

Características fenotípicas de células T linfocitarias de tipo regulador (Treg) presentes en el hígado de pacientes con infección crónica por VHB (Phenotypic characterization of regulatory T lymphocytes (Treg) in livers from chronically HBV infected patients)

Danely Velázquez¹, Melise Milano², Pierina Petrosino², Asmiria Sotolongo², Luisa Barboza¹, Siham Salmen¹✉, Lisbeth Berrueta¹✉

¹ Instituto de Inmunología Clínica Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ² Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

[COMUNICACIÓN RÁPIDA]

Recibido: 05 de Junio de 2012. Aceptado: 13 de Julio de 2012.

Resumen

El virus de la hepatitis B (VHB) puede generar daños irreversibles en el hígado. En este trabajo se caracterizaron las poblaciones de células T reguladoras infiltrantes del hígado, en biopsias hepáticas de sujetos con infección crónica por el VHB. Se evidenció un incremento significativo ($p < 0,05$) del número de células T CD4+ que co-expresan FoxP3, IL-10 o TGF β en los individuos infectados crónicamente con el VHB, al compararse con los otros dos grupos estudiados. Este incremento se correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de ALT ($R=0,9$, $p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre los tres grupos cuando se evaluó a las poblaciones CD8+. Estos resultados pudieran contribuir a entender los eventos que conducen al fracaso de la respuesta inmune, asociado a reclutamiento de poblaciones de tipo supresor, que pudieran inhibir la respuesta efectora específica contra el VHB contribuyendo con la persistencia viral.

Palabras clave

Células T reguladoras, Hígado, Hepatitis, Virus de la Hepatitis B, Inmunohistoquímica.

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is responsible for irreversible liver damage. In this study we evaluated regulatory T cell that infiltrate the liver in hepatic biopsies from subjects with chronic HBV infection. Data showed a significant increase ($p < 0.05$) in the number of CD4 + T cells co-expressing FoxP3, IL-10 or TGF β , in HBV chronically infected patients, as compared with the other group of patients. This increase was positively correlated with plasma ALT levels ($R= 0.9$, $p < 0.05$). There were not significant differences between the clinical groups, when liver infiltrating CD8 + populations were evaluated. These findings may contribute to understand events leading to failure of the immune response associated with recruitment of suppressor-type populations, which could inhibit specific immune response against HBV, therefore contributing to viral persistence.

Keywords

T regulatory cells, Liver, Hepatitis, Hepatitis B Virus, Immunohistochemistry.

Introducción

Se estima que existen alrededor de 400 millones de portadores del virus de la hepatitis B (VHB) en el mundo (1). Tres cuartas partes de la población mundial viven en áreas de alta prevalencia de infección (\geq al 8%); el resto viven en regiones de baja prevalencia ($<$ del 2%) dentro de las que se destaca Venezuela (2). La infección crónica por el VHB tiene

consecuencias importantes que comprometen la calidad de vida, tales como: la fibrosis, cirrosis y/o el carcinoma hepatocelular (CHC) (3). Diversos mecanismos se han propuesto a fin de explicar el mecanismo involucrado en la persistencia viral y el desarrollo de la cronicidad (4,5), sin embargo, estos eventos no están del todo claros. Recientemente, se le ha dado relevancia a los mecanismos tolerogénicos, debido en parte a que se ha logrado evidenciar que proteínas del VHB, pueden favorecer el desarrollo de

células con fenotipo de células T reguladoras (Treg) (6-9).

El VHB puede causar inflamación hepática aguda o crónica caracterizada por infiltrado necroinflamatorio y de células mononucleares, y para lograr el control de la infección aguda se requiere de un balance entre la respuesta inmune T específica efectora/reguladora (10-12). En el caso de la infección crónica, las células T CD4+ y CD8+ específicas contra el VHB, muestran una respuesta significativamente reducida (11), algunas de estas se han descrito parcialmente tolerantes (13). Ésta hiporespuesta de células en individuos con infección crónica, es en parte consecuencia de una función alterada de las células dendríticas (CDs) (14) o por incremento de la expresión de PD-1 (un indicador de disfunción y supresión de linfocitos) en las células T específicas circulantes (15) y en biopsias de pacientes infectados crónicos, con incremento de las transaminasas e inflamación hepática (16-18).

Las células Treg están involucradas en la inhibición de la respuesta pro-inflamatoria (19) y en la tolerancia inmune periférica (20). Durante la infección crónica por el VHB los estudios de las células Treg han sido limitados e indican su participación activa en la supresión de la respuesta efectora específica anti-VHB (21-23). Los pacientes con infección crónica por el VHB tienen un alto porcentaje de células Treg en sangre periférica, asociado con la presencia en el suero del HBeAg (23) y son inducidas además en presencia del antígeno del core del VHB (7). Así, la frecuencia de células T CD4+CD25+ se correlaciona con los parámetros clínicos, virológicos e inmunológicos en pacientes infectados crónicos con el VHB (24), y con la severidad del daño hepático, lo que sugiere que la infiltración de células T CD4+CD25+FoxP3+ al hígado es secundaria al daño tisular (21) y al incremento de la replicación viral (25).

En este trabajo se propone que durante la inflamación crónica por el VHB, existen alteraciones en las poblaciones linfocíticas reguladoras, implicadas en la supresión de la respuesta inmune, que estarían condicionando la persistencia de la enfermedad hepática. Para tales propósitos se realizó la caracterización fenotípica de las poblaciones linfocitarias hepáticas, en biopsias de tejido de pacientes infectados crónicos con VHB, comparada con otras patologías hepáticas tanto agudas como crónicas. Los resultados evidencian la presencia de poblaciones de linfocitos CD4+ FoxP3+, productoras de IL-10 y TGFβ, en el hígado de los pacientes infectados crónicos por el VHB, poblaciones estas que estarían

comprometiendo la respuesta efectora específica encargada de erradicar la infección.

Metodología

Pacientes: 20 individuos fueron reclutados y divididos en 3 grupos: Grupo A: constituido por 6 pacientes infectados crónicos con el VHB; Grupo B: constituido por 10 pacientes portadores de patologías inflamatorias hepáticas crónicas de diversas etiologías: 3 con NASH (esteatohepatitis no alcohólica), 3 con cirrosis macronodular y 1 con cirrosis micronodular, 1 con inflamación crónica granulomatosa por TBC; 1 con procesos metastáticos y 1 con carcinoma hepatocelular (CHC); y Grupo C: denominado "grupo control" formado por 4 pacientes con procesos inflamatorios hepáticos agudos autolimitados, no relacionados con virus hepatotropos. Se obtuvo el consentimiento por escrito, siguiendo las normas de la comisión de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes. Se utilizaron los mismos criterios de inclusión para el grupo A descritos en la referencia 7. Estos pacientes además fueron evaluados desde el punto de vista clínico, bioquímico, virológico y serológico. Los estudios serológicos incluyeron: detección de HBsAg, anticuerpos contra el VHB, virus de la hepatitis C (VHC), citomegalovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de Epstein Barr (VEB) (Organon Teknike, Boxtel, NL, USA). En el grupo A, previa evaluación de los criterios de exclusión tales como: plaquetas por debajo de 100.000 cel/mL y tiempo de protombina > 3 segundos por encima del control, se procedió a obtener una biopsia hepática por punción percutánea con aguja "truCut" guiada por ultrasonido. En los pacientes del grupo B y C, el tejido hepático fue obtenido de bloques almacenados en el servicio de anatomía patológica, y previo consentimiento escrito de los pacientes, utilizado para el estudio.

Reactivos: anti-CD8 (clona C8/144B), anti-CD4 (clona MT310) y Diaminobenzidina (DAB) fueron obtenidos de DakoCytomation, Norden, Denmark. Los anticuerpos biotinilados anti-FoxP3, anti-IL-10, anti-TGFβ1, fueron adquiridos de R&D Systems, Minneapolis, USA. Los anticuerpos secundarios fueron adquiridos de Envision+ de Dako Cytomation y Vectastain Elite ABC de Vector Laboratories. El cromógeno Vector Nova Red de Vector Laboratories.

Procesamiento de las biopsias: El material obtenido de las biopsias hepáticas ya fijadas con formaldehído, fue incluido en parafina (26). Se realizaron cortes de 5 μm para tratarlos mediante tres

procedimientos distintos: tinción con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y reticulina, se realizaron también cortes de 3 μm para los procedimientos de inmunohistoquímica. Previo a realizar cualquier tinción, el tejido se desparafinó y se hidrató, pasando los cortes por xilol (27) y por etanol a concentraciones decrecientes (28). Una vez hidratados, los cortes se colocaron en láminas con solución de Hematoxilina, luego se diferenciaron mediante el paso por alcohol clorhídrico, finalmente se lavaron para continuar con la coloración con Eosina, deshidratación con etanol y xilol. Se cuantificaron al menos 3 espacios porta; donde fundamentalmente se evidenció el infiltrado inflamatorio y el estado de los sinusoides hepáticos. El índice de actividad histológica se realizó siguiendo los criterios de Ishak (29).

Tinción con tricrómico de Masson: siguiendo el procedimiento previamente descrito (28), las muestras desparafinadas se sumergieron en cloruro de mercurio, luego se tiñeron con hematoxilina de Harris y con solución de escarlata-fucsina ácida 1%. Después se trató con solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5% y con solución verde luz al 2%. Luego el tejido se trató con solución de ácido acético al 1% y se deshidrató y trató con xilol.

Tinción de reticulina: El tejido se sumergió en permanganato potásico al 1% y luego en metabisulfito potásico al 2%. Luego se agregó alumbre férrico al 2% y el reactivo de Wilder. Las muestras se impregnaron con formol al 10%, tratadas con cloruro de oro al 0,2%, y finalmente con metabisulfito potásico al 2% y tiosulfato sódico al 2%. Luego se realizó la deshidratación y aclarado final.

Inmunohistoquímica: Inicialmente se realizó la recuperación antigénica mediante incubación a 60°C por 1h, seguido de hidratación e inmersión en buffer citrato 10mM con 0,1% Triton-X100 por 15 minutos en microondas (30). Luego de bloquear la peroxidasa endógena (26), se incubaron con los anticuerpos primarios: anti-FoxP3 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-IL-10 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-TGF β (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2h, seguido por la incubación con los anticuerpos secundarios. Finalmente se añadieron los cromógenos para el primer sustrato: Nova RED. Luego se incubaron con los segundos anticuerpo primarios para detectar: CD4 (DAKO 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y CD8 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anticuerpo secundario (EnVision+). Esta reacción se reveló con el segundo sustrato (DAB) y luego se contratiñeron con Hematoxilina.

Análisis estadístico: Para el cálculo de la muestra se utilizó el programa Statgraphics Centurion

XV Version 15.1.02. Venezuela es considerada como una zona de prevalencia intermedia a baja (2-4% y <2%) para la infección crónica por VHB (31), por lo que se consideró utilizar 2% como la prevalencia de la infección crónica por el VHB en nuestra región. Con un nivel de confianza de 95%, el programa indicó que el número mínimo a evaluar era de 6 sujetos infectados crónicos (ver figura 1a). Los datos se expresaron como promedios \pm intervalo de confianza (IC). Los resultados se analizaron mediante el uso del software GraphPad Prism 5, a fin de determinar diferencias estadísticamente significativas, un valor de $p < 0,05$, fue considerado como significativo.

Resultados

Se pudo evidenciar la presencia de infiltrado mononuclear en los espacios porta, en los pacientes con hepatitis crónica, además de la imagen característica de hepatitis B, como lo es hepatocitos en vidrio esmerilado (figura 1b). Se evidenció además que con la excepción de un paciente del grupo B (fibrosis grado 1), ninguno de los individuos reclutados para el estudio tenía fibrosis. Solo uno de los pacientes mostró grado 5 de progresión de la enfermedad, según el índice modificado por Ishak, mientras que el resto de los integrantes del grupo estaban en estadio 0 de la enfermedad.

Los pacientes infectados con VHB muestran predominio de linfocitos con fenotipo regulador a nivel hepático: Por cada uno de los sujetos del estudio se procesaron 12 láminas y se evidenció que en los cortes de hígado de los individuos del grupo A, la población de linfocitos CD8+ predomina en los cortes de hígado, cuando se comparan con los otros dos grupos (ver figura 1c y e), mientras que los linfocitos CD4+ se observan con mayor frecuencia en los individuos del grupo B (ver figura 1d y f). En ninguno de los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se evaluó el fenotipo de las subpoblaciones presentes en el tejido hepático, se evidenció que a diferencia del grupo B y C, el fenotipo regulador en la población CD4+ solo fue detectado en el grupo A, con diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (ver figura 2; $p < 0,05$). En el caso de los linfocitos T CD8+ con fenotipo regulador, se muestra un porcentaje inferior al 3% sin diferencias significativas entre los grupos estudiados (ver figura 3a y b).

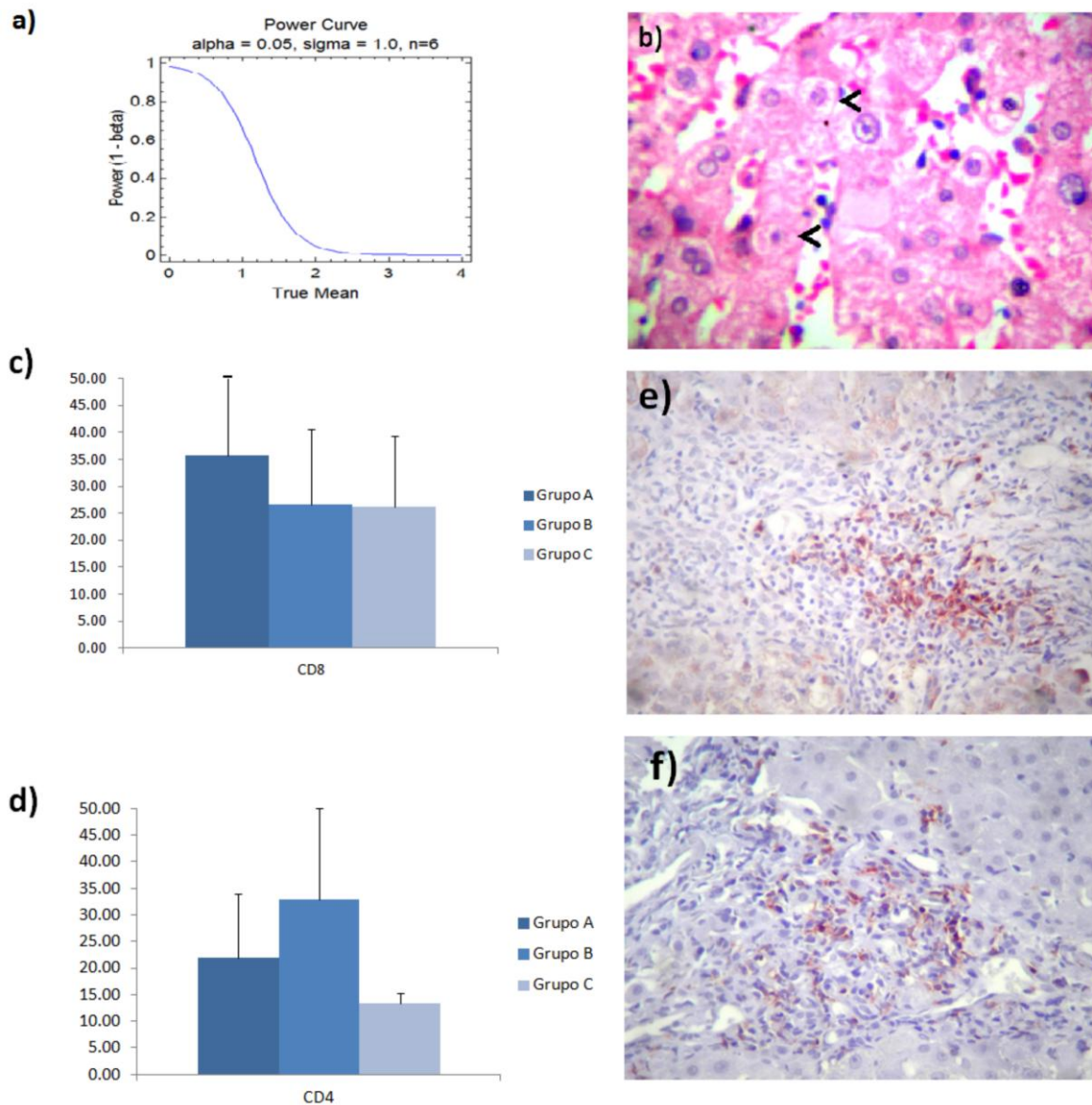


Figura 1. a) Muestra el análisis del cálculo de la “n” muestral. b) Muestra el tejido hepático teñido con Hematoxilina eosina (40X), las flechas indica imagen en “vidrio esmerilado”, en biopsia de un paciente con hepatitis B crónica. c y d muestran la cuantificación del porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ presentes en el hígado en los tres grupos evaluados. c) Representa el porcentaje de linfocitos CD4+ presentes en el hígado de los pacientes del grupo A, B y C, respectivamente. Los datos son representados como media ± intervalos de confianza (IC). d) Representa el porcentaje de linfocitos CD8+ presentes en el hígado de los pacientes del grupo A, B y C, respectivamente. Los datos son representados como media ± intervalos de confianza (IC). e) y f) Son imágenes representativas de inmunohistoquímica del grupo A, donde se muestran poblaciones CD4+ (e) y CD8+ (f).

Existe una correlación positiva entre los niveles de ALT y la presencia de linfocitos CD4+ supresoras en las biopsias de pacientes con infección por VHB crónica: Se correlacionaron los niveles de cada una de las subpoblaciones con el grado de inflamación hepática y la carga viral. Se detectó una correlación positiva entre los valores de ALT y la presencia de células CD4+IL-10+, CD4+ FoxP3+ y

CD4+TGFβ+; en la tabla 1 se muestran los coeficiente de correlación. Esto no fue así, cuando se correlacionó los niveles de ALT con el porcentaje de células CD8+, ni con la expresión total de FoxP3, IL-10 y TGFβ. No se evidenció correlación entre los niveles de carga viral con la presencia del Treg en el hígado (datos no mostrados).

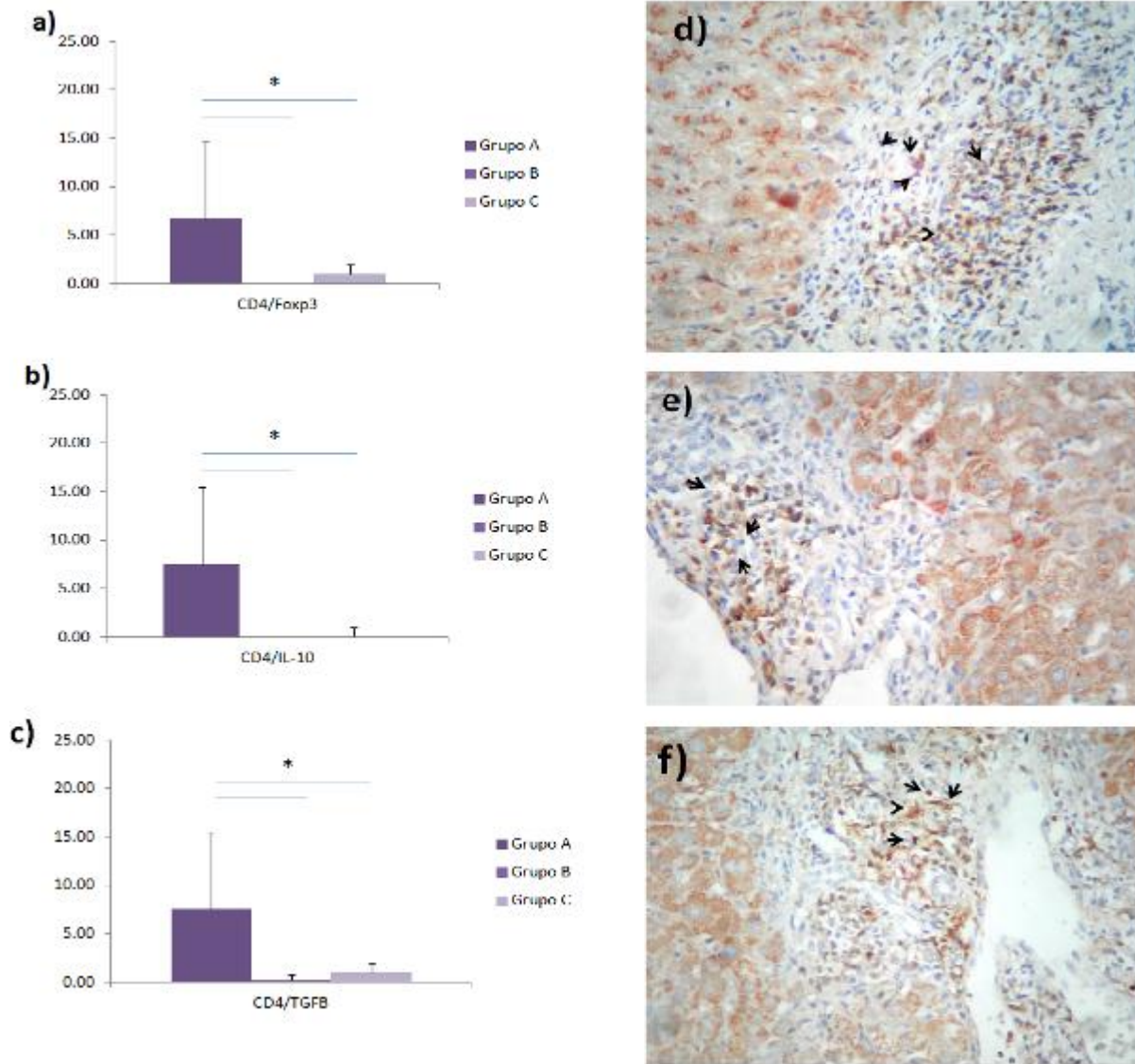


Figura 2. Cuantificación del porcentaje de linfocitos CD4+, Foxp3+, IL-10+ y TGFβ+ presentes en el hígado de los pacientes de los tres grupos evaluados. a) Representa el porcentaje de linfocitos CD4+Foxp3+ presentes en el hígado de los pacientes del grupo A, B y C, respectivamente. Los datos son representados como media ± IC. b) Representa el porcentaje de linfocitos CD4+IL-10+ presentes en el hígado de los pacientes del grupo A, B y C, respectivamente. Los datos son representados como media ± IC. c) Representa el porcentaje de linfocitos CD4+TGFβ+ presentes en el hígado de los pacientes del grupo A, B y C, respectivamente. Los datos son representados como media ± IC. d), e) y f) Son imágenes representativas de la inmunohistoquímica del grupo A, donde se muestran poblaciones CD4+Foxp3+ (d), CD4+IL-10+ (e) y CD4+TGF-β+ (f).

Discusión

En este trabajo se evidenció que los individuos infectados crónicamente con el VHB, muestran un incremento de poblaciones CD4+ con fenotipo regulador: FoxP3+, IL-10+ y TGFβ+, alojadas en el tejido hepático; estas subpoblaciones no fueron observadas en los individuos con cuadros de inflamación hepática crónica por otras causas

diferentes a la viral, o con cuadro inflamatorio agudo autolimitado. La presencia de estas subpoblaciones supresoras en el hígado pudiera estar asociada con la limitación de la respuesta inmune específica anti VHB, contribuyendo así con la persistencia viral, y paradójicamente asociado con el grado de inflamación, ya que la presencia de linfocitos FoxP3+ se correlacionó positivamente con los niveles de ALT, hallazgo este que concuerda con estudios previos (32). De hecho, se ha descrito que el nivel de FoxP3

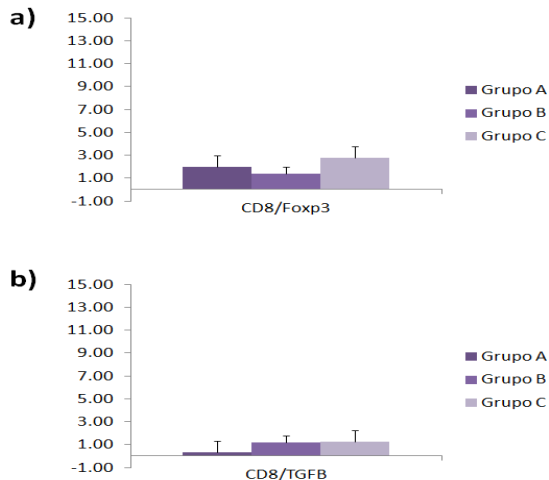


Figura 3. Cuantificación del porcentaje de linfocitos CD8+, Foxp3+ e IL-10+ presentes en el hígado de los tres grupos de pacientes evaluados. 3a. Representa el porcentaje de linfocitos CD8+Foxp3+ presentes en el hígado de los pacientes del grupo A, B y C, respectivamente. 3b. Representa el porcentaje de linfocitos CD8+IL-10+ presentes en el hígado de los pacientes del grupo A, B y C, respectivamente.

intrahepático, se ha asociado positivamente con el grado de daño del hígado en pacientes infectados, bien sea por VHC o por VHB (33). A pesar de que se trata de un número limitado de pacientes, en este estudio se pone en evidencia que citocinas como IL-10 y TGFβ, pudieran también estar implicadas en el proceso inflamatorio a nivel hepático observado en este grupo de pacientes, debido a que también se correlacionaron con los niveles de ALT séricos. Siendo el hígado un órgano altamente tolerogénico e inmunoprivilegiado, el desbalance entre las funciones supresoras y efectoras, puede contribuir a la persistencia de los agentes virales, producto de que altas concentraciones de IL-10 o TGFβ, que mantienen a las células dendríticas en estado inmaduro (34), favorecen la polarización de células T CD4+ residentes o infiltrantes hacia células Tr1 (35), perpetuando la supresión de la respuesta antiviral, al limitar el desarrollo de una respuesta T efectora efectiva.

Aún no se ha definido claramente, el papel de las Treg durante la infecciones virales hepáticas, algunos autores sostienen que su papel está determinado por la supresión de la respuesta de células T dirigidas contra los virus hepatotropos,

Tabla 1. Coeficiente de correlación de Pearson entre los valores de ALT y el porcentaje de linfocitos T CD4.

Correlación	R	Valor de p
ALT-CD4	0,672	0,05
ALT-CD8	0,007	0,70
ALT-CD4Foxp3	0,862	0,05
ALT-CD4IL-10	0,995	0,04
ALT-CD4TGFβ	0,880	0,05

mientras que otros sugieren que su papel es protector debido a que contribuyen con el control de la respuesta inmune, responsable del daño en el tejido hepático (36). Se ha tratado de caracterizar el perfil de CD4+CD25+Treg en los diferentes estadios de la infección, mostrándose un aumento de las Treg en la periferia y en el hígado de pacientes con enfermedad crónica severa (37) y se ha considerado además como un factor de riesgo importante en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (38). No obstante, el papel de las Treg en la progresión de la enfermedad sigue aun sin precisarse ya que el uso de terapia antiviral, no conduce a la normalización de la respuesta inmune, ni a la reducción de las Treg intrahepáticas.

En conjunto, los estudios sugieren que todavía queda mucho por definir sobre el papel de las células T reguladoras durante las hepatitis virales. Por ejemplo, poco se sabe acerca de sí las Treg en sangre periférica o en el hígado, son fenotípica y/o funcionalmente idénticas, y sí su participación en la patogénesis de la hepatitis B, puede variar acorde con sus actividades funcionales, por lo que son necesarios estudios más puntuales, que incluyan además un mayor número de pacientes, a fin de profundizar en el papel de las poblaciones linfoides reguladoras, en la progresión de la enfermedad hepática que permita idealmente, proponer nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan a anticipar y controlar el daño hepático secundario a la infección viral persistente.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado a través del CDCHTA-ULA código M-1026-12-07-B.

Referencias

1. Lok AS, McMahon BJ. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-41. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Vryheid RE, Kane MA, Muller N, Schatz GC, Bezabeh S. Infant and adolescent hepatitis B immunization up to 1999: a global overview. *Vaccine* 2000; 19: 1026-37. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Ferrari C, Missale G, Boni C. Immunopathogenesis of Hepatitis J. *Hepatology* 2003; 39: S36-42. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Bertoletti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res* 2003; 60: 61-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Berrueta L, Salmen S. Immune tolerance at 50 years from the Nobel Prize in Medicine and Physiology: a perspective as a mechanism of immune response against pathogens. *Invest Clin* 2010; 51:159-92. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Chang J, Lewin, S. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 16-23. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Barboza L, Salmen S, Goncalves L, Colmenares M, Peterson D, Montes H, Cartagirone R, Gutierrez MD, Berrueta L. Antigen-induced regulatory T cells in HBV chronically infected patients. *Virology* 2007; 368:41-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Goncalves L, Barboza L, Albarrán B, Salmen S, Montes H, Hernández M, Berrueta L. Pattern of T cell activation in absence of protective immunity against hepatitis B virus. *Invest Clin* 2006; 47: 83-96. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Barboza L, Salmen S, Peterson DL, Montes H, Colmenares M, Berrueta L. Altered T cell costimulation during chronic hepatitis B infection. *Cell Immunol* 2009; 257:61-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee H, Schlich H, Fowler P, Guillhot S, Chisari F. HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10445-49. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Sprengers D, van der Molen RG, Kusters JG, De Man RA, Niesters HG, Schalm SW, Janssen HL. Analysis of intrahepatic HBV-specific cytotoxic T-cells during and after acute HBV infection in humans. *J Hepatol* 2006; 45: 182-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, AmLot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertoletti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32: 1117-24. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002; 195:1089-101. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109:487-95. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE, Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 2006; 80:3532-40. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Xie Z, Chen Y, Zhao S, Yang Z, Yao X, Guo S, Yang C, Fei L, Zeng X, Ni B, Wu Y. Intrahepatic PD-1/PD-L1 up-regulation closely correlates with inflammation and virus replication in patients with chronic HBV infection. *Immunol Invest* 2009; 38:624-38. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology* 2009; 50: 1625-37. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Chen J, Wang XM, Wu XJ, Wang Y, Zhao H, Shen B, Wang GQ. Intrahepatic levels of PD-1/PD-L correlate with liver inflammation in chronic hepatitis B. *Inflamm Res* 2011; 60:47-53. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Akdis M, Blaser, K, Akdis, CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 961-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193:1303-10. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Franzese O, Kennedy P., Gehring A, Gotto J, Williams R, Maini M, Bertoletti A. Modulation of the CD8+T-cell response by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79:3322-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I, Nanji A, Yuen ST, Williams R, Naoumov NV. Resolution of Chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122:614-24. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41:771-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Blomhoff R, Blomhoff, H.K. Overview of retinol metabolism and function. *J Neurobiol* 2006; 66: 606-30. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Zhang M, Zhou J, Zhao T, Huang G, Tan Y, Tan S, Fu X, Niu W, Meng G, Chen X, Shang X, Liu D, Ni B, Wang L, Wu Y. Dissection of a Circulating and Intrahepatic CD4+ FoxP3+ T-Cell Subpopulation in Chronic Hepatitis B Virus (HBV) Infection: A Highly Informative Strategy for Distinguishing Chronic HBV Infection States. *J Infect Dis* 2012; 205: 1111-20. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Iwata M, Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., Song, S.Y. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004; 21:527-38. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Jin YM, Yun C, Park C, Wang H, Cho H. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. *J Viral Hepatol* 2001; 8:322-30. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Oviedo MM. Morbimortalidad fetoneonatal relacionada con diabetes y embarazo y sus variaciones histomorfológicas placentarias, 2010. [[Google Scholar](#)]
29. Brunt EM. Grading and staging the Histopathological lesions of chronic

- hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000; 31:241-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
30. Joosten SA, Ottenhoff TH. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Human Immunol* 2008; 11: 760-70. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
31. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 2012; 30:2212-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
32. Miyaaki H, Zhou H, Ichikawa T, Nakao K, Shibata H, Takeshita S, Akiyama M, Ozawa E, Miura S, Eguchi K. Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients. *Liver Int* 2009; 29:702-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
33. Speletas M, Argentou N, Germanidis G, Vasiliadis T, Mantzoukis K, Patsiaoura K, Nikolaidis P, Karanikas V, Ritis K, Germanis AE. FoxP3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 827565. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
34. Crispe I, Giannandrea M, Klein I, John B, Sampson B, Wuensch S. Cellular and molecular mechanism of liver tolerance. *Immunol Rev* 2006; 213:101-18. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
35. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:804-13. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
36. Alatrakchi N, Koziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. *J Viral Hepat* 2009; 16:223-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
37. Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-47. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
38. Wang F, Jing X, Li G, Wang T, Yang B, Zhu Z, Gao Y, Zhang Q, Yang Y, Wang Y, Wang P, Du Z. FoxP3+ regulatory T cells are associated with the natural history of chronic hepatitis B and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012; 32:644-55. [\[PubMed\]](#)

Como citar este artículo: Velázquez D, Milano M, Petrosino P, Sotolongo A, Barboza L, Salmen S, Berrueta L, Características fenotípicas de células T linfocitarias de tipo regulador (Treg) presentes en el hígado de pacientes con infección crónica por VHB. *Avan Biomed* 2012; 1: 60-7