receptor antigénico y es crítica para permitir la activación total de las células T CD8+ [35]. De esta forma, mientras las células T CD8+ sensibilizadas pueden ser activadas por cualquier célula blanco que exprese a su antígeno correspondiente en el contexto del MHC clase I, solo las CPA "profesionales" que provienen de la médula ósea y apropiadamente licenciadas pueden iniciar respuestas T CD8+ por la expresión de moléculas coestimuladoras. Estas células llevan al antígeno desde el sitio de infección hasta los órganos linfoides.

En la actualidad se discute si puede haber una presentación eficiente del antígeno en el hígado, o si esta es confinada a los linfonodos de drenaje. No puede excluirse que los agentes patógenos expresados en el hígado sean tomados pasivamente por las CESH y por las CK, y presentados a células T no sensibilizadas que recirculan a través de los sinusoides hepáticos o que residen en los agregados linfáticos de los tractos portales. Sin embargo, en condiciones no inflamatorias se induce tolerancia más que potenciación de una respuesta inmune de células T [21].

Tradicionalmente se ha establecido que las células deben migrar y que la activación de los linfocitos T CD8+ debe ocurrir en los linfonodos regionales, donde se encuentran sobre todo las células T CD8+ no sensibilizadas. Una vez activados, los linfocitos antígeno-específicos entran a la corriente sanguínea y se localizan en el hígado, donde ejercen sus funciones efectoras.

Una perspectiva alternativa lo constituye el que los antígenos sean presentados *in situ* por las CD derivadas de médula ósea, activando a los linfocitos infiltrantes no sensibilizados. De modo interesante, un estudio reciente sugiere que la sensibilización de células T CD8+ en linfonodos y en hígado resulta en una función efectora cualitativamente diferente. En este estudio, los autores emplearon modelos de ratón transgénico en los que el antígeno es expresado tanto en el hígado como en los linfonodos, y demostraron

que las células T CD8+ inducen hepatitis cuando la activación inicial de las células T ocurre en los linfonodos, mientras que se observó una respuesta citotóxica defectuosa y una disminución en la vida media de las células CD8+ cuando la activación primaria ocurre en el hígado [14].

Cuando las células presentadoras de antígenos no se infectan, no pueden procesar al antígeno de modo endógeno y la sensibilización directa de las células T CD8+ es ineficiente. En este escenario, la única forma de iniciar una respuesta de células T CD8+ es a partir de la existencia del *cross-priming* o sensibilización cruzada. En este proceso, un antígeno dentro de una célula es endocitado por otra célula y presentado cruzadamente por esta en el MHC de clase I a linfocitos T CD8+ para su sensibilización inicial.

En este punto, resulta importante destacar que los antígenos particulados son especialmente eficientes para la sensibilización cruzada. El antígeno de la cápsida del VHB (HBcAg) y el HBsAg, presentes en la formulación NASVAC, son antígenos capaces de realizar la presentación cruzada por diferentes células presentadoras. El HBcAg induce sensibilización cruzada tras la asimilación por células B, las activa de modo muy eficiente, y las convierte en una CPA "profesional" que activa células T no sensibilizadas directamente, incluso sin necesidad de ayuda T [36, 37].

En los modelos existentes de sensibilización cruzada, las células infectadas por el virus no son una simple fuente de antígenos, sino que pueden tener una función activa en la calidad y especificidad de la sensibilización de las células T a través del envío de péptidos preprocesados; adicionalmente, puede atribuirse un cierto efecto adyuvante a las células que están muriendo o que ya están muertas [38]. De esta manera se puede modular el balance de mantenimiento de tolerancia inmunológica a inducción de respuesta inmune.

La efectividad de este mecanismo depende del número de células infectadas, la viabilidad de estas células, la cantidad de antígeno expresada de modo endógeno y del ambiente inflamatorio. Mientras una respuesta inmune inflamatoria exuberante pudiera obviar algunos de los requerimientos coestimulatorios para sensibilizar a las células T CD8+, una respuesta inflamatoria limitada pudiera ser muy débil para una presentación efectiva de antígenos a células T CD8+ [38].

En el candidato vacunal terapéutico NASVAC, la presencia de dos antígenos particulados con capacidad para una presentación cruzada favorece un escenario proinflamatorio, no solamente por el efecto adyuvante del ARN asociado a la partícula del HBcAg [39], sino además por la presencia en cada partícula de entre 180 y 230 monómeros, lo que incrementa la eficiencia de la célula presentadora por el alto número de antígenos asimilados para un evento endocítico, en comparación con la asimilación de proteínas solubles, lo que favorece la eficiencia del proceso de presentación/sensibilización cruzada.

## Receptores de tipo Toll y activación de la inmunidad innata del hígado

La estrecha regulación recíproca entre las CK y las células NK ocurre a partir de la estimulación de los

34. Ito H, Ando K, Ishikawa T, Nakayama T, Taniguchi M, Saito K, *et al.* Role of  $\alpha 14+$  NKT cells in the development of Hepatitis B virus-specific CTL: activation of  $\alpha 14+$  NKT cells promotes the breakage of CTL tolerance. *Int Immunol* 2008;20(7):869-79.

35. González JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutiérrez-Ramos JC, Coyle AJ. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 2001;166(1):1-5.

36. Lazdina U, Alheim M, Nyström J, Hultgren C, Borisova G, Sominskaya I, *et al.* Priming of cytotoxic T cell responses to exogenous hepatitis B virus core antigen is B cell dependent. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 1): 139-46.

37. Wild J, Grusby MJ, Schirmbeck R, Reimann J. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 1999;163(4): 1880-7.

38. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425(6957):516-21.

TLR con productos derivados de patógenos [40, 41]. De esta forma se inicia la respuesta inmune innata.

El hígado constantemente está expuesto a antígenos no patogénicos provenientes de la dieta y al LPS derivado de la flora intestinal. El LPS es un estímulo potente para la inmunidad innata como ligando del TLR-4, cuya estimulación se traduce en una activación de las CPA profesionales. Por tanto, el hígado debe desarrollar un mecanismo por el cual evite desarrollar una respuesta inmune dañina a los antígenos de la dieta que provienen del intestino directamente por la sangre venosa portal de conjunto con el LPS [42, 43].

Entender cómo se desarrolla la inmunidad innata es muy importante para las infecciones virales hepatotrópicas. Se conoce que la elaboración de IL10 por las CK es un mecanismo de modulación de la respuesta del hospedero a las citoquinas proinflamatorias también secretadas por las propias CK [25, 44, 45]. ¿Qué es lo que favorece este balance en uno u otro sentido?

La unión de los ligandos que provienen de los microorganismos a sus correspondientes TLR en las células del sistema inmune innato activa dos vías de señalización intracelulares diferentes: una a través del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que resulta en la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B y la secreción de citoquinas proinflamatorias, y una vía independiente de MyD88 a través de la cascada transduccional TRIF-IRF-3, responsable de la síntesis de interferones de tipo I, así como de citoquinas proinflamatorias asociadas a la activación de NF- $\kappa$ B [41, 46, 47]. Tanto MyD88 como TRIF pueden estimular las citoquinas proinflamatorias a través de NF- $\kappa$ B, pero la síntesis de interferones de tipo I está limitada a la señalización a través de TRIF-IRF-3.

Los productos de la pared celular de bacterias grampositivas son detectados a través del TLR-2, como el ácido lipoteicoico (LTA), y de las gramnegativas son detectados a través de los LPS por el TLR-4. La vía del TLR-2 solamente se relaciona a la vía de activación dependiente de MyD88. El TLR-4 puede señalar cuando emplea MyD88 así como a través de TRIF-IRF-3. Los productos virales se detectan mediante el TLR-3, que emplea exclusivamente la vía TRIF-IRF-3 [48, 49].

El efecto de los ligandos LTA, poli-IC y LPS de los TLR-2, 3 y 4, respectivamente, se estudió en cultivos celulares que contenían leucocitos recién aislados del sinusoide hepático de donantes vivos de trasplante hepático. Los resultados evidenciaron que la IL10 producida por las CK a través de la vía de estimulación dependiente de MyD88 llevó a una atenuación del IFN $\gamma$  secretado por las células NK. Por otra parte, el poli-IC, análogo del ARN de doble cadena, y que es detectado por el TLR-3 vía TRIF-IRF-3 no produjo una síntesis sustancial de IL10, sino que causó una fuerte secreción de IFN $\gamma$ , por las células NK del hígado [50].

La propiedad de modular la inflamación a través de la IL10 representa una adaptación del hígado a la exposición constante de productos bacterianos derivados del intestino, y al mismo tiempo señala al TLR-3 como el receptor que activa una respuesta inflamatoria mediada por la estimulación de las células NK, en

las que se induce una rápida producción de IFN $\gamma$ , que estimula a los hepatocitos y a las CESH a secretar la quemoquina CXCL9 y a través de esta reclutar células T al hígado, por lo que modula el daño hepático [50].

Los resultados de este estudio apuntan a un estado inmunológico local dentro del hígado, que es modulado hacia la tolerancia a través de la secreción de IL10, producto de la estimulación de los receptores TLR-2 y TLR-4, con una actividad antiviral conservada como respuesta a la estimulación de TLR-3 que opera por la vía de transducción de señales independiente de MyD88 [50].

La liberación de IL10 por una señalización dependiente de MyD88 se demostró para células dendríticas a través de estimulación vía TLR-2 [51] y la secreción de IL10 por las CK, luego de estimulación con LPS, está bien documentada [25, 52].

El hígado es un órgano en el que ocurre el atrapamiento y apoptosis de células T CD8 $^{+}$  activadas durante el desarrollo de una respuesta inmune sistémica. La exposición constante a endotoxinas derivadas de bacterias comensales del intestino, actúa a través del TLR-4, y promueve la adhesión de células T activadas. Se ha demostrado que en ausencia de TLR-4, el hígado pierde su capacidad para secuestrar células CD8 $^{+}$  activadas, y existe una correlación inversa entre la frecuencia de células T CD8 $^{+}$  atrapadas en el hígado respecto a la frecuencia en la circulación. En ausencia de inflamación, los ligandos de TLR-4 tienen una función importante en la capacidad del hígado para atrapar células CD8 $^{+}$  activadas. De este modo se regula la respuesta inmune en condiciones basales [53].

En la actualidad se discute el papel del hígado en la respuesta inmune sistémica, debido a que este órgano es el segundo mayor reservorio de células T CD8 $^{+}$  después del bazo. Se plantea que los linfoblastos recientemente activados se localizan en los sinusoides hepáticos, según las moléculas de adhesión expresadas en el epitelio sinusoidal. Estos son eliminados por las células de Kupffer, y disminuyen el exceso de células T activadas. Este proceso, sin embargo, no ocurre con las células de memoria, las que pueden repoblar la memoria sistémica. De este modo se plantea que el hígado regula la homeostasis inmune periférica [54].

La asociación del antígeno de vacunas terapéuticas a ligandos del TLR3 permite por tanto inducir un tipo de respuesta en el sentido proinflamatorio en el hígado en caso de que este antígeno alcance el hígado. Esta señal es contraria a la respuesta que se produce por la activación del TLR-4.

En resumen, la respuesta inmune es moldeada en el hígado por elementos del ambiente local a través de la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Este mecanismo está optimizado para mantener el balance entre la autotolerancia y la defensa al hospedero. Dado que el hígado está expuesto constitutivamente a productos bacterianos, que incluyen los ligandos de TLR-2 y 4, resulta inapropiado para estas señales promover la inflamación o la inmunidad innata en el hígado. En contraste, la estimulación de TLR-3 ocurre como respuesta a señales de infecciones virales. Por tanto, la respuesta inmune a través de la señalización por el TLR-3 es apropiada por su capacidad de inducir citoquinas proinflamatorias.

39. Lee BO, Tucker A, Frelin L, Sallberg M, Jones J, Peters C. Interaction of the hepatitis B core antigen and the innate immune system. *J Immunol* 2009;182(11):6670-81.

40. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000;173:89-97.

41. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.

42. Van Oosten M, van de Bilt E, van Berkel TJ, Kuiper J. New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and Kupffer cells. *Infect Immun* 1998;66:5107-12.

43. Ziegler-Heitbrock HW, Frankenberger M, Wedel A. Tolerance to lipopolysaccharide in human blood monocytes. *Immunobiology* 1995;193:217-23.

44. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 1995;181:1887-92.

45. Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Matteo FM, Sidoni A, et al. Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 1996;111:736-44.

46. Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends Immunol* 2005;26:469-76.

47. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-72.

48. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.

49. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.

50. Tu Z, Bozorgzadeh A, Pierce RH, Kurtis J, Crispe IN, Orloff MS. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells. *J Exp Med* 2008;205(1):233-44.

51. Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2004;173:7548-55.

52. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.

53. John B, Crispe IN. TLR-4 regulates CD8 $^{+}$  T cell trapping in the liver. *J Immunol* 2005;175(3):1643-50.

54. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009;27:147-63.

## La activación del TLR-3 modula el carácter inmunoprivilegiado del hígado

La capacidad del hígado para inducir tolerancia se conoce desde hace mucho en el campo de la transplantaología. El trasplante del hígado induce la aceptación de otros órganos sólidos transplantados simultáneamente desde el mismo donante, que en otras circunstancias habrían sido rechazados [55]. La hepatitis autoinmune debido al ataque por células B y T es una rara manifestación de enfermedad autoinmune [56, 57]. De modo interesante los marcadores diagnósticos de la hepatitis autoinmune —como son los anticuerpos antimitocondriales— también se encuentran en personas saludables [58]. Todos estos hallazgos, vistos de conjunto, sugieren que hay mecanismos que protegen a este órgano sólido contra el ataque del sistema inmune. De ahí que el hígado se considere un órgano inmunoprivilegiado.

Algunos estudios de inmunorreactividad contra componentes de órganos periféricos sólidos, como las células de islotes pancreáticos, de glándulas salivales o de antígenos del tiroides, indican que las células B o T por sí solas, pudieran no ser suficientes para la inducción de la enfermedad. Se requieren señales inflamatorias adicionales para una eficiente inducción de la enfermedad [59]. Consistente con estas observaciones clínicas, los resultados de estudios en modelos animales sugieren que las células T vírgenes que son reactivas contra antígenos expresados en el hígado, ignoran al antígeno [60] o se tolerogenizan dentro del hígado [61, 62].

La inflamación como resultado de infecciones sistémicas que ocurren naturalmente, puede regular positivamente las moléculas coestimuladoras en el hígado y esto conllevar a la ruptura de la tolerancia [63, 64]. Los virus, además de sensibilizar una respuesta inmune adaptativa, pueden promover respuestas inflamatorias por su capacidad de activar el sistema inmune innato a través de los receptores tipo Toll (TLR) [65].

Recientemente se determinó que la activación de los TLR-3 y 7, que reconocen a los ARN de doble y simple cadena, promueven la autoinmunidad en ratones que exhiben una elevada frecuencia de células T CD8+ autorreactivas funcionales. La aparición y progresión de la enfermedad correlaciona con la producción de IFN $\alpha$  [66, 67]. Esto sugiere que la producción de citoquinas proinflamatorias como el IFN $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  puede influenciar el desarrollo de la autoinmunidad.

La protección o destrucción inmunomediada del hígado depende de dos mecanismos: a) la sensibilización de células T para antígenos expresados en el hígado y b) la migración de estos al órgano diana donde ejecutarán su función lítica. La sensibilización está controlada en una primera línea por factores coestimuladores, señales del sistema inmune innato y las células T reguladora [68, 69]. Sin embargo, esto no es suficiente, usualmente el hígado no atrae a las células específicas para los antígenos puesto que las citoquinas están expresadas en bajos niveles. Por tanto, aun cuando existan altos niveles de células T sensibilizadas en la sangre, pocas de ellas migran al hígado.

En un reciente estudio se analizaron los requerimientos para la destrucción autoinmune del hígado en un modelo de ratón en el que se expresa una proteína

del virus de la coriomeningitis linfocítica. En este trabajo se evidenció esta segunda línea de inmunoprivilegio en el hígado, la que está basada en la señalización mediante el TLR-3. Las señales proinflamatorias que aparecen como resultado de la señalización vía TLR-3 pueden llevar a las células T CD8+ a un proceso de localización y destrucción en el hígado [70].

El mecanismo por el cual se desarrolló la destrucción del hígado involucró la regulación positiva de genes dependientes de IFN $\alpha$  y TNF $\alpha$ , que estuvieron involucrados en la localización y migración de linfocitos T CD8+ [70].

En resumen, debido a que la activación de la inmunidad innata a partir del estímulo que proveen los microorganismos a través de los receptores de tipo Toll influye en el balance entre tolerancia y respuesta inmune en el hígado, su conocimiento influye directamente en la selección de la estrategia de adyuvación más atractiva para antígenos de un candidato vacunal terapéutico contra la hepatitis B crónica u otras infecciones crónicas del hígado.

## NASVAC: formulación vacunal que incluye antígenos solubles, particulados y asociados a ligandos de TLR-3 y 7

Los defectos en la activación de la inmunidad innata o la inmadurez del sistema inmunológico durante la infección crónica por el VHB, pueden llevar a una deficiente respuesta y a la cronicidad de la infección. Para establecer una respuesta inmune que controle al VHB, un candidato vacunal debe cubrir requerimientos antigénicos, pero al mismo tiempo, tener en cuenta los requerimientos y deficiencias del sistema inmune innato del órgano en cuestión a partir de la inclusión de ligandos que transmitan señales —como es el caso de las señales proinflamatorias que aparecen tras la señalización vía TLR-3, que pueden llevar a las células T CD8+ a realizar un proceso de localización en el hígado [70].

Sin embargo, en la actualidad existen pocos adyuvantes activadores del TLR-3 que de modo práctico se estén ensayado con este objetivo, puesto que los derivados del poli-IC, —que es el ligando mejor estudiado del TLR-3—, ha provocado reacciones adversas de consideración que han limitado su empleo. Entre los eventos adversos reportados históricamente están la fiebre alta en la mayoría de los voluntarios, linfopenia y episodios de hipotensión [71].

El HBcAg, tal como se produce en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), es una nucleoproteína particulada (Figuras 1A y B) que posee una región electrodensa interna (Figura 1A) formada por un componente nuclear de naturaleza ribonucleica (Figura 1C). Sobre este componente nuclear existe acuerdo en la literatura en considerarlo ARN de doble [72] y simple cadena [39]. El hecho de que en esta partícula de 28 nm de HBcAg exista una relación temporal y espacial entre antígeno y adyuvante favorece que los antígenos sean asimilados en la misma vacuola junto a los ligandos de TLR-3 y 7, para los que solo existen receptores en el interior de tales vacuolas endocíticas y no en la superficie celular. Por tal motivo, con esta coincidencia espacial y temporal entre el antígeno y el adyuvante, es posible optimizar la activación específica.

55. Kamada N, Brons G, Davies HS. Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens. *Transplantation* 1980;29(5):429-31.

56. Diamantis I, Boumpas DT. Autoimmune hepatitis: evolving concepts. *Autoimmun Rev* 2004;3(3):207-14.

57. Okano N, Yamamoto K, Sakaguchi K, Miyake Y, Shimada N, Hakoda T, et al. Clinicopathological features of acute-onset autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2003;25(3):263-70.

58. Luxon BA. Autoimmune hepatitis. Making sense of all those antibodies. *Postgrad Med* 2003;114(1):79-82.

59. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Cocksackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998;4(7):781-5.

60. Voehringer D, Blaser C, Grawitz AB, Chisari FV, Buerki K, Pircher H. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* 2000;165(5):2415-22.

61. Ferber I, Schönrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hämmerling GJ, Arnold B. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 1994;263(5147):674-6.

62. Hämmerling GJ, Schönrich G, Ferber I, Arnold B. Peripheral tolerance as a multi-step mechanism. *Immunol Rev* 1993;133:93-104.

63. Limmer A, Sacher T, Alferink J, Nichterlein T, Arnold B, Hämmerling GJ. A two-step model for the induction of organ-specific autoimmunity. *Novartis Found Symp* 1998; 215:159-67; discussion 167-71,186-90.

64. Sacher T, Knolle P, Nichterlein T, Arnold B, Hämmerling GJ, Limmer A. CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T-cell-mediated autoaggression against hepatocytes. *Eur J Immunol* 2002;32(12):3628-37.

65. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4(7):499-511.

66. Devendra D, Jasinski J, Melanitou E, Nakayama M, Li M, Hensley B, Paronen J, Moriyama H, Miao D, Eisenbarth GS, Liu E. Interferon-alpha as a mediator of polyinosinic:polycytidylic acid-induced type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(9):2549-56.

67. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 2005; 11(2):138-45.

68. Stäger S, Kaye PM. CD8+ T-cell priming regulated by cytokines of the innate immune system. *Trends Mol Med* 2004;10(8):366-71.

69. Bharat A, Fields RC, Mohanakumar T. Regulatory T cell-mediated transplantation tolerance. *Immunol Res* 2005;33(3):195-212.

70. Lang KS, Georgiev P, Recher M, Navarini AA, Bergthaler A, Heikenwalder M. Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest* 2006;116(9):2456-63.

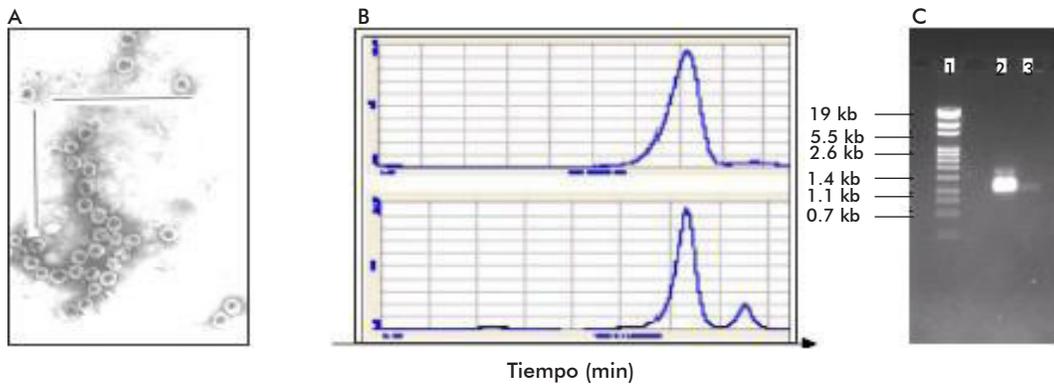


Figura 1. Estudio del aspecto físico, perfil cromatográfico y presencia de ácidos nucleicos asociados al HBcAg. A. Microscopía electrónica de transmisión, las barras miden 200 nm. B. Estudio de la talla y homogeneidad de la partícula por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En el gráfico superior se muestra el perfil del HBsAg y en el gráfico inferior el del HBcAg. Las corridas fueron en columnas TSK-G6000, a un flujo de 0.25 mL/min en PBS, fueron aplicados 100 µg de cada proteína. La detección fue a 280 nm. Ambas partículas tuvieron un tiempo de retención de 73 min. El segundo pico en el cromatograma inferior se corresponde con un componente no proteico de la solución en que el HBcAg está diluido (EDTA). C. Detección de la presencia de ácido nucleico asociado al HBcAg en electroforesis de agarosa. Carril 1. Patrón de pesos moleculares de ADN, Carril 2. HBcAg, Carril 3. HBcAg tratado con ARNasa (2 mg/mL) a 37 °C durante 6 h. La concentración del HBcAg sometido a tratamiento fue de 0.447 mg/mL.

La asociación física entre el HBcAg y el HBsAg también favorece esta unión espacial y temporal entre los ligandos de TLR-3, -7 del HBcAg y el HBsAg. Esta agregación confiere una marcada potenciación y modulación de la respuesta inmune contra ambos antígenos [73, 74].

Una segunda ventaja del empleo de la nucleocápsida que incluye material nuclear es la economía de recursos: valioso desde el punto de vista productivo; pero a la altura de un proyecto en fase de investigación clínica, tiene mayor impacto en el aspecto regulatorio, por las ventajas que ofrece reducir al máximo el empleo de este contaminante –adyuvante desde el punto de vista de seguridad. Adicionalmente, un estudio reciente [75] evidenció que el efecto modulador del ácido nucleico interno del HBcAg podría reconstituirse –luego de eliminación del ARN por tratamiento enzimático– si se emplean hasta 1000 veces más cantidad de ARN libre que el que se encuentra asociado a la proteína en el interior de la partícula. De esta forma quedó probado el efecto inmunomodulador de las trazas de ARN presentes en el HBcAg.

Un tercer aspecto está relacionado con la protección por parte de la proteína de este ácido nucleico. El ARN es conocido por su labilidad. El tratamiento con ARNasa de una muestra de antígeno de la nucleocápsida requirió condiciones de concentración de la enzima de 2 mg/mL –muy superiores a las encontradas de modo natural para estas enzimas–, a una temperatura de incubación de 37 °C por 6 horas. Este tipo de protección favorece que el contaminante-adyuvante llegue a las vacuolas endocíticas con un máximo de protección (Figura 1C).

La no inclusión de otro compuesto –más allá del adyuvante-contaminante que a nivel de trazas contiene el propio antígeno de la nucleocápsida–, permite conferir a la formulación propiedades de seguridad, como se ha probado en voluntarios sanos y en enfermos crónicos [76, 77].

Un grupo de características inmunológicas del HBcAg se asocian a su naturaleza particulada y favorecen su empleo en la vacunación terapéutica; entre ellas,

a) su capacidad para funcionar como antígeno T-dependiente y T-independiente al mismo tiempo [78]; b) la mayor inmunogenicidad de la variante particulada sobre la forma antigénica soluble –que ha sido calculada aproximadamente 1000 veces [79]; c) su capacidad para potenciar respuestas fundamentalmente de tipo Th1 respecto al HBcAg, que sensibiliza fundamentalmente células que promueven una respuesta de tipo Th2 [80]; d) la capacidad de las células Th específicas al HBcAg para auxiliar no solamente respuestas de células B (Ac) contra este antígeno sino también respuestas anti-HBsAg [81]; y la cualidad de ser una excelente proteína portadora [82]. Todas estas características se asocian a la naturaleza particulada del HBcAg, así como a su naturaleza físico-química nucleoproteica [73].

Durante la infección por el VHB en recién nacidos –en quienes predomina la tolerancia por la inmadurez del sistema inmune–, se desarrolla una infección persistente; es decir, se extiende la infección en el tiempo, y puede durar toda la vida del paciente en condiciones de coexistencia pacífica –sin daño hepático– o activarse el sistema inmune y controlar la infección con el tiempo, lo cual sucede a partir de las 2 o 3 décadas de vida. Durante esta primera fase de la infección, llegan a existir concentraciones muy altas de antígenos virales en sangre.

La respuesta inmune a un agente patógeno hepatotrópico con un elevado nivel de replicación y alta frecuencia de células infectadas, como el VHB, pudiera ser desmedida y afectar funciones vitales de este órgano. En el hígado se ha descrito un mecanismo que permite eliminar la infección por el VHB sin dañar este órgano vital. Este se denomina control viral mediado por citoquinas, y constituye un modo de preservar la integridad física de las células hepáticas y controlar la replicación viral al mismo tiempo [83].

Desde el punto de vista de seguridad del candidato vacunal, también es importante valorar que es posible establecer la eliminación viral sin necesidad de que medie un daño hepático. Esto se asocia al reforzamiento de un patrón de respuesta de células T auxiliaadoras

71. Champney KJ, Levine DF, Levy HB, Lerner AM. Modified polyribonucleosinic-polyribo-cytidylic acid complex: sustained interferonemia and its physiological associates in humans. *Infect Immun* 1979; 25(3):831-7.

72. Vanlandschoot P, Cao T, Leroux-Roels G. The nucleocapsid of the hepatitis B virus: a remarkable immunogenic structure. *Antiviral Res* 2003;60(2):67-74.

73. Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 2007;25:3752-62.

74. Aguilar JC, Lobaina Y, Muzzio V, García D, Pentón E, Iglesias E, et al. Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen. *Immunol Cell Biol* 2004;82:539-46.

75. Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 Immunity to Viral Core Particles Is Facilitated by Trace Amounts of RNA Bound to Its Arginine-Rich Domain. *J Immunol* 2002;168:4951-9.

76. Aguilar A, González CA, Cinza Z, Cabrera J, Véliz G, Moreno SR, et al. Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant hepatitis B surface and core antigens. *Int J Infect Dis* 2007;11:394-401.

77. Al Mahtab M. Personal communication, 2009.

78. Milich DR, McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science* 1986;234:1398-401.

79. Milich DR, McLachlan A, Stahl S, Wingfield P, Thornton GB, Hughes JL, et al. Comparative immunogenicity of hepatitis B virus core and E antigens. *J Immunol* 1988;141:3617-24.

80. Milich DR, Peterson DL, Schodel F, Jones JE, Hughes JL. Preferential recognition of hepatitis B nucleocapsid antigens by Th1 or Th2 cells is epitope and major histocompatibility complex dependent. *J Virol* 1995;69:2776-85.

de tipo 1 (Th1) como el inducido por NASVAC y al proceso de eliminación viral mediado por citoquinas. Evidencias preliminares en enfermos crónicos demuestran la eliminación del virus con incrementos ligeros de las transaminasas, lo que sugiere que el control viral se establece por mecanismos de esta naturaleza aunque no se descartan procesos citolíticos [77].

En resumen, aunque las células T CD8+ existan como resultado de la vacunación terapéutica, se debe tener en consideración que se requiere la señalización vía TLR-3 para subvertir este estado inmunoprivilegiado del hígado. Ello permitirá la migración al interior del hígado de los linfocitos. La presencia de los ligandos de TLR-3 en la proteína HBcAg recombinante es un paso importante en la subversión de este mecanismo, y las evidencias preclínicas y clínicas hasta el momento demuestran que es un candidato vacunal que puede considerarse seguro.

### Conclusiones

Dada la situación anatómica estratégica del hígado, este órgano está constantemente expuesto a antígenos provenientes de la dieta así como a restos de degradación de bacterias patógenas y comensales. En este ambiente antigénico y ante la necesidad de preservar las múltiples e importantes funciones del órgano, en él se ha desarrollado un sistema inmunológico distintivo.

Células del sistema inmune innato, convencionales y no convencionales, son inusualmente abundantes en el hígado. En adición a las CD y a las CK, un grupo de poblaciones de células no hematopoyéticas del hígado, que incluyen las CESH, células estrelladas y las células del parénquima funcionan como CPA. Estas células presentan antígenos en el contexto de citoquinas inmunosupresoras y de ligandos de superficie celular inhibitorios, de tal modo que la respuesta inmune a los antígenos en el hígado frecuentemente resulta en tolerancia.

Un grupo de importantes agentes patógenos humanos, entre los que se encuentran el VHB y el virus de

la hepatitis C explotan este ambiente tolerogénico del hígado, subvierten la inmunidad y establecen infecciones persistentes.

La detección de patrones moleculares asociados a los agentes patógenos por las células que realizan la actividad presentadora en el hígado, moldea la respuesta inmune resultante. Este mecanismo está optimizado para mantener el balance entre la tolerancia y la defensa al hospedero. Productos bacterianos como los ligandos de TLR-2 y 4, promueven señales antiinflamatorias en el hígado como un elemento de adaptación dada la gran afluencia de este tipo de señales (LPS y LTA), presentes en la sangre proveniente del intestino, mientras la estimulación de TLR-3, que ocurre en respuesta a señales de infecciones virales promueve respuestas inflamatorias. Conocer este tipo de señalización es muy útil en la optimización de candidatos vacunales terapéuticos como el NASVAC, que asocia cantidades reducidas y efectivas de los ligandos de TLR-3 y 7 a sus antígenos.

La manipulación de la respuesta inmune o tolerancia mediante el empleo de vacunas terapéuticas debe incluir el análisis de los mecanismos, a través de los cuales se inducen respuestas similares a aquellas que la naturaleza ha demostrado como efectivas para controlar la infección crónica. Además de la naturaleza de la respuesta inmune en el hígado, se deben conocer las deficiencias o problemas funcionales de los subgrupos de células presentadoras, efectoras y reguladoras, y los mecanismos inmunopatológicos del virus.

Del mismo modo se deben conocer los aspectos de activación de la respuesta inmune en condiciones no fisiológicas, es decir, ante estímulos de diferente naturaleza que se apartan de las condiciones normales del hígado. De este modo se podrá manipular al sistema inmune hepático de manera que se utilicen activadores de la inmunidad innata que estén en concordancia, por aquellos que constituyen los mediadores de una activación real de la inmunidad en el órgano.

81. Milich DR, McLachlan A, Thornton GB, Hughes JL. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 1987;329:547-9.

82. Schodel F, Moriarty AM, Peterson DL, Zheng JA, Hughes JL, Will H. The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J Virol* 1992;66:106-14.

83. Guidotti LG, Chisari FV. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* 2000;273(2):221-7.

*Recibido en septiembre de 2009. Aprobado en enero de 2010.*