

# Aspectos inmunológicos e inmunogenéticos de la hepatitis B

## Evolución histórica

Antonio Iglesias, Eduardo Egea

De las hepatitis virales, la hepatitis B es la más frecuente en USA y desde 1983 sobrepasó la incidencia de la hepatitis A.

Desde 1971, se propuso una vacuna para la hepatitis B (HBV), pero sólo pudo ser efectiva a comienzo de 1980, al lograr preparar una vacuna de antígeno de superficie (HBs Ag), extraída de individuos portadores crónicos (Heptavax-B). Posteriormente en 1984, se ha venido utilizando la vacuna contra HBV producida en la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando para ello la técnica del DNA recombinante. Ambas vacunas además de ser efectivas y seguras han demostrado ser inmunogénicas en el 85-96% de los hombres homosexuales y en el 96% al 98% de adultos sanos empleados en centros de hemodiálisis.

En varios estudios utilizando ambos tipos de vacunas se ha logrado demostrar que entre el 5% al 10% de los individuos aparentemente sanos, no tienen una respuesta adecuada en cuanto a la producción de anti-HBs, a pesar de reinmunización con una o dos dosis adicionales.

Además del costo y de la información adversa que circuló en los medios académicos sobre la posibilidad de adquirir el SIDA a través de la vacuna derivada del plasma, se implementó el desarrollo de la vacuna a través de la técnica del DNA recombinante utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el gene que codifica el serotipo adw2 del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Así de esta forma Smith Kline Biological desarrolló la vacuna denominada ENGERIX-B. Actualmente el Instituto de Biotecnología de Cuba también ha desarrollado una vacuna contra la hepatitis B a través de la técnica del DNA recombinante.

El comportamiento de la vacuna de la hepatitis B a nivel de estudios in vitro tanto en el murino como en el humano es importante para entender la respuesta inmunitaria inducida por esta vacuna y su relación con la inmunogenética. Para ello es importante puntualizar algunos conceptos generales para mejor comprender los estudios básicos desarrollados con esta vacuna.

Desde comienzo de la década del 70, Benacerraf y Mac Devitt, demostraron que los genes de clase II del C.M.H. determinaban la respuesta de los linfocitos T a antígenos específicos.

Posteriormente Rosenthal y Shevach demostraron que los linfocitos T solamente reaccionan a antígenos

---

Dr. Antonio Iglesias: Profesor Asistente de Medicina Interna y Reumatología, Universidad Nacional de Colombia. Director General Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá; Dr. Eduardo Egea: Director Sección de Inmunología, Universidad del Norte, Barranquilla.

extraños, si éstos son presentados por células del sistema monocito-macrófago llamadas células presentadoras de antígeno. Simultáneamente Katz, Hamoaka, Dorf y Benacerraf observaron que la respuesta de las células T cooperadoras y las células B, está restringida por las moléculas Ia. Las células T cooperadoras tienen un papel regulatorio del sistema inmune y son necesarias para la inducción de células T citotóxicas y para la producción de anticuerpos a antígenos proteicos, la inducción de respuesta anamnésica para la producción de anticuerpos a antígenos proteicos, la inducción de respuesta anamnésica para la producción de anticuerpos por las células B, y actúan como célula efectora en la muerte de blancos tumorales por una vía directa o indirecta a través de la secreción de linfoquinas o Gamma Interferon. Todo lo anterior determina cierta especificidad de los linfocitos T al interactuar con las moléculas de clase II sobre el MØ y condiciona la respuesta de acuerdo con el haplotipo a determinados antígenos (solubles, proteínas, partículas virales, etc.). Cinco tipos de explicaciones han sido propuestas para determinar la respuesta o no a determinados antígenos:

1. La primera propuesta es la de Rosenthal y Benacerraf quienes postulan el concepto de la selección determinante, es decir, que la interacción de las moléculas Ia con determinados antígenos sobre la superficie celular de las células presentadoras de antígenos posee ciertas restricciones a nivel de la orientación de las moléculas en su capacidad para unirse al receptor de las células T.

2. La segunda propuesta es la planteada por Jerne, Von Boehmer y modificada por Schwartz y es que la respuesta a determinados antígenos es el resultado de la delección clonal en el proceso de diferenciación de las células T.

3. El tercer concepto es el de la Inmunodominancia de Berzofsky, en el cual la respuesta de las células T a determinado antígeno proteico depende del número de sitios antigénicos que pueden ser presentados por las moléculas de clase II y de la habilidad para unirse a la molécula del TCR.

4. Defecto en el procesamiento del antígeno.

5. Defecto estructural en la unión del TCR y molécula de clase II.

Las alteraciones anteriores en la respuesta adecuada o no ante un antígeno determinado se han podido observar cuando existe una disminución de la respuesta proliferativa a antígenos específicos y lectinas que ocurre en pacientes con una serie de infecciones y en individuos normales que han sido vacunados con dichos patógenos. Un defecto en la no respuesta a diferentes antígenos y productos patogénicos ha sido descrito con el virus de la Inmunodeficiencia tipo I (HIV - I), con la glicoproteína de su envoltura, con el antígeno

HBs Ag, con la vacuna para el HBV (Heptavax-B), con productos bacterianos del *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* y sus toxinas, *Bordetella pertusis*, *Mycobacterium ulcerans*, parásitos con *Toxoplasma gondii*, muchas de las explicaciones realizadas por los diferentes autores están relacionadas por un efecto citotóxico directo o se debe a la inducción de células o mecanismos supresores.

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

Sasazuki y col. han demostrado en la población japonesa, que existe una serie de individuos sanos que no responden a la *Criptomeria japonicum* al antígeno de la pared del estreptococo, al antígeno de *Schistosoma japonicum* y dicha falta de respuesta a estos antígenos según Sasazuki y col. estaba controlada por los genes de supresión asociada al HLA, vía células CD8. A nivel del murino, Milich y Chisari en 1982 han demostrado que la respuesta baja o la ausencia de respuesta al HBs Ag estaba directamente relacionada con los haplotipos H-2.

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

La respuesta o falta de respuesta proliferativa al HBs Ag se encuentra restringida a nivel de los antígenos de clase I y especialmente a nivel de los antígenos de clase II.

Celis y Chang estudiaron en 1984 la respuesta proliferativa de los linfocitos de individuos vacunados contra HBs Ag *in vitro*. Para ello utilizaron dos clones (HBC-6 y HBC-13) de linfocitos T cooperadores específicamente contra HBs Ag y demostraron la respuesta proliferativa de dos o tres días de incubación con el HBs Ag a una concentración de 5 ( $\mu\text{g/ml}$ ) y simultáneamente le agregaban el anti-HBs a una concentración de 20 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Utilizando tanto el antígeno como el anti-HBs obtenían una respuesta proliferativa adecuada. El mismo grupo demostró que 10 días después de la tercera inmunización, al realizar un estudio de proliferación celular con el HBs Ag a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  por siete días, suplementando el medio de cultivo con IL-2 encontraron que seis de 12 individuos tenían una alta respuesta proliferativa pero que en dos de los individuos vacunados esto fue insignificante.

La respuesta de célula B, analizada por el método de P.F.C. (plaque-forming antibody secreting cells) *in vitro*, demostró sólo de 5 a 15 placas después de siete a diez días de inmunización *in vitro*, por este escaso número de placas fue difícil demostrar una relación dosis/respuesta. Llama la atención que en este estudio de proliferación celular se mencionan varias concentraciones de HBs Ag, no claramente indicadas, que la respuesta proliferativa no se correlaciona con la producción de antígenos HBs *in vitro* en los individuos vacunados. No realizaron controles con antígenos solubles o leclina. ni se conocía el haplotipo de los individuos. Cupps y col. a pesar de que demostraron un incremento en la producción de anti-HBs IG *in vitro*, no encontraron evidencia de supresión no específica para HBs Ag. Nuestro estudio fue realizado en individuos a los cuales se les conocía su haplotipo y se inició el estudio tratando de buscar una dosis adecuada que indujera una buena proliferación celular. Encontramos que con 0.2  $\mu\text{g/ml}$  se inducía mayor capacidad proliferativa, al incrementar la dosis a un [ $\mu\text{g/ml}$ . cinco a diez ( $\mu\text{g/ml}$ ). la respuesta decrecía, por lo que planteamos la posibilidad de que a mayor concentración de antígeno pudiese tener un efecto tóxico. Logramos demostrar que la especificidad de la respuesta de células T al HBs Ag era T específico, ya que al evaluar en forma simultánea en un estudio kinético (tercer día, quinto, séptimo y noveno días) utilizando para ello otro antígeno soluble con el TT y las lectinas como PWM y PHA, nuestros sujetos no respondedores no lo hacen al HBs Ag, pero sí a los otros antígenos como TT, PHA y PNM, excepto en uno de los casos, que es bajo respondedor al TT.

Los respondedores al HBs Ag respondieron en forma creciente al HBs Ag, pero disminuyó la respuesta al TT al séptimo y noveno días y al PHA al quinto y séptimo días. Respecto al PWM la respuesta es variable, lo que nos demuestra que nuestros individuos respondedores tienen una respuesta específica al HBs Ag. Pero la respuesta tanto al HBs Ag como al TT y a las lectinas tiene variabilidad individual.

Al realizar los experimentos de proliferación de células T al HBs Ag por el método de depleción de las células, CD8+, tratando de analizar la falta de respuesta al HBs Ag, hemos utilizado el método de Panning. Las células T que habían sido depletadas de CD8, al mezclarla con los macrófagos y cultivadas posteriormente con y sin el HBs Ag, TT y las lectinas como PHA y PWM, la respuesta de los respondedores a los diferentes antígenos solubles y lecitinas fue adecuada. Todos los individuos tanto respondedores como no respondedores respondieron bien al PHA, pero en los no respondedores la respuesta al PHA es mayor que en los respondedores. La respuesta al PHA se disminuye al séptimo día, tanto en los respondedores, como en los no respondedores; esta respuesta coincide con los trabajos de Filion y col.

Al adicionar las células CD8+, los no respondedores al HBs Ag no tuvieron respuesta proliferativa a diferencia de los respondedores especialmente en uno de ellos, la respuesta proliferativa fue bastante alta. Sólo en uno de los respondedores encontramos que al adicionar las células CD8T+, la respuesta proliferativa al séptimo día al TT en la reconstitución se disminuía.

Estos experimentos demuestran que las células CD8+, 1. No interfieren en la respuesta al HBs Ag en los individuos respondedores, 2. Demuestra una especificidad en la respuesta al HBs Ag, 3. La respuesta proliferativa no depende del número absoluto del CD8 y CD4, ya que se utilizó el mismo número de células y la respuesta fue variable de acuerdo al individuo, 4. La respuesta proliferativa en los respondedores al HBs Ag, al TT y a las lectinas fue adecuada, 5. No se encontró respuesta al HBs Ag en los no respondedores, pero sí hubo respuesta adecuada al TT y a las lectinas, 6. La variabilidad de las respuestas tanto en los no respondedores como en los respondedores al HBs Ag, al TT y a las lectinas se observó en los experimentos de depleción al séptimo día como en la respuesta kinética (al tercer, quinto, séptimo y noveno días), 7. Nuestros resultados difieren de los reportados por Tremolada y col., Barnaba y col., Filion y col., Sasasaki y col., quienes demuestran por diferentes técnicas que la falta de respuesta al HBs Ag se debe a trastornos en la inmunorregulación, mediados por genes de inmunosupresión, o a través de las células CD8+.

A pesar de los diferentes trabajos realizados tratan-

do de explicar el mecanismo de no respuesta por un defecto inmune mediado por células o mediadores solubles como los realizados por Dusheiko y col. quienes analizaron si existía un defecto a nivel de los linfocitos T de los individuos portadores crónicos, para ello estudiaron linfocitos *in vitro* de individuos portadores crónicos. Hicieron experimentos de co-cultivos, utilizando linfocitos T irradiados de individuos controles portadores crónicos de HBs Ag y se cultivaron con linfocitos B de respondedores alogénicos. Demostraron que las células B respondedoras al HBs Ag producen cantidades detectables de IgG anti-HBs cuatro y ocho días después del cultivo, pero si tomaban linfocitos T de individuos portadores crónicos de HBs Ag+ y le agregaban células de respondedores anti HBs, en ocho de 24 portadores crónicos no se encontró producción de anti HBs. Dusheiko y col. plantean en este estudio que posiblemente existe un defecto en las células T cooperadoras, en incrementar la producción de anti HBs. Pero los autores no separaron subpoblaciones y además no conocían el haplotipo de los individuos. Otros estudios sobre los mecanismos funcionales de tipo celular en hepatitis son contradictorios; Tremolada y col. en 1980, Chisari y col. en 1981 encontraron un defecto en la inducción de proliferación celular. Chang y col. demuestran que la respuesta proliferativa al HBs Ag es dependiente de T ya que al tomar PBLs (linfocitos de sangre periférica) y depletarlos de rosetas E+ con anticuerpos monoclonales OKT3 y complemento no encontraban proliferación. Chisari y col. en 1981 no encontraron una alteración de las células efectoras citotóxicas. Hanson y col. en 1984 demostraron una alteración de la respuesta inmunitaria especialmente de tipo celular y no encontraron una respuesta proliferativa en individuos que son portadores crónicos al HBs Ag. Barnaba y col. han demostrado una reducción de las células OKT4+ y una disminución de la relación OKT4/OKT8 en pacientes con infección crónica por el HBV, comparado con individuos controles. Al utilizar experimentos de co-cultivos alogénicos entre linfocitos B y linfocitos T que son respondedores en la producción de anticuerpos, encontraron un defecto de las células B. El mismo grupo demostró que la eliminación de las células CD8T+ incrementaba la respuesta proliferativa al HBs Ag pero no se afectaba la respuesta a PPD o a Candida y dicha respuesta no se afectaba al depletarlo de CD4+. No utilizaron el método de panning, ni tampoco se conocía el haplotipo de estos individuos. Filion y col. plantean también la posibilidad de que las células CD8T+ controlan la magnitud de la respuesta blastogénica al HBs Ag y posiblemente participen en el down-regulating de la respuesta anti HBs. Nowicki y col. demostraron que los no respondedores tenían un incremento en el porcentaje de células T11+, HNK-1 +

y T8 por inmunofluorescencia; nosotros no encontramos diferencia entre los respondedores y no respondedores en cuanto a las subpoblaciones CD8, ni en las subpoblaciones CD4, tales como 4B4 y 2H4.

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

Yamauchi y col. observaron que la supresión de la producción de anticuerpos en los portadores crónicos se debe a la presencia de un factor supresor. Chion y col. y el mismo Yamauchi demuestran que en las etapas tempranas dos semanas después de la última vacunación, el defecto de la no respuesta se debe a una alteración del repertorio de las células B, y en una etapa más tardía, cuatro semanas después de la última vacunación la carencia de respuesta se debe a la existencia de células T supresoras.

A pesar de que el estudio de las citoquinas y producción de anti-HBs y proliferación celular no son claros en sus conclusiones, tanto la IL-2 como el receptor de la IL-2 (TAC) juegan un papel importante en la activación y regulación de la respuesta inmune. Normalmente las células T en reposo no expresan significativamente esos receptores sobre la superficie. Sin embargo, cuando estas células son estimuladas por mitógenos o antígenos, el receptor de IL-2 se expresa en la membrana celular y además el péptido 55-k da a TAC positivo, puede ser liberado en el sobrenadante. Algunos estudios han probado que el péptido TAC (IL-2 receptor) soluble se encuentra elevado, tanto en los individuos con HBV aguda como en los pacientes con hepatitis crónica. Estos hechos sugieren que la activación de las células T podrían jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

Finalmente, estudios recientes han demostrado que el péptido SI y el antígeno pre-SI son altamente inmunogénicos y demuestran una gran actividad proliferativa, lo que estará de acuerdo a la teoría de la inmunodominancia.

Después de analizar nuestros resultados y estudiar las diferentes publicaciones con respecto a la producción *in vitro* de anticuerpos, proliferación celular, los estudios de inmunorregulación y los estudios de depleción celular, nuestros hallazgos demuestran que la no respuesta al HBs Ag obedece a un mecanismo de restricción periférica como lo demostraron Craven y col. y Alper y col., y no está relacionado con mecanis-

mos de genes de supresión ni a través de las células CD8T+, sino que la falta de respuesta se encuentra en la interacción Ag-macrófago y células CD4T+ y esta carencia de respuesta es de tipo multi-factorial (inmunogenética, teoría de la inmunodominancia, defecto en el procesamiento antigénico, delección del repertorio en la diferenciación temprana de las células T que inducirían un defecto estructural en la unión del receptor de las células T y la molécula de clase II, lo que no está definido es la subpoblación implicada, tales como CD45 y CD29.

La respuesta y no respuesta al HBs Ag también se encuentra restringida a nivel de los antígenos de clase I y II. La frecuencia de los antígenos de clase I en tres estudios, realizados en la población caucásica, en los no respondedores al HBs Ag se ha asociado al B8 y en la japonesa al BW54. Walker y col. mostraron un incremento de DR7 en el 61% y una ausencia del Drl entre los no respondedores. Weissmann y col. mostraron una alta prevalencia de DR7, Dr3; Dr7, Dr4; y Dr7+ B8 y no haplotipos extendidos en los no respondedores. Graven y col. demuestran una alta incidencia de Dr3 y a la vez dos haplotipos extendidos (HLA B8- DR3- SC01 y el HLA-B44 - DR7 - F.

Alper y col. demuestran por primera vez en el humano que personas homocigotas para el haplotipo extendido HLA B8-DR3-SC01 tienen una pobre respuesta al HBs Ag y es de carácter recesivo, además demuestran que un solo haplotipo que se herede como dominante es suficiente para tener una respuesta adecuada anti HBs. Este estudio está en contraposición a los realizados por Sasasaki y col. quienes postulan que el haplotipo japonés HLA-BW54 - DR4 - DRW53 y DQW3 que se asocia a los no respondedores del HBs Ag es de carácter dominante y a la vez la no respuesta depende de un gene de inmunosupresión a través de las células CD8.

Finalmente nuestros resultados indican que los sujetos no respondedores tienen un defecto específico a nivel de la presentación antigénica sobre la estimulación de las células T cooperadoras y nuestras evidencias sugieren que esta ausencia de respuesta a la vacuna de la hepatitis B no es mediada por mecanismos de supresión a través de las células CD8T. Lo que no hemos podido identificar es la subpoblación DC4T tales como la CD29T o la CD45T. Este defecto a nivel de la presentación antigénica ( $M\emptyset$ ) o a nivel de las células CD4T es consistente con la herencia recesiva a nivel de la no respuesta y sugiere que la respuesta se hereda en forma dominante.

#### ABSTRACT

The most common cause of viral hepatitis in USA is the hepatitis B virus, and since 1983 is more common

than hepatitis A. In 1980 a serum derived hepatitis B vaccine was evaluated and introduced to clinical practice. The fear of HIV transmission leads to the development in 1984 of a recombinant vaccine produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through DNA recombinant techniques. Both vaccines have been proved effective and safe, with seroconversion in 85-96% of homosexual males and 96-98% of healthy adults. Several recent studies have shown that 5-10% of healthy adults fail to respond to the vaccine, even after additional dosages.

The mechanism for this lack of Anti-HBs response has been extensively studied by several groups and associated to the major histocompatibility antigens in relationships with T lymphocytes responses to specific antigens. Recent studies have demonstrated that the lack of response to the HBsAg is due to a mechanism of peripheral restriction previously shown by Crave, Alpert et al, and not related to gene suppression nor through CD8T+ cells. The absence of response is secondary to the macrophage-antigen interaction and CD4T+ cells and is also multifactorial. Studies in caucasian populations have shown that poor responders to hepatitis B vaccines have certain haplotypes such as: B8, Dr7, Dr3, Dr7, Dr4 and Dr7+ B8. Alpert et al have shown for the first time in humans that persons homozygous for extended haplotype, HLA B8-DR3-SC01, have a poor response to a HBsAg and is recessive. Only one haplotype is sufficient to have an adequate Anti-HBs response. Sasasaki et al. in contrast have shown that Japanese haplotype HLA-BW54-DR4-DRW53 and DQW3 is associated to poor response to HBsAg, and is dominant, they also suggest that lack of response depends of an immunosupresion gene through CD8 cells.

Finally our results suggest that no responders have a specific defect located to the level of helper T cells stimulation, and is not mediated through immunosupresion through CD8T cells.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Alper CA, Kruskall MS, Marcus-Bagley D, Craven DE, Katz AJ, Brink SJ, Dienstag JL, Awdeh Z, Yunis EJ. Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. *N Engl J Med* 1989; 321: 708.
2. Arora PK, Sekura RB, Hanna EE. Suppression of the cytotoxic T lymphocyte response in mice by pertussis toxin cell. 1987; 110: 1-6.
3. Barnaba V, Leurero M, Van Dyke AD, Musca A, Cordova C, Balsano F. T cell subsets in the hypo responsiveness to Hepatitis B surface Antigen (HBs Ag) and antigen-specific suppressor lymphocytes in chronic hepatitis B virus (HBV) Infection. *Clin Immunol Immunopath* 1985; 34: 284-295.
4. Barnaba V, Musca A, Cordova C, Leurero M, Ruocco G, Albertini Petroni V, Balsano F. Relationship between T cell subsets and suppressor cell activity in chronic hepatitis B virus (HBV) Infection. *Clin Exp Immunol* 1983; 53: 281-288.
5. Barnaba V, Valesini G, Leurero M, Zaccari C, Van Dike A, Falco M, Musca A, Balsano F. Immunoregulation of the in vitro anti-HBs antibody synthesis in chronic HBs Ag carriers and in recently boosted anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol* 1985; 60: 259-266.

6. **Benacerraf B, McDevitt HO.** Histocompatibility linked immune response genes. *Science* 1972; **175**: 273-279.
7. **Benacerraf B.** A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of the I region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. *J Immunol* 1978; **120**: 1809-1812.
8. **Berkower I, Buckenmeyer GK, Gurd FRN, Berzofsky JA.** A possible immunodominant epitoperecognized by murine T lymphocytes immune to different myoglobins. *Proc Natl Acad Sci* 1982; **79**: 4723-4728.
9. **Berkower I, Kawamura H, Malis LA, Berzofsky JA.** T cell clones to two mayor T cell epitopes of myoglobin: Effect of I-A/I-E restriction on epitope dominance. *J Immunol* 1985; **135**: 2628-2634.
10. **Celis E, Chang TW.** Antibodies in hepatitis B surface antigen potentiate the responses of human T lymphocyte clones to the same antigen. *Science* 1984; **224**: 297.
11. **Celis F, Kung PC, Chang TW.** Hepatitis B virus reactive human T lymphocyte clones: antigen specificity and helper function for antibody synthesis. *J Immunol* 1984; **132**: 1511.
12. **Celis E, Zurawsky VR Jr, Chang T.** Regulation of T cell clones to hepatitis B surface antigen by antigen-specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 1984; **81**: 6846.
13. **Chiou SS, Yamauchi K, Nakanishi T, Obala H.** Nature of the immunological nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in healthy individuals. *Immunology* 1988; **64**: 545.
14. **Chisari FV, Castle KL, Xavier C, Anderson DS.** Functional properties of lymphocyte sub-populations in hepatitis B virus infection. I. Suppressor cell control of T lymphocyte responsiveness. *J Immunol* 1981; **126**: 38-44.
15. **Cupps TR, Gerin JL, Purcell RH, Goldsmith PK, Fauci AS.** In vitro antigen in man: Kinetic and cellular requirements. *J Clin Invest* 1984; **74**: 1204.
16. **Dusheico GM, Hoofnagle JH, Cooksley NG, James SP, Jones EA.** Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest* 1983; **71**: 1104-1113.
17. **Chang TW, Celis F, Miller RW, et al.** In vitro response to HBs Ag of peripheral blood lymphocytes from recipients of hepatitis B vaccine. *Hepatology* 1984; **4**: 824-829.
18. **Eales LJ, Parkin JM.** Current concepts in the immunopathogenesis of AIDS and HIV infection. *Br Med J* 1988; **44**: 38-41.
19. **Egea E, Iglesias A, Salazar M, Morimoto C, Kruskall MS, Awdeh Z, Schlossmann SF, Alper CA, Yunis EJ.** The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine in humans. *J Exp Med* 1991; **173**: 531-538.
20. **Filion LG, Saginue R, Izaquie CA.** Phytohemagglutinin mitogenic response of nonnal individuals vaccinated with hepatitis B vaccine. *J Infect Dis* 1989; **160**: 398-404.
21. **Filion LG, Saginue R, Szezerba KN.** Humoral and cellular immune responses by nonnal individuals to hepatitis B surface antigen vaccination. *Clin Exp Immunol* 1988; **71**: 405-409.
22. **Graven DE, Awdeh AL, Kunches LM, Yunis EJ, Dienstag JL, Werner BF, Polk BF, Snyderman DR, Platt SS, Crumpacker CS, Grady GF, Alper CA.** Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in health care workers. Results of revaccination and genetic typings. *Ann Intern Med* 1986; **105**: 356.
23. **Grossman EB, Stewart SJ, Stokes J Jr.** Post transfusion hepatitis in battle casualties. *JAMA* 1945; **129**: 991-994.
24. **Hanson RG, Hoofnagle JH, Minuk GY, Purcell RH, Gerin JL.** Cell-mediated immunity to hepatitis B surface antigen in man. *Clin Exp Immunol* 1984; **57**: 257.
25. **Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, Uichi M, Ohta N, Sasazuki T.** HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response in humans. *Nature* 1987; **327**: 426-430.
26. **Hirayama K, Matsushita S, Kiruchi I, Uichi M, Ohta N, Sasazuki T.** HLA-DW is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response in humans. *Nature* 1987; **327**: 426.
27. **Holly M, Linys, Rogers TJ.** Induction of suppressor cells by staphylococcal enterotoxin B: Identification of a suppressor cell circuit in the generation of suppressor-effector cells. *Immunology* 1988; **64**: 643-649.
28. **Jilg W, Schidt M, Zoule KG, Lorber B, Wilske B, Deinhardt F.** Clinical Evaluation of a recombinant hepatitis B vaccine. *Lancet* 1984; **2**: 1174-1175.
29. **Katz, DH, Hamaoka T, Dorf ME, Benacerraf B.** Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes the H-2 gene complex determines successful physiologic lymphocyte interactions. *Proc Nat Acad Sci* 1973; **70**: 2624-2628.
30. **Kikuchi I, Ozawa TM, Hirayama K, Sasazuki T.** An HLA-linked gene control susceptibility to lepromatous leprosy through T cell regulation. *Lepr Rev* 57 1986; **2** (Suppl): 139.
31. **London WT, Difiglia M, Sutnick AI, et al.** Hepatitis B and primary hepato cellular carcinoma in an European population. *Lancet* 1978; **2**: 1217-1219.
32. **Luft BJ, Pedrotti PW, Remington JS.** In vitro generation of adherent mononuclear suppressor cell of toxoplasma antigen. *Immunology* 1988; **63**: 643-648.
33. **Mann DL, Lazane F, Popovic M, Arthur LO, Robey WG, Blattner WA, Newman MJ.** HTLV-III large envelope protein suppresses PHA induced lymphocyte blastogenesis. *J Immunol* 1987; **138**: 2640-2645.
34. **Matsushita S, Muto M, Suemura M, Saito Y, Sasazuki T.** HLA-linked nonresponsiveness to Cryptometia japónica pollen antigen I. Nonresponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T cells. *J Immunol* 1987; **138**: 109.
35. **Milich DR, Chisari FV.** Genetic regulation of the immune response to the murine humoral immune response to the a and d determinants of HBs Ag. *J Immunol* 1982; **129**: 320.
36. **Milich DR, Leroux-Roels GG, Chisari FV.** Genetic regulation of the immune response to the hepatitis B surface antigen (HBs Ag) II. Qualitative characteristics of the humoral immune response to the a, d, and determinants of HBs Ag. *J Immunol* 1983; **130**: 1395.
37. **Milich DR, Leroux-Roels GG, Louie RE, Chisari FV.** Genetic regulation of the immune response to hepatitis B surface antigen (HBs Ag) IV. Distinct H-2-linked Ir genes control antibody responses to different HBs Ag determinants on the same molecule and map to the I-A and I-C sub-regions. *J Exp Med* 1984; **159**: 41.
38. **Nishimura Y, Sasazuki T.** Suppressor T cells control the HLA-linked low responsiveness to streptococcal antigen in man. *Nature* 1983; **298**: 347.
39. **Nowicki MJ, Tong MJ, Bohman RE.** Alterations in the immune response in nonresponders to the hepatitis B vaccine. *J Infect Dis* 1985; **152**: 1245.
40. **Ohta N, Minai M, Sasazuki T.** Antigen-specific suppressor T lymphocyte (Leu2a+3a-) in human schistosomiasis japónica. *J Immunol* 1983; **131**: 2524.
41. **Petre J, Van Wijnendaele F, De Neys B, Conrath K, et al.** Development of a hepatitis B vaccine from transformed yeast cells. *Post graduate Med J* 1987; **63**(Suppl 2): 73-81.
42. **Pimsler M, Sponsler TA, Meyers WN.** Immunosuppressive properties of the soluble toxin in Mycobacterium Ulcerans. *J Infect Dis* 1988; **157**: 577-584.
43. **Rosenthal AS, Shevach EM.** Function of macrophages in antigen recognition by Guinea pig T Lymphocytes I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* 1973; **138**: 1194-1212.
44. **Sasazuki T, Kikuchi I, Kiyayama K, Matsushita S, Ohta N, Nishimura Y.** HLA-linked Immune Suppression in humans. *Immunology* 1989; **2**(Suppl): 21-24.
45. **Sasazuki T, Kikuchi I, Hirayama K, Matsushita S, Ohta N, Nishimura Y.** HLA-linked immunosuppression in humans. *Immunol* 1989; **2**(Suppl): 21.
46. **Sasazuki T, Konoy, Iwamoto I, Tanimura H, Naito S.** Association between HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid. *Nature* 1978; **272**: 359.
47. **Sasazuki T, Nishimura Y, Muta M, Ohta N.** HLA-linked genes controlling the immune response and disease susceptibility. *Immunol Rev*

- 1983; **70**: 51.
48. **Sone T, Tsukamoto K, Hirayama K, Nishimura Y, Takeouchi T, Aizawa M, Sasazuki T.** Two distinct class II molecules encoded by the genes within HLA-DR subregion of HLA-DR2 and DQw2 can act as stimulating and restriction molecules. *J Immunol* 1985; **135**: 1288.
  49. **Spencer MJ, Cherry JD, Terasaki PI.** HLA antigens and antibody response after influenza A vaccination. Decreased response associated with HLA type BW16. *N Engl J Med* 1977; **297**: 692-696.
  50. **Szmuness W, Stevens CE, Zang EA, Harey EJ, Kellner A.** A Controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B Vaccine (Heptavax B, a final report). *Hepatology* 1981; **1**: 377-385.
  51. **Tremolada F, Fattovich G, Panebianco G, Ongaro G, Realdi G.** Suppressor cell activity in viral and non-viral chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1980; **40**: 89-95.
  52. **Valenzuela P, Medina A, Ruther WJ, Ammerer G, Hall BD.** Synthesis and Assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; **298**: 347-350.
  53. **Vo Boehmer H, Hass W, Jerne NK.** Major histocompatibility complex linked Immune-responsive nessis acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of night responder mice. *Proc Natl Acad Sci* 1978; **75**: 2439-2442.
  54. **Walker M, Szmuness W, Stevens C, Rubinstein P.** Genetics of anti-HBs responsiveness. I. HLA-DR7 and nonresponsiveness to hepatitis vaccination. *Transfusion* 1981; **21**: 601.
  55. **Watanabe H, Matsushita S, Nobuhiro K, Hirayama K, Okamura M, Sasazuki T.** Immunosuppressor gene on HLA-Bw54, DR4, DRw53 haplotype controls nonresponsiveness in humans to hepatitis B surface antigen via CD8+ suppressor T cells. *Human Immunol* 1988; **22**: 9.
  56. **Weissman JY, Tsuchiyose MM, Tong MJ, Chink CR, Ettenger RB.** Lack of response to recombinant hepatitis B vaccine in nonresponders to the plasma vaccine. *JAMA* 1988; **260**: 1734-1738.
  57. **Yamauchi K, Chiou SS, Nakamushi T, Obata H.** Suppression of hepatitis B antibody synthesis by factor made by T cells from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest* 1983; **71**: 1104.
-