

# Concentraciones séricas de IL-2 y su receptor soluble en pacientes con hepatitis B en fase aguda y de convalecencia

Drs. Tania Romero Adrián\*, Francisca Monsalve\*\*, Luciana Costa León\*\*, Diana Callejas M\*\*, Jesús Estévez\*\*, Marina García\*\*, Lissette Connell\*\*, Rafael Molina Vílchez\*

Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo

## RESUMEN

*Estudio longitudinal en el cual se investiga la respuesta del sistema inmunitario, mediante determinación de la interleucina-2 y su receptor soluble, ante la infección aguda por hepatitis viral tipo B y su evolución a la fase de convalecencia. Quince pacientes con aminotransferasas séricas sobre diez veces el valor máximo normal y positividad para el antígeno de superficie del virus, antígeno "e" de la hepatitis B, y anticuerpos contra el "core" o núcleo de la clase IgM, se compararon con un grupo testigo normal, tomando muestras de sangre durante la fase aguda y cuatro meses después. La aparición del anticuerpo y la negativización del antígeno, ambos de superficie, con aminotransferasas normales, se consideraron criterios de remisión o convalecencia. Para detectar marcadores de infección por el virus se usó una técnica de inmunoanálisis enzimático de micropartículas. Para la citocina y su receptor soluble se empleó inmunoanálisis enzimático de doble anticuerpo. En fase aguda, los pacientes tuvieron niveles de interleucina-2 igual a  $25,7 \pm 1,6$  pg/ml; y de receptor soluble igual a  $3\,478 \pm 695$  pg/ml. En convalecencia las cifras fueron de  $22,1 \pm 2,1$  pg/ml para la citocina y  $3\,208 \pm 734,6$  pg/ml para el receptor. El grupo testigo tuvo niveles de interleucina en  $6,0 \pm 2,1$  pg/ml y de receptor soluble en  $443,7 \pm 39,6$  pg/ml. Los valores significativamente elevados de interleucina-2 y su receptor soluble ( $p < 0,001$ ), que aparecen en la fase aguda, se mantienen en la de convalecencia, aunque se normalicen los de aminotransferasas y aparezcan los marcadores serológicos indicativos de inmunidad.*

*Palabras clave: Citocinas. Hepatitis B. Interleucina-2. Receptor soluble de interleucina-2.*

\*Cátedra y posgrado de Inmunología. Facultad de Medicina.

\*\*Laboratorio Regional de Referencia Viroológica. Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo.

Trabajo subvencionado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (Conicit).

## SUMMARY

*Longitudinal investigation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor serum levels as part of the immunological response against type B hepatitis virus in acute and convalescence phases of disease. Fifteen patients with aminotransferase concentrations above tenfold the upper normal limit and positive reaction to the viral surface antigen, "e" antigen and IgM class anticore, were compared with a normal control group, taking blood samples during the acute phase and four months later. Antibody positivity, antigen negativization and normal liver enzymes concentrations were considered as remission or convalescence criteria. A microparticles enzymatic immunoassay technique was used for infection marker detection. Interleukin-2 and its soluble receptor were measured with a double antibody enzymatic immunoassay method. In acute phase of disease serum concentrations were: interleukin-2 =  $25.7 \pm 1.6$  pg/ml, and soluble interleukin-2 receptor =  $3\,478 \pm 695$  pg/ml. During convalescence the results were:  $22.1 \pm 2.1$  pg/ml and  $3\,208 \pm 734.6$  pg/ml respectively. Control group results were:  $6.0 \pm 2.1$  pg/ml and  $443.7 \pm 39.6$  pg/ml. Acute phase significantly increased interleukin and receptor concentrations ( $p < 0.001$ ) remained unchanged in the convalescence phase, despite normal liver enzymes titers and positive serological immunity markers.*

*Key words: Cytokines. Hepatitis B. Interleukin-2. Interleukin-2 soluble receptor.*

## INTRODUCCIÓN

La expresión clínica resultante de la relación entre el organismo hospedero y el virus de la hepatitis B o VHB es variable, e incluye estados de portador, de enfermedad aguda, fulminante y crónica (1). En los eventos tendientes a la eliminación de la partícula viral participan la inmunidad celular y los anticuerpos neutralizantes (2-4). La respuesta inmunitaria mediada por células activa la liberación de citocinas, entre ellas la interleucina-2 o IL-2, que

interviene en la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T actuando a través de los receptores de membrana específicos, de alta afinidad, constituidos por las cadenas alfa, beta y gamma, las cuales sólo se expresan en células T activadas, alcanzando niveles pico en dos o tres días, con disminución posterior (5-7). La escisión del dominio extracelular de la cadena alfa origina el receptor soluble de la interleucina o RsIL-2, cuyo incremento en sangre constituye un indicativo de actividad celular, tal como lo demuestra su detección en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina (PHA), antígenos, anticuerpos monoclonales OKT3, toxoide tetánico y células alogénicas (8). La unión del RsIL-2 a la citocina circulante afecta las funciones dependientes de ella (9).

Las concentraciones séricas de IL-2 varían de acuerdo a las características inmunopatológicas de cada entidad clínica, tal como se ha reportado en estudios realizados con SIDA (10), hepatitis B aguda (11) y crónica (12), *shock* hemorrágico (13), inmunodeficiencias primarias (14), tumores gastrointestinales (15) y leucemia aguda (16), entre otras. Al igual, niveles séricos elevados del RsIL-2 se encuentran en patologías como lupus eritematoso sistémico (17), linfoma (18), tuberculosis (19), SIDA (8,10,20), hepatitis B aguda y crónica (21), artritis reumatoide (22), malaria por *Plasmodium falciparum* (23) y esclerosis sistémica (24), y en condiciones de recepción de trasplantes de órganos (25), para citar sólo algunos de los reportes existentes.

El presente estudio se propone determinar las concentraciones séricas de la interleucina-2 y el RsIL-2 en pacientes con hepatitis B, para evaluar su comportamiento durante la evolución de la infección aguda.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población estudiada

Se conforman dos grupos. El primero estaba constituido por 15 pacientes de ambos sexos, de edades comprendidas entre 20 y 60 años, con infección aguda por el VHB, que evolucionaron hasta la resolución del proceso patológico. Los pacientes procedían de la Unidad Central del Banco de Sangre, del Hospital Universitario y del laboratorio regional de referencia virológica, Instituto de Investigaciones Clínicas, Maracaibo Estado. Zulia, Venezuela.

El diagnóstico de infección aguda se basó en el hallazgo de valores séricos de aminotransferasas 10 veces por encima de lo máximo normal, 40 U/L, asociado con la detección de: antígeno de superficie del virus de hepatitis B (AgsHB), antígeno "e" (AgeHB) y anticuerpos contra el "core" o núcleo de la clase IgM (IgM-anticHB). Para el diagnóstico de remisión se tomó una segunda muestra luego de un período de 4 meses, y fueron indicadores del cese del cuadro clínico: la aparición del anticuerpo de superficie o anti-sHB y la negativización del AgsHB con aminotransferasas normales. El segundo grupo fue el control, similar al primero con respecto al número de individuos estudiados, edad y sexo, pero sin antecedentes clínicos y laboratorio de hepatitis.

Se excluyeron del estudio las mujeres embarazadas, los pacientes hemodializados, leucémicos, hemofílicos, con enfermedades autoinmunes, infectados con virus de hepatitis A, C y D, con el de la inmunodeficiencia humana, y los inmunizados contra el VHB.

### Metodología de laboratorio

Tanto del grupo de pacientes como del control, se obtuvieron 10 cm<sup>3</sup> de sangre venosa de la región ante-cubital, la cual se centrifugó a 1 600 g x 15 minutos para la obtención del suero. Éste, separado en alícuotas de 500 µl, se almacenó a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Las muestras para la detección de marcadores de infección por el VHB en fase aguda y convaleciente fueron analizadas siguiendo técnica de inmunoanálisis enzimático de micropartículas (MEIA) del sistema IMx ("Abbott Laboratories", División de Diagnóstico). Para la determinación de la IL-2, se utilizó el método cuantitativo de doble anticuerpo con técnica de inmunoanálisis enzimático (ELISA) ("Biotrak", de acuerdo al Laboratorio "Amersham International"). Para el RsIL-2 se empleó el método de ELISA del laboratorio "DAKO", cuyos "kits" permiten su detención, tanto en la forma natural como en la recombinante humana, no presentando interferencias o reacciones cruzadas con otras citocinas o factores solubles. La sensibilidad de este análisis es menor de 6 pg/ml y 30 U/ml para la IL-2 y el RsIL-2 respectivamente.

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como media  $\pm$  error estándar ( $M \pm EE$ ). Para la comparación

entre las medias de los grupos en estudio y el control se utilizó el test ANOVA en una sola dirección, utilizando como post-test el análisis de Turkey. Se tomó el 95% como índice de confiabilidad estadística ( $p < 0,05$ ). Se determinaron los coeficientes de correlación entre las variables estudiadas.

## RESULTADOS

En las Figuras 1 y 2 se aprecia que las concentraciones séricas de IL-2 y el RsIL-2 de los grupos estudiados presentaron un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de sus valores en la fase aguda (IL-2 =  $25,7 \pm 1,6$  pg/ml y RsIL-2 =  $3\,478 \pm 695$  pg/ml) y en la fase convalescente (IL-2 =  $22,1 \pm 2,1$  pg/ml y RsIL-2 =  $3\,208 \pm 734,6$  U/ml), en relación con el grupo testigo (IL-2 =  $6,0 \pm 2,1$  y RsIL-2 =  $443,7 \pm 39,6$ ).

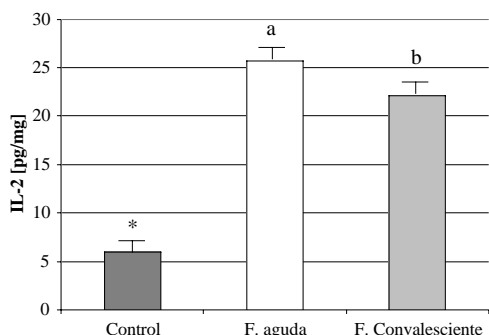


Figura 1. Concentración sérica de IL-2 en pacientes con hepatitis B con evolución a la remisión. \*Las columnas representan en pg/ml, el promedio  $\pm$  E.E. <sup>a</sup>Diferente significativamente del control ( $p < 0,001$ ).

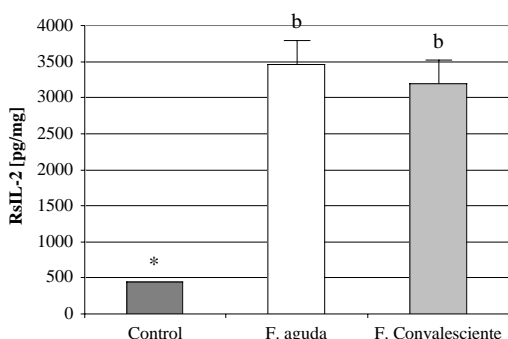


Figura 2. Concentración sérica de RsIL-2 en pacientes con hepatitis B con evolución a la remisión. \*Las columnas representan en pg/ml, el promedio  $\pm$  E.E. <sup>b</sup>Diferente significativamente del control ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSIÓN

La respuesta inmunitaria celular es esencial entre los mecanismos inmunopatogénicos, que tratan de eliminar la partícula del VHB (2,4). El incremento de la IL-2 demostrado en la presente investigación, podría ser el estímulo para la activación de las células asesinas naturales, o NK y de los linfocitos CD8+ participantes en el desarrollo de la inmunidad evidente a los 120 días de evolución del proceso viral. Echevarría y col. (11) reportan datos sobre una correlación positiva entre la citotoxicidad natural y los niveles aumentados de IL-2, para controlar la infección viral antes de que los mecanismos citotóxicos específicos se establezcan totalmente. En el presente estudio, las cifras elevadas de IL-2 durante la fase aguda coinciden con los hallazgos de Missale (4) y Echevarría (11). El incremento sérico de la IL-2 y el RsIL-2 durante esta fase es indispensable para una mayor activación y regulación de la actividad celular, como ya fue señalado, y coincide con la presencia del AgsHB, el antígeno "e" HB, los anticuerpos contra el "core" de la clase IgM (IgM anti-cHB) y aminotransferasas al menos diez veces por encima de lo normal. La correlación inversa entre la citocina y su receptor soluble, demostrada por otros autores (9), no se aprecia en este estudio.

Durante la fase convalescente los niveles en suero de IL-2 y RsIL-2 fueron similares a los obtenidos en la fase aguda, y no regresan a los valores controles 120 días después del diagnóstico de la infección. La supuesta ausencia de daño hepático en este período, manifestada por los niveles normales de los marcadores bioquímicos rutinariamente empleados: las aminotransferasas, a pesar del aumento de la IL-2, podría explicarse por la presencia del anti-sHB, que enmascara los antígenos de superficie tisular formando complejos inmunitarios inductores de señales transmembrana, capaces de suprimir la síntesis de los antígenos virales intracelulares (26). Esto impide la acción citotóxica, tanto natural como específica. Para Diamantstein (27), los niveles elevados del RsIL-2 no siempre son indicativos de lesión hepática, sino del desprendimiento aumentado de la cadena alfa del receptor de membrana de IL-2 de las células activadas, para frenar la respuesta inmunitaria inducida por la interleucina. Sin embargo, la interpretación de los resultados es difícil, a la falta de datos correspondientes al metabolismo del RsIL-2, como son: vida media, mecanismos de eliminación, factores concurrentes del sistema

inmunitario que modifican sus concentraciones, así como la especificidad de la técnica utilizada para su detección, que no permite medir en suero el complejo citocina-receptor. Por otro lado, es indispensable cuantificar a nivel sérico los factores en estudio a los 150 y 180 días posdiagnóstico de la infección para apreciar su evolución ya que no hubo normalización a pesar del demostrado desarrollo de inmunidad, evidente por los anticuerpos de superficie.

Esta investigación revela que los niveles de IL-2 y RsIL-2 no son indicativos de resolución de la infección ya que con valores de aminotransferasas normales los factores en estudio se mantuvieron elevados, tal como lo demuestra Hayashi (28) en hepatitis crónica para la forma soluble. Para este autor, las cifras de RsIL-2 se correlacionan con el índice de actividad histológica descrito por Knodell y col. (29), pero no con las concentraciones de alanino-aminotransferasas. En cuanto a la IL-2, sus cifras coincidentes con la fase aguda podría revelar la persistencia de complejos inmunológicos circulantes, que estimulan su producción y existen en períodos tardíos de la inflamación hepática, como consecuencia de la alteración funcional de las células de Kupffer (3). Existen parámetros bioquímicos, como las cifras de aminotransferasas, e inmunológicos como: el CD30 soluble (30) y marcadores serológicos específicos para el diagnóstico viral, que deben ser tomados en consideración para definir la fase aguda y de convalecencia de la hepatitis B.

#### REFERENCIAS

1. Alberti N, Colina F. Histología de la hepatitis B: avance en la interpretación diagnóstica y patogénica. *Hepatol Clín* 1995;2:73-83.
2. Chisari FV. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1995;13:29-60.
3. Machado I. Inmunopatología e inmunodiagnóstico de la hepatitis viral inducida por virus B. En: Bianco NE, Torrigiani G, editores. *Inmunología Clínica* 83. 1ª edición. Caracas: Editorial Biblioteca Universidad Central de Venezuela; 1983.p.431-444.
4. Missale G, Ferrari C, Fiaccadori F. Cytokines mediators in acute inflammation and chronic course of viral hepatitis. *Ann Ital Med Int* 1995;10:14-18.
5. Becker B, Becker S. El laboratorio en el diagnóstico, evaluación y seguimientos de las hepatitis virales. *Gen* 1997;51:94-109.
6. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. Citocinas. En: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editores. *Inmunología básica y clínica*. 9ª edición. México: Editorial Manual Moderno; 1998.p.165-192.
7. Yasuhiro M, Takeshi K, Tadaadi M, Tadatsugu T. The IL-2 receptor complex: Its structure, function and target genes. *Ann Rev Immunol* 1993;11:245-267.
8. Romero T. Receptor soluble de Interleucina-2 en suero de individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). *Kasmera* 1991;19:1-12.
9. Roitt IM, Brostoff, J, Male D. *Inmunología*. 4ª edición. Madrid: Editorial Harcourt Brace; 1997.p.8.1-.16.
10. Ebert EC, Stoll DB, Casseus BJ, Lipshutz WH, Hauptman SP. Diminished interleukin-2 production and receptor generation characterize the acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1985;37:282-297.
11. Echevarria S, Casafont F, Miera J L, De la Cruz F, San Miguel G, Pons-Romero F. Interlukin-2 and natural killer activity in acute type B hepatitis. *Hepatogastroenterology* 1991;38:307-310.
12. Nagaraju K, Naik S R, Naik S. Chronic hepatitis B virus carriers have low lymphoproliferative response to HbsAg and reduced interleukin-2 synthesis. *Indian J Gastroenterol* 1998;17:83-86.
13. Baker CC. Hemorrhagic shock and interleukin-2 production. *Critical Care Med* 1988;16:358-359.
14. Lopez-Botet M, Fountaun G, Rodriguez MC, De Laudazri MO. Relationship between IL-2 synthesis and the proliferative response to PHA in different primary immunodeficiencies. *J Immunol* 1982;126:679-683.
15. Koch B, Requat W, Solbach W, Lanz R, Hermanek P, Kalden JR. Interlukin-2 production in peripheral blood mononuclear cells of patients with gastrointestinal tumors. *J Clin Lab Immunol* 1984;13:171-178.
16. Ridgway D, Borzy MS. Elevated production of interleukin-2 by lymphocytes from children with acute leukemia. *J Pediatr* 1989;114:384-391.
17. Wolf R E, Brelsford W G. Soluble interleukin-2 receptors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 1998;31:729-735.
18. Harrington D S, Patil K, Lai P K, Yasuda N N, Armitage J O, Ip S H, et al. Soluble interleukin-2 receptor in patients with malignant lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:597-601.
19. Takahashi S, Setoguchi Y, Nukiwa T, Kira S. Soluble interleukin-2 receptor in sera of patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 1991;99:310-314.

20. Kloster BE, John PA, Miller LE, Rubin LA, Nelson DL, Blair DC, et al. Soluble interleukin-2 receptors are elevated in patients with AIDS or at risk of developing AIDS. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;45:440-446.
21. Muller C, Knoflaclach P, Zielinski CC. Soluble interleukin-2 receptor in acute viral hepatitis and chronic liver disease. *Hepatology* 1989;10:928-932.
22. Symons JA, Wood NC, Di Giovine FS, Duff GW. Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1988;141:2612-2618.
23. Ho M, Webster HK, Green B, Looareesuwan S, Kongchareon S, White NJ. Defective production of and response to IL-2 in acute human falciparum malaria. *J Immunol* 1988;141:2775-2759.
24. Degiannis D, Seibold JR, Czarnecki M, Raskova J, Raska K. Soluble interleukin-2 receptors in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:375-380.
25. Colvin RB, Fuller TC, Mackeen L, Kung PC, Ip SH, Cosimi AB. Plasma interleukin-2 receptor levels in renal allograft recipients. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;43:273-276.
26. Fujinami R S, Oldstone M BA. Antiviral antibody reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature* 1979;279:529-530.
27. Diamantstein T, Osawa H, Mousaki A, Josimovic AO. Regulation of interleukin- receptor expression and receptor release. *Mol Immunol* 1968;23:1165-1172.
28. Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, Yoshimura E, Ohmiya M, Tani Y, et al. Serum levels of soluble interleukin-2 receptors and effects of interferon - $\alpha$  in patients wiht chronic hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 1995;40:1837-1841.
29. Knodell RG, Ishak KG, Black WC. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435.
30. Fattovich G, Vinate F, Giustina G, Morosato L, Alberti A, Pizzolo G. Serum levels of soluble CD30 in chronic hepatitis B virus infection. *Clin Exp Immunol* 1996;103:105-110.

## La Gaceta Médica de Caracas hace 100 años

### “Crónica”

“Corresponde el presente número al 31 de enero de 1901, es decir, nos encontramos laborando en pleno siglo XX. Entra por lo tanto la Gaceta Médica de Caracas en el octavo año de su agitada existencia. Tropezando hoy, cayendo después, levántandose siempre, tal ha sido el modo de vivir el periódico, órgano del Colegio de Médicos de la República.

Tropiezos y caídas, debidos unas veces á las circunstancias inherentes á nuestra existencia nacional, otros á los hombres. Doloroso es decirlo, pero cierto, la Gaceta Médica de Caracas ha sido víctima y lo es aun de un gran número de personas de las llamadas á sostenerla, unas, con sus luces ayudando de este modo á su vida intelectual, los otros con su contingente material el que es indispensable aun cuando hoy esté el periódico si se quiere hasta desahogado.

A uno y otros hago una llamada, por considerar el sostenimiento de la Gaceta Médica como asunto de amor propio, como punto de honor profesional.

No hagamos el vacío á una obra que si bien humilde en algunas de sus producciones, debemos tener en cuenta que es el órgano oficial de un gremio que como el médico necesita cambio de ideas incesantemente, la Medicina es acaso la ciencia que más progresa en menos tiempo y precisa tener vehículos para trasportar de unas á otras regiones de la tierra el producto de sus trabajos.

Por todas estas consideraciones y otras muchas que no dejan de ser evidentes, me tomo la libertad de excitar á los colegas renuentes á entrar en la lucha, lo hagan cuanto antes y habrán cumplido con un grato deber” (Herrera Vegas A. *Gac Méd Caracas* 1901;8:13).