

Instituto de Gastroenterología

PERFIL INMUNOLÓGICO DE PACIENTES PORTADORES DE HEPATITIS C. ESTUDIO PRELIMINAR

Lic. Georgina Rousseau González, Lic. Lucas Collazo Borrego y Dr. Waldo García Ferrera

RESUMEN

Se estudiaron 20 pacientes portadores de hepatitis crónica por virus C para caracterizarlos inmunológicamente. Se determinó la presencia de crioglobulinas séricas, factor reumatoideo, inmunocomplejos circulantes y de anticuerpos antinucleares y antimitocondriales. Las crioglobulinas se determinaron cualitativamente; el factor reumatoideo, por aglutinación; los inmunocomplejos, por inmunoprecipitación y los autoanticuerpos, por inmunofluorescencia directa en cortes de hígado y riñón de rata, respectivamente. Se observó el 45 y el 10 % de positividad en las crioglobulinas y el factor reumatoideo, respectivamente. Sin embargo, los inmunocomplejos se comportaron dentro del rango normal. Los anticuerpos antinucleares fueron positivos en el 20 % de los pacientes estudiados, mientras que los antimitocondriales se mostraron negativos en todos los casos. Se concluyó que la respuesta inmune humoral en pacientes con hepatitis crónica por virus C parece estar afectada y su principal característica es la presencia de crioglobulinas séricas.

Descriptor DeCS: HEPATITIS C/inmunología; CRIOGLOBULINAS.

La hepatitis por infección del virus C está asociada a varios fenómenos extra-hepáticos entre ellos la crioglobulinemia, la glomerulopatía, el síndrome de Sjögren, las enfermedades dermatológicas, las vasculitis, etcétera.¹

El daño hepático puede cursar en muchas ocasiones de forma asintomática y en otros casos, la crioglobulinemia y la vasculitis pueden ser las primeras manifestaciones de la infección.²

Se ha planteado una asociación entre el virus C y la crioglobulinemia³⁻⁵ y se considera que el propio virus C y las inmuno-

globulinas producidas en respuesta al mismo son los constituyentes principales de las crioglobulinas.^{6,7} Sin embargo, no se ha podido demostrar que esos inmunocomplejos circulantes (ICc) desempeñen un papel patogénico en la crioglobulinemia, ya que ni en las lesiones renales ni en las vasculares características de esta entidad se ha encontrado el antígeno viral.

Este complejo de inmunoglobulinas reversiblemente precipita a bajas temperaturas y se considera de tipo simple o mixto, estas últimas de tipo monoclonal o policlonal, según su constitución.

La crioglobulinemia que se asocia a la hepatitis C es la mixta de tipo II y III, es decir, las formadas por IgG e IgM, que pueden ser de tipo monoclonal (tipo II) o policlonal (tipo III). El constituyente IgM tiene actividad de factor reumatoideo (FR), y muestra actividad anti-IgG. Estas inmunoglobulinas de tipo IgM son anticuerpos específicos de determinantes antigénicos del fragmento Fc de las IgG, es decir, son anticuerpos anti-IgG.

En el suero de pacientes con hepatitis C se han encontrado autoanticuerpos, aunque su significación no ha sido aún dilucidada.^{8,9}

Con el fin de caracterizar inmunológicamente a pacientes portadores del virus C de la hepatitis, evaluamos, desde el punto de vista humoral, las posibles alteraciones inmunológicas en un grupo de pacientes infectados por dicho virus.

MÉTODOS

Estudiamos 20 pacientes con hepatitis crónica por virus C, sin tratamiento médico durante los últimos 6 meses, diagnosticados por la presencia de anticuerpos antiviral C en suero, determinada por el sistema ultramicroanalítico (SUMA) y por biopsia hepática. Descartamos en todos los pacientes la infección por el virus B de la hepatitis, por la ausencia del Ag s HB en el suero de los mismos y por el método SUMA.

A todos les realizamos las siguientes pruebas:

- Determinación cualitativa de crioglobulinas

Tomamos muestras de sangre con jeringuilla y aguja previamente calentadas a 37 °C. Dejamos retraer el coágulo a esta

misma temperatura durante 1 h, centrifugamos y conservamos el suero a 4 °C durante 7 d, al cabo de los cuales determinamos visualmente la formación del precipitado blanco característico de las crioglobulinas, por lo cual dimos el resultado como positivo o negativo.

- Determinación del factor reumatoideo

Diluimos el suero de cada paciente 1:10 con solución salina fisiológica y lo mezclamos a partes iguales con el látex sensibilizado con gammaglobulinas humanas. Observamos si se producía la reacción de aglutinación, dimos el resultado como positivo o negativo (Látex-FR, IMEFA). Empleamos siempre un control positivo y uno negativo como control de calidad de la prueba.

- Determinación de inmunocomplejos circulantes (ICc)

Los inmunocomplejos circulantes los determinamos por el método de inmunoprecipitación en PEG 6 000 al 3,7 %.¹⁰ Los resultados fueron positivos si los valores sobrepasaban el valor de $\bar{X} \pm 2$ DE del grupo control o negativos, si no rebasan esta cifra. El grupo control estuvo constituido por 10 donantes del banco de sangre.

- Determinación de autoanticuerpos no organo-específicos: (ANA) y (AMA)¹¹

Esta determinación se realizó por el método de inmunofluorescencia directa en cortes de hígado y riñón de rata, respectivamente, mediante un anticuerpo de carnero anti-IgG humana marcado con fluoresceína. Empleamos para cada montaje, un control negativo y uno positivo, como control de calidad.

Los resultados de cada prueba los expresamos en porcentajes de positividad para cada prueba realizada.

RESULTADOS

Como aparece en la tabla, el porcentaje de positividad para la prueba de crioglobulinas alcanzó la cifra del 45 % de los pacientes estudiados. Paradójicamente, el nivel de ICc se comportó dentro del rango de normalidad. El 10 % de los pacientes estudiados mostró factor reumatoideo positivo y el 20 %, anticuerpos antinucleares, no hubo positividad para el anticuerpo antimitocondrial en ninguno de los pacientes.

TABLA. Estudios en pacientes portadores crónicos del virus C

| Pruebas realizadas (n = 20) | Porcentaje de positividad |
|--------------------------------|------------------------------|
| Crioglobulinas | (45) |
| Factor reumatoideo | (10) |
| Anticuerpos antinucleares | (20) |
| Anticuerpos antimitocondriales | (0) |
| Inmunocomplejos circulantes | (0) |

DISCUSIÓN

La ocurrencia de crioglobulinemia en el curso de algunas enfermedades infecciosas ha sugerido que algún agente infeccioso sea la causa de la formación de los inmunocomplejos constituyentes de las crioglobulinas. Por otra parte, la alta prevalencia de alteraciones hepatocelulares en pacientes con crioglobulinemia dieron lugar a la hipótesis de que un virus hepatotrófico estuviera involucrado en la patogenia de esta enfermedad.¹²

Mientras que el 50 % de todas las crioglobulinemias se asocian a enfermedades linfoproliferativas y el 25 %, a enfermedades autoinmunes, el otro 25 % no son de causa conocida, a pesar de un seguimiento de larga duración. Éstos son los casos llamados "crioglobulinemia mixta esencial" o síndrome de Meltzer, sus prin-

cipales hallazgos clínicos son: la púrpura, las poliartalgias, la enfermedad renal, la úlcera en miembros inferiores y la neuropatía periférica. En muchos casos existe evidencia de enfermedad hepática.¹³

Como una de las manifestaciones más frecuentemente encontradas en la crioglobulinemia mixta esencial (CME) es la hepatitis,¹⁴ se comenzó a estudiar la posible relación entre el virus de la hepatitis y la CME. La asociación de ésta con la hepatitis A resulta muy rara. Por otra parte, hasta el presente no han existido criterios suficientes para establecer un papel patogénico de los complejos inmunes de la hepatitis B en la CME y en la actualidad no existe fundamento tampoco para establecerlo en cuanto al virus B.

Como se ha demostrado que el virus de la hepatitis C es el mayor responsable de la hepatitis no A no B y de la hepatitis postransfusional,¹⁵ muchos investigadores comenzaron a estudiar la relación de este virus con la CME.

Nuestros resultados coinciden con los de *Cacoub* y otros¹⁶ quienes encontraron que el 54 % de los pacientes con hepatitis crónica por virus C estudiados presentaban crioglobulinemia tipos II y III. En nuestro grupo de estudio, la presencia de crioglobulinas en el suero se observó en el 45 % de los pacientes.

Las crioglobulinas tipo I son inmunoglobulinas monoclonales que no presentan actividad del factor reumatoideo. Las de tipo II también son monoclonales, pero sí presentan actividad del factor reumatoideo y se pueden adherir a la porción Fc de otros anticuerpos. Las de tipo III son policlonales y también presentan actividad del FR, pueden formar complejos inmunes que activan el sistema de complemento produciendo daño inflamatorio de los vasos sanguíneos como en la vasculitis. *Spivak* y *Barnes*¹³ reportaron que todos los pacientes con crioglo-

bulinas presentaban actividad de FR y que la mayoría de las mismas eran de tipo III. También la hipocomplementemia era frecuente en ellos. La combinación de FR y los bajos niveles de complemento en un paciente, en su opinión, sugiere que éste sea un portador de crioglobulinemia mixta esencial.¹³

Algunos investigadores han reportado actividad de FR y anticuerpos monoclonales IgM-Kappa en el 95 % de los pacientes con crioglobulinemia tipo II.⁷ En algunos casos el virus de la hepatitis C se vio involucrado en la formación de la crioglobulina y los anticuerpos contra este virus se concentraron en el crioprecipitado.¹⁷

En nuestro grupo de estudio se observó también la presencia de factor reumatoideo, pero sólo en el 10 % de los pacientes, todos con crioglobulinas positivas.

En varios estudios sobre la presencia de autoanticuerpos antinucleares y anti-músculo liso en la hepatitis C los resultados concuerdan: están presentes en el 5 y hasta en el 20 % de los enfermos, mientras

que en los donantes de sangre sólo se observaba en el 1 al 4 % de los mismos.¹⁸ También en nuestro estudio los anticuerpos antinucleares estuvieron presentes en el 20 % de los pacientes estudiados. *Wärny* y otros¹⁹ encontraron una alta frecuencia de anticuerpos antinucleares de granulocitos en el curso de la hepatitis no A no B (41 %) mientras que en la hepatitis B no se detectaron. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que el virus C está involucrado en afecciones autoinmunes. En este mismo estudio se observó una desaparición de estos autoanticuerpos en 9 de los 12 casos tratados con interferón.

Paradójicamente, en nuestro grupo de estudio no hubo elevación del nivel de los inmunocomplejos circulantes lo que no concuerda con la presencia, en el 45 % de los pacientes, de crioglobulinas las cuales constituyen verdaderos complejos inmunes.²⁰ Esto pudiera deberse a una baja sensibilidad del método para determinar dichos complejos, por lo que consideramos que debemos profundizar nuestro estudio con técnicas más sensibles y ampliar su universo.

SUMMARY

Authors studied 20 patients carriers of chronic hepatitis virus C for a immunological assessment. Presence of serum cryoglobulins, rheumatoid factor, circulatory immune complexes, and of antinuclear and antimitochondrial antibodies. Cryoglobulins were qualitatively assessed; rheumatoid factor, by agglutination; immune complexes, by immunoprecipitation, and autoantibodies, by direct immunofluorescence in sections of rats liver and kidney, respectively. In cryoglobulins and rheumatoid factor there was 45 % and 10 % of positivity, respectively. Immune complexes, however, were within normal rank. Antinuclear antibodies were positive in 20 % of study patients, whereas antimitochondrial ones were negative in all cases. We conclude that humoral immune response in patients with chronic hepatitis virus C, seems to be affected, and its main feature is presence of serum cryoglobulins.

Subject headings: HEPATITIS C/immunology; CRYOGLOBULINS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gordon SC. Extrahepatic manifestation of Hepatitis C. *Dig Dis* 1996;14:157-68.
2. Daoud MS, Laurence EG, Daoud S. Chronic hepatitis C and skin diseases. A review. *Mayo Clin Proc* 1995;70:559-64.

3. Pascual M, Perrin L, Giosir E, Schifferli JA. Hepatitis C virus in patients with cryoglobulinemia type II (letters). *J Infect Dis* 1990;162:569-70.
4. Abel G, Zhang QX, Agnello V. Hepatitis C virus infection in type II mixed cryoglobulinemia. *Arthritis and Reum* 1993;36(10):1341-9.
5. Ferri C, Greco F, Longombardo G, Palla P, Moretti A, Marzo E et al. Antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Reum* 1991;34:1606-10.
6. Missiani R, Bellavita P, Fenili D, Borelli D, Marchesi D, Massazza M, et al. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1992;117:573-7.
7. Igushi S, Toba K, Fusc I, Wada Y, Maruyoma S, Takahashi M. Severe cryoglobulinemia in a patient with asymptomatic hepatitis C virus infection. *Intern Med* 1996;35(9):712-6.
8. Ferri C, Zignego AI, Longombardo M, Monte L, La Civita L, Lombardini F. Effect of Alfa-IFN en Hepatitis C virus chronic infection in mixed cryoglobulinemia patients infection. *Infection* 1993;21(2):23-7.
9. Pinchuk L, García C, Palermo C, García D, Micheline J. Baja prevalencia de marcadores de autoinmunidad en la hepatitis crónica C. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1995;25(4):16-24.
10. Kasková V. Simple method of circulating immune complexes detection in human sera by polyethylene glycol precipitation. *J Immunol* 1978;154:399-401.
11. Gradwohl RBH. Gradwohl: Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico. 8 ed. La Habana:Ed Científico-Técnica, 1983;V3:1155-73.
12. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann S. Biological and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974;57:775-88.
13. Spivak JL, Barnes HV. Manual of clinical problems in internal medicine. 4 ed. Boston:Little Brown, 1990:146-50.
14. Bombardieri S, Ferri C, di Munno O, Passero G. Liver involvement in essential mixed cryoglobulinemia. *Ric Clin Lab* 1979;9:361-8.
15. Mc Farlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, William R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis. Pathogenetic factor or false positive results? *Lancet* 1990;335:754-7.
16. Cacoub P, Lunel F, Musset L, Opolon P, Piette JC. Hepatitis C virus and cryoglobulinemia. *N Eng J Med* 1993;328(15):1121-4.
17. Cacoub P, Fabiani FL, Musset L. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Am J Med* 1994;96:124-9.
18. Lunel F. Hepatitis C et anomalies immunologiques. *Gastroenterol Clin Biol* 1994;18:829-38.
19. Warny M, Brenard R, Cornu C, Tomasi JP, Geubel AP. Anti-neutrophil antibodies in chronic hepatitis and effect of alpha-interferon therapy. *J Hepatol* 1993;17:294-300.
20. Marcelini P, Decamps V, Martinot-Peignoux M, Larzul D, Xu L, Boyer N, et al. Cryoglobulinemia with vasculitis associated with C virus infection. *Gastroenterology* 1993;104:227-77.

Recibido: 26 de abril de 1999. Aprobado: 25 de enero de 2000.

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