

Instituto de Gastroenterología

## ACTIVACIÓN LINFOCITARIA EN PORTADORES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

*Lic. Georgina Rousseau González, Lic. Lucas Enrique Collazo Borrego y Dra. Elvira Borbolla Busquets*

### RESUMEN

Se sabe que la evolución de las hepatitis virales agudas y crónicas de tipo B está particularmente relacionada con la respuesta inmune celular del huésped. Se caracterizó el estado funcional de los linfocitos T en individuos portadores del virus B y se estudió la activación linfoblástica en 13 portadores asintomáticos y 23 pacientes con hepatitis crónica activa con replicación viral y sin ella, determinada por la presencia del antígeno "e" en la muestra estudiada. Se analizaron las siguientes variables: activación espontánea-activación estimulada por fitohemaglutinina-índice de estimulación. No se encontró diferencia significativa entre los grupos de estudio y el grupo control en cuanto a las variables estudiadas por lo que se concluyó que el comportamiento en cuanto a su estimulación espontánea y estimulada de forma inespecífica de ambos grupos es normal, independientemente de la presencia o ausencia del antígeno e. La replicación viral no alteró la función linfocitaria en cuanto a las variables estudiadas.

*Descriptor DeCS:* HEPATITIS B CRONICA; LINFOCITOS T.

El virus de la hepatitis B no es citopático *per se*, la respuesta inmune del huésped es la responsable de la lesión hepática y de la eliminación del virus en los casos de una evolución favorable.<sup>1</sup> Por el contrario, cuando la respuesta del huésped es inadecuada y no se logran eliminar las células hepáticas infectadas se produce una evolución hacia la cronicidad. Se conoce que la evolución de las hepatitis virales agudas a crónicas, fundamentalmente las de tipo B, está particularmente relacionada con la respuesta inmune celular del huésped.<sup>2-5</sup>

La capacidad de los linfocitos de activarse frente a un estímulo no específico en portadores crónicos de la hepatitis ha sido estudiada por varios investigadores, pero sus resultados han sido poco concluyentes. *Nouri-Aria*<sup>6</sup> plantea que el proceso de activación linfocitaria de las células T no es normal en portadores de hepatitis crónica tipo B, pero que esto se debe a la disfunción de los propios monocitos, de los cuales las células T son dependientes. Por otra parte, *Dudley*<sup>2</sup> plantea que la persistencia del AgsHB en algunos casos de hepatitis crónica activa está relacionada con un defecto de la función de los linfocitos T.

Dentro de la respuesta inmunocelular desempeña un papel importante la población de linfocitos T con sus subpoblaciones, existen diferencias en su distribución en pacientes portadores de hepatitis crónica en sangre periférica atendiendo al grado de replicación viral.<sup>7</sup>

Se ha demostrado que, en la hepatitis crónica activa, la respuesta a antígenos donde intervienen los linfocitos T está disminuida con respecto a aquellas donde ellos no intervienen y con respecto a la respuesta de los individuos sanos, lo cual indica que la función de cooperación de las células T está deprimida en esta entidad. Las alteraciones en la síntesis de inmunoglobulinas en esta enfermedad parecen, también, estar relacionadas con un defecto de las células T.<sup>8</sup>

Para evaluar la inmunidad celular y específicamente la función linfocitaria puede inducirse un proceso de transformación blástica y de división celular, al exponer las células linfoides a estimulantes específicos o inespecíficos. Uno de los mitógenos más empleados para esto es la fitohemaglutinina (PHA), lectina vegetal que tiene la propiedad de estimular la población de linfocitos T.<sup>9,10</sup>

Por los resultados contradictorios en este campo de la investigación y la importancia que tiene para la comprensión de los complejos mecanismos inmunológicos involucrados en la patogenia de esta afección decidimos estudiar la función linfocitaria en este grupo de pacientes y caracterizar la respuesta de los linfocitos T a la estimulación con PHA en portadores del virus de la hepatitis B con diferentes grados de daño hepático.

## MÉTODOS

Estudiamos 13 portadores sin daño hepático o con lesiones mínimas y 23 con hepatitis crónica con otros grados de lesión por virus B, clasificados por su estu-

dio histológico. Cada grupo se dividió en 2 subgrupos: el primero, con replicación viral, que se determinó por la presencia del antígeno "e" en el suero del paciente y el segundo, sin replicación viral, es decir sin antígeno "e" en suero. Realizamos un control de calidad de los resultados, procesamos junto con cada grupo de muestras estudiadas, muestras de donantes voluntarios sanos. Las muestras consistieron en 20 mL de sangre de las que se aislaron los linfocitos por el método de Boyun modificado<sup>11</sup> que consiste en la centrifugación de la sangre sobre un gradiente de densidad. Cultivamos los linfocitos en placas de cultivo de 96 pozos con medio de cultivo 199 al 10 % de suero fetal bovino durante 72 h a 37 °C y en una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>. Determinamos la transformación linfoblástica por la incorporación de timidina tritiada al DNA celular durante las últimas 6 h de cultivo. Estudiamos como grupo control, 40 individuos normales supuestamente sanos, donantes del banco de sangre del Hospital "General Calixto García", negativos al antígeno de superficie y con serología negativa.

Expresamos los resultados de forma cualitativa, comparamos los resultados individuales contra los del grupo control, consideramos la respuesta como normal si los conteos en cuentas por minuto (cpm) estaban entre el rango de  $X \pm DE$  del grupo control; aumentados, si superaban los valores  $X \pm DE$  y deprimidos, si no alcanzaban esos valores del grupo control.

Analizamos 3 variables:

- La activación espontánea de los linfocitos (AE)
- La activación estimulada por PHA.
- El índice de estimulación (IE) calculado por:

$$IE = \frac{\overline{X} \text{ cpm PHA}}{\overline{X} \text{ cpm sin estímulo}}$$

Comparamos el número de pacientes con resultados normales, aumentados y disminuidos de cada grupo, así como de cada subgrupo, para cada variable estudiada.

Para el análisis estadístico utilizamos una prueba de proporciones para comparar el comportamiento de las variables entre grupos y subgrupos con un nivel de significación del 5 %.

## RESULTADOS

No hallamos diferencia significativa cuando comparamos los 2 grupos de estudio (asintomáticos y hepatitis crónica activa) con el grupo control, para ninguna de las variables estudiadas (actividad espontánea, actividad estimulada con PHA e IE), ni entre los 2 grupos de estudio (tabla 1). No hubo diferencia significativa entre los subgrupos (Ag e HB + y Ag e HB-) y el grupo control ni entre los 2 subgrupos entre sí (tablas 2 y 3).

TABLA 1. Resultados en el grupo total de pacientes

Grupos	Número de pacientes								
	AE			PHA			IE		
	N	↑	↓	N	↑	↓	N	↑	↓
Portadores sanos n=13	12	1	0	9	1	3	8	1	4
Hepatitis crónica n=23	22	0	1	17	0	6	17	1	5
Control n=40	36	4	0	32	3	5	30	4	6

N-Activación normal. ↑Activación aumentada. ↓Activación disminuida.

TABLA 2. Resultados en pacientes con Ag e HB +

Grupos	Número de pacientes								
	AE			PHA			IE		
	N	↑	↓	N	↑	↓	N	↑	↓
Portadores sanos n=5	5	0	0	3	1	1	4	0	1
Hepatitis crónica n=19	18	0	1	14	0	5	15	0	4
Control n=40	36	4	0	32	3	5	30	4	6

N-Activación normal. ↑Activación aumentada. ↓Activación disminuida.

TABLA 3. Resultados en pacientes con Ag e HB-

Grupos	Número de pacientes								
	AE			PHA			IE		
	N	↑	↓	N	↑	↓	N	↑	↓
Portadores sanos n=8	7	1	0	6	0	2	4	1	3
Hepatitis crónica n=4	4	0	0	3	0	1	2	1	1
Control n=40	36	4	0	32	3	5	30	4	6

N-Activación normal. ↑Activación aumentada. ↓Activación disminuida.

Estos resultados indican que la respuesta linfocitaria al estímulo inespecífico (PHA) es normal en los grupos y subgrupos estudiados.

## DISCUSIÓN

Existen numerosos reportes donde se reflejan afectaciones de la respuesta inmune celular ante la presencia o evolución del virus de la hepatitis B en pacientes porta-

dores de éste.<sup>12,13</sup> La comprensión de la cinética de las células T es importante para dilucidar la patogénesis de la hepatitis crónica tipo B la cual está mediada por los mecanismos inmunes celulares.<sup>3</sup>

En portadores crónicos sin el daño hepático del AgsHB, los resultados en cuanto a la respuesta linfocitaria a la PHA han sido contradictorios: *Nielsen*<sup>14</sup> plantea que dicha respuesta es normal. Sin embargo, *Guistino* y *Clot* plantearon que esta actividad estaba dañada en este grupo de estudio.<sup>15</sup> *Asfandiarova* comprobó que la blastotransformación está disminuida en portadores sin daño hepático.<sup>16</sup>

En nuestro trabajo demostramos que ni en los individuos portadores que no tenían daño hepático por virus B o con lesiones mínimas del hígado, ni en aquellos con hepatitis crónica existe una disfunción de las células T en cuanto a la respuesta a la PHA lo que concuerda con los resultados obtenidos por *Nielsen*<sup>14</sup>

*Nouri-Aria*<sup>6</sup> tampoco encontró diferencias en las transformaciones linfocitarias espontáneas, observó que la estimulación con PHA o anti-T3 de aquellos linfocitos T-dependientes de la cooperación de monocitos reducían su expresión de receptores de IL-2, transferrina y HLA-DR. Sin embargo, la activación linfocitaria fue normal en los linfocitos que no dependían de la cooperación de monocitos, lo cual confirmó que el proceso de activación de las células T no era normal en portado-

res de hepatitis crónica por virus B, pero sugiere que estas células son normales intrínsecamente y que su disfunción pudiera ser consecuencia de la disfunción de los monocitos de los cuales las células T son dependientes.

Existen otros factores inmunológicos que intervienen en la respuesta inmune del huésped como son los llamados "factores inhibidores séricos" que tienen una función de protección ante una eventual reacción inmunitaria exagerada. El fallo de estos factores puede llevar al paciente infectado a una hepatitis crónica activa autoinmune, en caso de deficiencia de éstos a una demora en la eliminación del virus, como consecuencia de una respuesta inmune deprimida, en el caso de una producción prolongada.<sup>17</sup> Todo esto apoya la hipótesis de que la función linfocitaria intrínsecamente es normal en pacientes infectados por el virus B de la hepatitis, otros son los factores inmunológicos que ocasionan el estado de portador sano o a diferentes grados de daño hepático, es decir, a diferentes grados de hepatitis crónica.

En conclusión, el comportamiento de los linfocitos T, en cuanto a su estimulación espontánea y estimulada con PHA, del grupo de portadores del virus de la hepatitis B, sanos o con daño mínimo del hígado, así como de los enfermos con otros grados de hepatitis crónica por dicho virus fue normal.

La replicación viral estimada por la presencia del Ag HB no altera la función linfocitaria, en cuanto a las variables estudiadas.

## SUMMARY

It is known that the evolution of acute and chronic viral hepatitis B is particularly related to the cellular immune response of the host. The functional status of lymphocytes T was characterized carriers of HVB, whereas the lymphoblastic activation was studied in 13 asymptomatic carriers and in 23 patients with active chronic hepatitis with and without viral replication determined by the presence of antigen e in the studied sample. The following variables were analyzed: spontaneous activation-phytohemagglutinin-stimulated activation.stimulation index. No significant differences were found between the study group and the control group as regards the studied variables. Therefore, it was concluded that the behaviour in connection with its spontaneous and stimulated activation in an unspecific way is normal in both groups, independently of the presence or absence of antigen e. The viral replication did not alter the lymphocytary function of the studied variables.

*Subject headings:* HEPATITIS B, CHRONIC; T-LYMPHOCYTES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Humphey JF. Alteration in suppressor cell activity in chronic active hepatitis. Proc Natl Acad Sc 1978;75(3):45-9.
2. Dudley J. Cell mediated immunity in patients positive for hepatitis associated antigen. Med J 1972;4:754-6.
3. Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Kimura N, Okumura M. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with hepatitis B. Gastroenterology 1996;111(1):156-64.
4. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 1995;13:29-60.
5. Dusheiko GM, Hoofnagle JH, Cooksley WG, James SP, Jones EA. Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B virus surface antigen carrier. J Clin Invest 1983;71:1104-7.
6. Nouri-Aria KT, Magrin GJ, Alexander J. Abnormal T-cell activation in chronic hepatitis B viral infection: a consequence of monocyte dysfunction? Immunology 1988;64(4):733-7.
7. Collazo I, Sotto A, Rodríguez N, Villazón G, Borbolla F. Poblaciones linfoides en hepatitis crónica tipo B tratadas con interferón recombinante. Rev Cubana Med 1991;30(1):23-9.
8. Nouri-Aria KT. *In vitro* study of IgG production and C on A induced suppressor cell function in acute and chronic hepatitis B virus infection. Exp Immunol 1986;64:50-8.
9. Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Wells JV. Inmunología Básica y Clínica. 5. ed. La Habana:Editorial Científico-Técnica,1987:368-73.
10. Harberck RJ, Giglas PC. Lymphocyte stimulation with mitogens and antigens. En: Diagnostic immunology laboratory manual. Nueva York: Raven,1991:211-9.
11. Boyun A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow T-lymphocyte. Lancet 1973;2:576-9.
12. Cheshik SG, Golban ID, Kuznetsov VP. The characteristics of the immune response in acute viral hepatitis B. Z Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1996;5:64-8.
13. Chen X, Cooksley G, Sing G. Distinct of T cell receptor distribution of peripheral blood CD<sub>8</sub><sup>+</sup> cells during different stages of chronic infection with hepatitis B virus. Hum Immunol 1998;59(1):199-211.
14. Nielsen JO. Immunologics studies of HB<sub>s</sub> Ag carriers with and without liver disease. Clin Exp Immunol 1973;15:9-12.
15. Clot J. Inhibitory effect of Australia-positive sera on *in vitro* stimulate T-Lymphocyte. Lancet 1973;2:5576-80.
16. Asfandiarova NS. Estado de la inmunidad humoral y celular en portadores asintomáticos del virus B de la hepatitis. Ter Arch 1984;56(10):47-9.
17. Sapunar I. Evolución de las hepatitis agudas a la cronicidas. Acta Latinoamericana 1986;16(1):61-2.

Recibido: 9 de marzo de 1999. Aprobado: 24 de noviembre de 1999.

Lic. *Georgina Rousseau González*. Instituto de Gastroenterología, calle 25 No. 503, entre H e I, Plaza de la Revolución, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.