

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC

**CARACTERIZACION DEL ESTADO FUNCIONAL DEL
SISTEMA INMUNITARIO EN INDIVIDUOS DE DIFERENTE
ENTORNO GEOGRÁFICO. ANALISIS DEL IMPACTO DE
LA INFECCIÓN CRÓNICA ASINTOMÁTICA POR VIRUS B**

TESIS DOCTORAL

FRANCISCA MONSALVE DE CASTILLO
ALCALÁ DE HENARES, 2008

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC**



**CARACTERIZACION DEL ESTADO FUNCIONAL DEL
SISTEMA INMUNITARIO EN INDIVIDUOS DE DIFERENTE
ENTORNO GEOGRÁFICO. ANALISIS DEL IMPACTO DE
LA INFECCIÓN CRÓNICA ASINTOMÁTICA POR VIRUS B**

TESIS DOCTORAL

Francisca Monsalve de Castillo

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,

Catedrático de Medicina y Departamento de Medicina
Universidad de Alcalá

Agustín Albillos Martínez,

Catedrático de Medicina y Departamento de Medicina
Universidad de Alcalá

Tania Romero Adrián,

Catedrático de Medicina y Departamento de Inmunología
Universidad del Zulia

**DOY GRACIAS A DIOS, FUENTE DE TODA SABIDURIA,
POR HABERME PERMITIDO LLEGAR A ESTA META**

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo **Nestor** por su comprensión y paciencia por todos esos momentos que tuviste que estar solo, mientras yo me dedicaba al desarrollo de esta investigación, gracias por tu apoyo, sin él no hubiese podido llegar hasta aquí.

A mis hijos, **Diana y Nestor E**, inspiraciones de cada una de las metas que me he trazado en la vida, gracias doy a Dios por haberlos traído a mi vida.

A mi querida institución "**Universidad del Zulia**" por haber formado en mí no solo un profesional con ética, responsabilidad y mística de trabajo, sino por darme la oportunidad de seguir creciendo académica, profesional y personalmente cada día.

Al Profesor Dr. **Melchor Álvarez de Mom**, por hacer realidad a través de su programa de formación doctoral el deseo de muchos de nosotros de alcanzar esta meta, que en otras circunstancias no hubiese sido posible. Personalmente le agradezco el estar siempre abierto y disponible a acceder a favor de mis objetivos, abrirme sus puertas permitiendo llevar a cabo toda la fase experimental de esta investigación en el Laboratorio que tan dignamente dirige, así como el financiamiento de esta fase, gracias a ello fue posible la realización de este estudio. Y sobre todo gracias porque he tenido la oportunidad de conocer a una persona con una gran calidad humana.

A mi co-director Profesor Dr. **Agustín Albillos**, por su dedicación, paciencia y esa gran disposición que siempre me demostró, gracias por sus observaciones siempre tan acertadas, por haberme hecho sentir que no estaba sola en este camino, que usted estaba allí para apoyarme.

A **Elisa**, gracias doy a Dios por haberte tenido en esos momentos en los que lejos de mi país me sentía desorientada, tú fuiste mi apoyo y mi orientadora, gracias porque a pesar de tu propio trabajo, me dedicaste el tiempo necesario para estar

conmigo en esa fase determinante de mi investigación como fue la fase experimental.

Al personal del Laboratorio de Enfermedades Inmunes, especialmente al Profesor **Eduardo Reyes** y Srta **Ana Belén** por su colaboración y paciencia con cada error que cometí, pero que gracias a ustedes aprendí de ellos. Gracias Eduardo por tu optimismo en momentos en que todo parecía no tener solución.

A mi co-directora, Profesora Dra. **Tania Romero**, por haber compartido conmigo sus conocimientos, su experiencia, su valioso tiempo, su optimismo y sobre todo su amistad. Gracias a todo ello he podido llegar a este momento. Me enorgullece haber sido su alumna.

A todas mis compañeras. Recuerdan cuando por primera vez nos ofrecieron esta oportunidad y que juntas decidimos transitar por este camino y llegar a una meta. Aquí estamos, les deseo al igual que ustedes me lo desearon a mi, que todas disfruten de la satisfacción de llegar a este momento, que en un tiempo atrás parecía, no imposible, pero si difícil.

A cada uno de los pacientes que participaron en este estudio, especialmente a las comunidades indígenas, de ustedes aprendí que no hay mayor virtud en un hombre que su transparencia y su inocencia de niño, las cuales ustedes aun conservan.

A mis estudiantes, compañeros de jornadas de trabajo en este estudio, sin ustedes no hubiese sido posible aportar este grano de arena que nos enorgullece hoy en día.

A mis compañeros de trabajo, por su estímulo y colaboración en aquellos momentos difíciles por los que tuve que atravesar, por su comprensión en mis

largas ausencias, en la que ustedes tuvieron que asumir mis responsabilidades. A ustedes también debo el haber concluido con éxito esta meta.

A mi amigo Jesús Estévez, por su apoyo y asesoría estadística, cada día aprendí algo nuevo en esta materia que hizo que le tomara interés. Gracias Jesús por tu ayuda.

A mis amigas, especialmente a **Ana Egle** y **Luciana Costa**, por todos sus buenos deseos, por ser siempre incondicionales, por su apoyo y estímulo en aquellos momentos que lo necesite.

A mi nieta, **AITANA**, tu llegada nos ha llenado de vida, tu presencia estimula en cada uno de nosotros el deseo de trazarnos nuevas metas y el ánimo para llegar a ellas. Dios te bendiga mi cielo.

A mis hijos desaparecidos, **Erika** y **Víctor Manuel**, ustedes son mis ángeles guardianes en cada fase de mi vida.

A mis padres, que aunque ausente, me hacen sentir cada día que no me han dejado sola, gracias por haberme dado un hogar, una educación y sobre todo su amor incondicional.

A todas aquellas personas que en este momento se me escapan, mi memoria cada día es peor, pero que estuvieron en algún momento para darme su apoyo y una palabra de aliento para seguir adelante.

Y de nuevo te doy gracias a ti mi **DIOS**, sin tu asistencia nunca hubiese llegado hasta aquí.

INDICE

ABREVIATURAS**SUMMARY****I. INTRODUCCIÓN**

I.1 Infección por el virus de hepatitis B	1
I.2. Historia	2
I.3 Agente etiológico	2
I.3.1. Morfología e infectividad del virus B	2
I.3.2. Características del genoma de virus B	4
I.3.3. Genotipos del virus B	5
I.3.4. Mutaciones del virus B	6
I.4 Mecanismo de Transmisión y Factores de Riesgo	7
I.4.1 Transmisión horizontal	7
I.4.2. Transmisión vertical	8
I.5. Ciclo evolutivo del Virus B	10
I.6. Clínica de la infección por el virus B	12
I.6.1. Hepatitis aguda	12
I.6.2. Hepatitis crónica	12
I.6.2.1. Hepatitis crónica B HBeAg positiva	13
I.6.2.2. Hepatitis crónica HBeAg negativo	13
I.6.3 Portador asintomático	14
I.6.4. Cirrosis	14
I.6.5. Hepatocarcinoma celular	15
I.6.6. Infección oculta por el virus B	16
I.6.7. Significado del término portador crónico del VHB y hepatitis crónica por el VHB	17
I.7. Diagnóstico de laboratorio, evolución y seguimiento de la infección por el Virus B	18
I.7.1. Pruebas funcionales hepáticas	19
I.7.2. Marcadores serológicos	19
I.7.2.1 Detección del Antígeno de superficie del VHB	19

I.7.2.2. Detección del Antígeno del core	20
I.7.2.3. Detección del Antígeno “e”	20
I.7.2.4. Detección de otros Antígenos del virus B	20
I.7.2.5. Anticuerpos frente al antígeno de superficie del virus B	21
I.7.2.6. Detección de anticuerpos frente al antígeno del core del virus B	21
I.7.2.7. Detección de anticuerpos frente al antígeno del core del tipo IgM del virus B	22
I.7.2.8. Detección de anticuerpos frente al antígeno “e”	23
I.7.2.9. Otros anticuerpos frente al VHB (anti-HBx, anti-PreS1 y anti-PreS2)	23
I.7.3. Análisis de la Alfa-fetoproteína	23
I.7.4. Tecnología de biología molecular	24
I.7.4.1. DNA del virus B	24
I.7.5. Otros estudios	24
I.7.5.1. Carga viral del VHB	24
I.7.5.2. Ecografía	25
I.7.5.3. Biopsia hepática	25
I.8. Epidemiología de la infección por virus B	25
I.8.1. Prevalencia del virus B	27
I.8.2. Prevalencia del virus B en Venezuela	28
I.8.3. Prevalencia del virus B en España	29
I.9. Citoquinas	31
I.9.1. Concepto	31
I.9.2. Citoquinas producidas en la respuesta inmune innata	32
I.9.2.1. Interleucina 1 (IL-1).	33
I.9.2.2. Interleucina 6 (IL-6).	33
I.9.2.3. TNF.	34
I.9.2.4. Interleucina 10 (IL-10).	34
I.9.2.5. Interleucina 12 (IL-12).	35
I.9.2.6. Interleucina 18 (IL-18).	35

I.9.2.7. Interferones tipo I.	36
I.9.3. Citoquinas producidas en la respuesta inmune adaptativa	37
I.9.3.1. Interleucina 2 (IL-2).	38
I.9.3.2. Interferón (IFN).	39
I.9.4. Receptores de las Citoquinas.	40
I.10. Respuesta Inmunitaria y participación de las Citoquinas en la infección por Virus B	40
I.11. Influencia del medio ambiente sobre el sistema inmunitario	45
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1 Diseño del Estudio	53
III.1.1 Tipo de Diseño	53
III.1.2 Período de Estudio	53
III.1.3. Ámbito del Estudio	53
III.1.4. Selección de la Población y procedencia de la misma	53
III.1.5. Criterio de Inclusión	55
III.1.6. Criterio de Exclusión	55
III.2. Organización de la Toma de Muestra	56
IV.2.1 Recolección de la muestra de suero	56
III.3. Métodos	57
IV.3.1. Detección de marcadores serológicos de Hepatitis B: anti-HBc, HBsAg, HBeAg, anti-HBc-IgM y anti-HBs	57
IV.3.2. Detección del DNA viral (Técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa)	58
IV.3.3 Determinación de los niveles de Citoquinas	61
IV.3.3.1. Cuantificación de IL-2, IL-6, IL-10 e INF γ	61
IV.3.3.2. Cuantificación de los niveles de citoquinas de: IL-12, IL-	

18 y TNF- α	62
III.4. Organización de la información recogida	63
IV.4.1. Descripción de las variables de la Base de datos	63
IV.4.1.1. Variables Generales de los grupos de estudio	63
IV.4.1.2. Variable Grupo	64
IV.4.1.3. Variable Clínica	64
IV.4.1.4. Variable marcador serológico para infección crónica por virus B	64
IV.4.1.5. Variables Cuantitativas	64
III.5. Análisis Estadístico	64
III.6. Búsqueda bibliográfica	64
IV. RESULTADOS	
IV.1. Características demográficas de la población estudiada	67
IV.1.1 Características de los individuos no infectados por el VHB	67
IV.2. Evaluación de Citoquinas séricas en grupos no infectados por el VHB del entorno geográfico de Venezuela y España	68
IV.2.1. Evaluación de IL-2	69
IV.2.2. Evaluación de IL-6	70
IV.2.3. Evaluación de IL-10	71
IV.2.4. Evaluación de TNF- α y de IFN- γ	72
IV.2.5. Evaluación de IL-12 e IL-18	73
IV.3. Características de la población de pacientes con infección crónica asintomática por el VHB	74
IV.3.1. Evaluación de citoquinas séricas en pacientes con infección crónica por el VHB y en controles no infectados por el VHB	76
IV.3.1.1. Evaluación de IL-2	77

IV.3.1.2. Evaluación de IL-6	78
IV.3.1.3. Evaluación de IL-10	79
IV.3.1.4. Evaluación de INF- γ	80
IV.3.1.5 Evaluación de TNF- α	81
IV.3.1.6. Evaluación de IL-12 e IL-18	82
IV.4. Resumen de los resultados del patrón de citoquina en suero	84
V. DISCUSIÓN	
V.1. Individuos no infectados por el virus B	85
V.2. Pacientes asintomáticos con infección crónica por VHB	91
VI. CONCLUSIONES	98
VII. BIBLIOGRAFÍA	100
VIII. ANEXOS	115

ABREVIATURAS

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHA : Virus de Hepatitis A

HBsAg: Antígeno de superficie de hepatitis B

nm: nanómetros

ADN: Acido desoxirribonucléico

ORF: Fragmentos de lectura abierta

HBcAg: Antígeno del core de la hepatitis B

AgeHB: Antígeno “e” del virus de la hepatitis B

HBxAg: Antígeno “x “ de hepatitis B

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

AASLD : Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades del Hígado

anti-HBs: Anticuerpos frente al antígeno de superficie del virus B

anti-HBe: Anticuerpos frente al antígeno “e”

ALT : alanino amino transferasa

ARN: Acido Ribonucléico

VHC : Virus de Hepatitis C

HCC: Hepatocarcinoma celular

ALT: Alanina aminotransferasa

ELISA: Ensayo inmunoenzimático

ng: nanógramos

ml: mililitros

KDa: Kilodalton

UI: unidades internacionales

anti-HBc: Anticuerpos totales frente al antígeno del core del virus B

anti-HBc IgM: Anticuerpos de tipo IgM frente al antígeno del core del virus B

anti-HBx: Anticuerpos contra el HBxAg

AFP: Alfa-fetoproteína

CHP: Carcinoma Hepatocelular Primario

Th: célula T cooperadora (T helper)

IL-1 : Interleucina-1

IL-2 : Interleucina- 2

TNF- α : Factores de necrosis tumoral α

TGF: Factor transformante de tejidos

NK: Citotóxicas naturales

IL-6 : Interleucina- 6

IL-3 : Interleucina- 3

TNF- β : Factores de necrosis tumoral β

IL-8: Interleucina- 8

IL-10 : Interleucina -10

IFN γ : Interferón γ

IFN α : Interferón α

IL-12 : Interleucina-12

IgG: Inmunoglobulina de la clase G

LAK: linfocitos asesinos activados por linfocinas

IL-18 : Interleucina- 18

INF β : Interféron β

TCD4+: Linfocitos T cooperadores CD4+

IL-4: Interleucina-4

IL-5 : Interleucina- 5

IL-13 : Interleucina-13

TCD8+ : Linfocitos T citotóxicos CD8+

IL-16: Interleucina- 16

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

TGF-beta: Factor transformante de granulocitos beta

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

LT: Linfocito T

RsIL-2: Receptor soluble de interleucina- 2

um: micras

MEIA: Análisis inmunoenzimático de micropartículas

Ag: Antígeno

Ac: Anticuerpo

C: Conjugado

MUP: Metil Umberil fosfato

MU: Metil umberilferona

DNAr: Acido Desoxirribonucléico recombinante

VIH: Vírus de Inmunodeficiencia Humana

TMB: Tetrametilbenzidina

pg: picogramos

NI-VHB: No infectados por el VHB

DS: Desviación estándar

dUTP: dinucleotido Uracilo Timidina Fosfato

dTTP dinucleotido Timidina Timidina Fosfato

HRP: Peroxidasa

MIF: Factor Inhibidor de Macrófagos

MIP: Proteína inflamatoria de Macrófagos

SUMMARY

Infection by the hepatitis B virus (HBV) is a disease that has affected humanity since the beginning of its history. Because it is a non-cytopathic virus, its capacity to create lesions and progress toward chronicity is conditioned by the immunological reaction, basically of cellular type, determined by the host's capacity to eliminate the viral particle from the infected hepatocytes; the degree of hepatocellular damage that follows varies according to the immune system reaction of the affected individual. In this context the study of the cytokines in certain pathologies improves the understanding of their participation as mediators in the immune reaction. Various studies have evaluated the association between exposure to the environment and the development of different clinical-pathological entities, revealing influences of the environment on the immune system. To further the knowledge about B virus infection and the impact the geographical environment and epidemiologic could have the functional state of the immune system was studied in individuals not infected and chronically infected by of HBV belonging to different geographical areas from Venezuela and Spain, by quantifying the circulating cytokines (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α and IFN- γ). Serologic marker detection for chronic asymptomatic HBV infection and serologic cytokine determination were made using commercial ELISA techniques.

Significant differences were found among the groups studied. Indigenous people not infected by HBV evidenced the predominant phenotype Th2 (IL-6, IL-10 and TNF- α) with a decrease in IFN- γ , they differed from urban, non-infected Venezuelans in whom the predominant cytokine was IFN- γ with a decrease in the alert cytokines (IL-6, IL-10 and TNF- α). In NI-HBV Spaniards, a significant increase in IL-6 with non-detectable IL-2 (Th1) and decreased IL-10 were noted. For indigenous carriers and their non-infected equivalents, cytokines showed similar behavior. In urban Venezuelan carriers, significant serum levels of IL-2 (Th1) and the cytokines IL-6, IL-10 and TNF- α (Th2) were present.

This study has demonstrated that differences in serum levels exist for the cytokines measured in groups from different geographical surroundings (Spain and Venezuela).

Geographical location and environmental and socio-cultural factors can be noted in the different serum concentration patterns for circulating cytokines. The impact of chronic hepatitis B virus infection is associated with different variation patterns in the serum cytokine concentrations in native or urban Venezuelan patients. Therefore, exogenous factors exist that condition the functional state of the immune system in healthy subjects and those who demonstrate evidence of chronic infection, indicating that normality margins for analytic immunological variables should be adapted to the populations under study.

I. INTRODUCCION

I.1. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

La infección causada por el virus de la hepatitis B (VHB) se ha constituido en una enfermedad que ha afectado a la humanidad desde el principio de su historia. Se le considera el agente etiológico de infección hepática aguda y crónica, así como el responsable del desarrollo de cirrosis y hepatocarcinoma (Arie J, 2007; Echevarria JM, 2006; Núñez M et al, 2004; Ruiz A et al, 2003). Existen aproximadamente unos trescientos cincuenta millones de portadores del VHB en el mundo y es responsable en forma directa o indirecta de más de medio millón de muertes anuales (Lai C et al, 2003; Chisari F, 2000). Es un agente con patrón de circulación endémico y amplia distribución geográfica, siendo el hombre su único huésped natural (Echevarria JM, 2006).

Su incidencia ha disminuido en los últimos años, consecuencia de la implementación de programas de vacunación en la población general. Sin embargo, sigue representando un problema sanitario importante que obliga a la prevención educacional por inmunización y en otros casos a las intervenciones terapéuticas para evitar la progresión de la enfermedad hepática.

Siendo un virus no citopático, su capacidad de lesión y progreso a la cronicidad estará condicionada por la respuesta inmunológica, básicamente de tipo celular. Aunque la mayoría de los individuos (90%-95% aproximadamente) que cursan con una infección por el VHB la resuelven satisfactoriamente, existe un porcentaje importante que en algunas poblaciones alcanza más del 50%, en las cuales persiste de forma indefinida. Se considera que ello se debe más a las particularidades de la respuesta inmunitaria de la persona afectada que a la cepa viral involucrada.

I.2. HISTORIA.

La hepatitis es una enfermedad que data de siglos atrás y antes de la segunda guerra mundial, no se sabía que la misma era causada por un virus. En 1947 el médico británico F. O. MacCallum, utilizando voluntarios humanos, diferencia la infección por el virus de hepatitis A (VHA), que se propagaba a través de alimentos y agua contaminados, de la infección por el VHB, propagada a través de la sangre. Durante la siguiente década se promovió una campaña de análisis de sangre que redujo enormemente la incidencia de la hepatitis B transmitida por transfusiones de sangre (Patlak M, 2006).

En 1964, Baruch Blumberg, descubre en una muestra de sangre proveniente de un aborigen australiano, un antígeno, al que llamó Antígeno Australia y que fue encontrado exclusivamente en los pacientes con infección por el virus B. Este antígeno fue denominado posteriormente antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg). La caracterización del HBsAg permitió su estudio adicional en vista de la incapacidad de aislar el virus. En 1970, Danés y cols., descubren la partícula completa del virus en muestras de sangre examinadas al microscopio electrónico y en 1981, fue autorizada la primera vacuna contra la hepatitis B (Patlak M, 2006; Fatovich G^{a,b}, 2003).

I.3. AGENTE ETIOLOGICO.

I.3.1. Morfología e infectividad del virus B.

El VHB es un virus de forma esférica de 42 nm de diámetro, con dos zonas: una interna de 27 nm denominada núcleo o *core*, donde se encuentra el genoma, y una más externa de composición lipoproteíca (Figura 1). Es un virus DNA y se clasifica dentro del género *Hepadnavirus*, grupo que infecta exclusivamente a los mamíferos, y al que pertenece el virus de la marmota americana y el virus de la ardilla (Echevarria JM, 2006; Desfilis M, 2006).

El suero de individuos infectados con el VHB contiene tres formas que expresan el HBsAg, la partícula Dane completa de forma esférica con DNA de 42 nm y las partículas virales incompletas, esféricas y filamentosas de 22 nm las cuales fueron las primeras formas carentes de DNA observadas el microscopio electrónico. Las concentraciones de las formas incompletas superan a las formas completas (Echevarria JM, 2006).

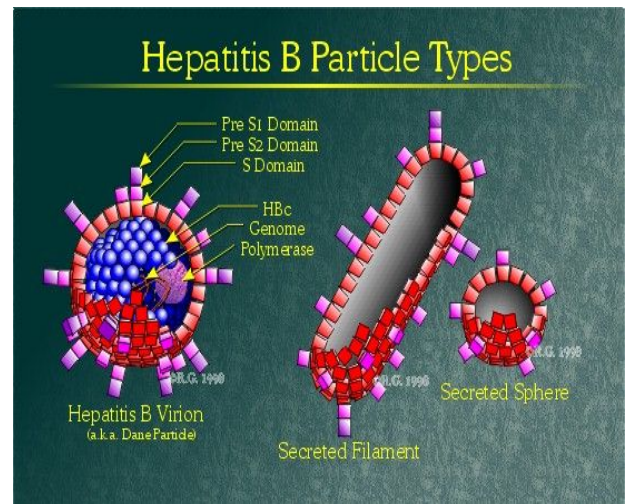


Figura 1. Diversas formas de la morfología del VHB.
Fuente: <http://www.globalseve.net/~robertq/HBV/hbvparts>

El virus de la hepatitis B mantiene su infectividad para humanos al almacenar el suero por 6 meses entre 30°C a 32°C y cuando es congelado a -20°C por 15 años. Puede permanecer viable almacenado a 25°C por una semana (Rodríguez C, 2000). Cuando el VHB es sometido a una temperatura de 60°C por más de 4 horas, puede infectar voluntarios humanos (Murria R, 1953). La infectividad del virus ha sido destruida a 160°C después de 1 hora (Salaman M, 1944). El HBsAg es estable a pH 2 y por encima de 6 horas, en estas condiciones la infectividad del VHB se pierde. En otros experimentos el VHB fue expuesto por 10' a 20°C utilizando desinfectantes como hipoclorito de sodio, alcohol isopropílico al 70% entre otros para luego ser inoculado a chimpancés, ninguno de los animales mostró signos de infección después de la inoculación del virus B tratado con agentes químicos (Bond W, 1983).

I.3.2. Características del genoma del virus B.

La estructura genómica del VHB está formada por dos cadenas de DNA de 3200 nucleótidos, una negativa completa y otra positiva incompleta. Dentro del genoma se distinguen cuatro fragmentos de lectura abierta (ORF) las cuales codifican diferentes proteínas vírales (Echevarria JM, 2006; Rodríguez C, 2000).

La región S está formada por las regiones pre-S1 y pre-S2, dando origen a tres proteínas en la cubierta del virus: la proteína SHBs, MHBs y LHBs codificadas por el gen S. La SHBs es la que se encuentra en mayor cantidad y lleva la antigenicidad del HBsAg, la MHBs y la región pre-S2 la cual contienen un sitio de unión para la albúmina humana polimerizada y la LHBs de mayor peso molecular, representa un producto de pre-S1, pre-S2 y del gen S. Su función está involucrada en la unión del VHB al hepatocito (Echevarria JM, 2006; Rodríguez C, 2000; Robinsón W, 1977)

(Figura 2).

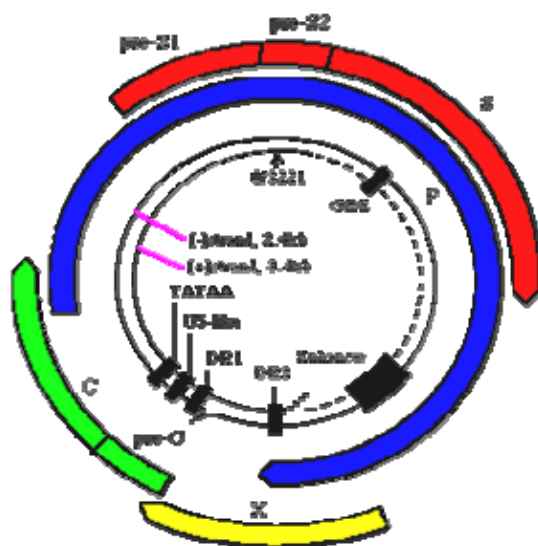


Figura 2. Genoma viral: la proteína core (C); la polimerasa (P); tres polipéptidos del HBsAg, la región S (pre-S1- pre-S2 y S) y X; proteína transactivadora de transcripción viral. (Fuente: www.micro.msb.le.a.uk)

La región C codifica la proteína o antígeno del core (HBcAg), precedida por la región pre-core de 90 nucleótidos aproximadamente. Tanto la región C como la región pre-core codifican el antígeno "e" (HBeAg) (Desfilis M, 2006). El antígeno del core a diferencia de los anteriores, no se detecta en suero en forma libre, ya que permanece incorporado al hepatocito (Arie J, 2006). El HBeAg descubierto en 1972, es física y antígenicamente diferente del HBsAg y del HBcAg. Se encuentra en forma soluble en suero, con un peso molecular

de 30.000 Daltons.

La región P por su parte codifica la DNA-polimerasa cuya actividad, de transcriptasa inversa, se asocia a replicación del virus. La región X codifica una proteína no estructural conocida como antígeno “x” (HBxAg) con capacidad transactivadora cuya función esta asociada con la regulación de la expresión de los genes vírales (Echevarria JM, 2006; Desfilis M, 2006).

I.3.3. Genotipos del virus B.

Hasta la fecha han sido identificados ocho genotipos distintos, clasificados por letras (genotipos A-H) del VHB, así como algunos genosubtipos dentro de los genotipos A (A1-3), B (B1-3), C (C1-4), D (D1-4) y F (F1-2). Los genotipos A y D son ubicuos, pero los restantes exhiben diferentes restricciones geográficas. Combinando el genotipo con las características inmunológicas del HBsAg (subtipos antigénicos), se diferencian hasta 20 grupos diferentes dentro del VHB (Kramvis A et al, 2005; Lai C et al, 2003).

En cuanto a su distribución geográfica, por ejemplo, el genotipo A se ha podido encontrar en áreas del Noreste de Europa (Echevarría JM, 2006; Echevarría JM et al, 2004), América del Norte, Filipinas, Hong-Kong y en el Sur de África; el genotipo B, principalmente en la población indígena del Sureste Asiático (Kurvanov F et al, 2005; Norder et al, 2004) y el genotipo C, en las Islas del Pacífico, China y Hong Kong (Yuan J et al, 2007; Man F et al, 2004). El genotipo D se plantea que tiene una distribución universal, aunque se encuentra con mayor frecuencia en regiones como Sur de Europa (Echevarría JM et al, 2004), África del Norte y en la India; el genotipo E, se distribuye en América Central y del Sur. El genotipo F es prevalente en América Latina específicamente en poblaciones indígenas (Devesa M et al, 2007; Blitz L et al, 1998). Finalmente, la distribución geográfica más frecuente del genotipo G se encuentra en países como Francia y Estados Unidos; no obstante, por el fenómeno de migración que ocurre mundialmente, estos genotipos pudiesen tener una distribución más dinámica (Kramvis A et al, 2005; Ruiz A et al, 2003; Kidd L et al, 2002)

Tanto los subtipos como los genotipos que se han podido caracterizar tienen una distribución geográfica variable; por ejemplo, los subtipos *adw* predominan en América, Australia, África del Norte, Mediterráneo Oriental, Europa Oriental, India, Asia Central y del Norte; en el caso del *adr*, tiene una mayor distribución en países como China, Sureste Asiático, Japón e Islas del Pacífico; el *adr* y *adw*, en Malasia, Tailandia, Indonesia y Nueva Guinea (Kramvis A et al, 2005)

Chu C (2002), (Tabla 1) indica la localización geográfica de los diferentes genotipos en ciertas zonas del mundo, aunque nunca de forma exclusiva. El interés actual de los genotipos, aparte del epidemiológico, es su relación con ciertos aspectos evolutivos y terapéuticos del virus (Erhardt A et al, 2005; Akuta N et al, 2003; Chu C et al, 2002).

Tabla 1. Prevalencia de los genotipos según la zona geográfica.

Genotipo	Subtipo	Distribución geográfica predominante
A	<i>adw2, ayw1</i>	Noroeste de Europa, Norteamérica y África Central
B	<i>adw2, ayw1</i>	Sudeste de Asia, China y Japón
C	<i>ayr, adrq+, adrq- adw2</i>	Sudeste de Asia, China y Japón
D	<i>ayw2, ayw3</i>	Sur Europa, Oriente Medio e India
E	<i>ayw4</i>	África
F	<i>adw4q-</i>	Nativos americanos, Polinesia, América Central y Sur
G	<i>adw2</i>	Francia y Estados Unidos

Fuente: Chu CJ and Lok AS, 2002

I.3.4. Mutaciones en el virus B.

En la actualidad se han detectado dos tipos de mutaciones en el VHB, unas naturales y otras secundarias a los tratamientos antivirales. De todas las mutaciones naturales la más importante es la descrita por Carman W y cols en 1989, denominada G1896A. Afecta a la región *precore/core* y determina la síntesis de la proteína *core* sin la fracción *precore*. Desde el punto de vista del diagnóstico,

la presencia de esta mutación implica la ausencia de secreción del HBeAg y esta relacionada con los genotipos B, C y D. En 1990, se describió una mutación en la misma zona del genoma, que determina la ausencia de síntesis de la proteína *core*. Consecuentemente, la infección por este virus mutante no expresa serológicamente anticuerpos contra el core (anti-HBc). La mutación más importante ha sido descrita por Liang T y cols, (1990), con múltiples variaciones en la estructura genómica que da lugar a una infección por el VHB que no expresa ningún antígeno viral. Por último, se ha descrito otra mutación que afecta a la proteína S, en la posición 145, y que condiciona una forma viral frente a la cual los anticuerpos inducidos por la vacunación no protegen al individuo vacunado.

Estas mutaciones pueden repercutir en el nivel de respuesta inmunitaria al virus, la forma de evolución de la enfermedad y su respuesta a las diferentes drogas (Yuen M et al, 2004); hasta el momento se han descrito un gran número de mutaciones en el genoma del VHB; la mayoría de estas parecen ser "silentes", o no relevantes desde el punto de vista clínico. No obstante, se han descrito mecanismos de evasión de supervivencia inmunológica en el huésped, como en los mutantes de escape S; incremento de la severidad de la enfermedad, relacionados con mutaciones en la región del core, sitio promotor del core o pre-core; fenómenos de resistencia a los agentes antivirales por mutaciones en la ADN polimerasa y carcinogénesis hepatocelular dado por los mutantes X (Ruiz A et al, 2003; Minuk G, 2001).

I.4. MECANISMO DE TRANSMISIÓN Y FACTORES DE RIESGO.

I.4.1. Transmisión horizontal.

El VHB se transmite fundamentalmente por vía parenteral y sexual. Los pacientes en hemodiálisis (Kondili L et al, 2006; Burdick R et al, 2003), los politransfundidos como los hemofílicos (López L et al, 2005; Langar H et al, 2005; Ghosh K et al, 2000), receptores de transplantes y aquellos recluidos en instituciones para minusválidos mentales son consideradas poblaciones de alto riesgo a contraer la

infección. Otro grupo importante a contraer la infección por el VHB a través de la vía parenteral sigue siendo los usuarios de drogas por vía intravenosa (**Vassilev Z et al, 2006; Shapatava E et al, 2006; Huo T et al, 2004**). Los profesionales sanitarios a través de pinchazos o cortes con agujas y bisturís contaminados con sangre de pacientes (**Meyer U, 2005; Alamillos O et al, 1999**), este personal no sólo está expuesto a infectarse de sus pacientes, sino constituir fuente de infección a los mismos (**Tarantola A et al, 2006; Smellie M et al, 2006; Bilski B et al, 2005; Búster E et al, 2004**). El riesgo de transmisión del virus suele ocurrir en intervenciones quirúrgicas invasivas como sucede en la cirugía ginecológica y abdominal (**DieI R et al, 2005**). En los países menos desarrollados el VHB puede transmitirse de paciente a paciente en centros sanitarios por el empleo de procedimientos invasivos en los que no se aplican todas las precauciones necesarias para evitar transmisiones vía nosocomial (**Kondili L et al, 2006; Bracho M et al, 2006**).

Las personas sexualmente promiscuas, tanto homosexuales masculinos como heterosexuales, están particularmente expuestas a contraer la infección por el virus B (**Atkins M et al, 2005; Huo T et al, 2004; Moreno D et al, 2004**). Los factores asociados a un mayor riesgo en la transmisión son el número de parejas sexuales (**Vildoza M et al, 2006**), los años de actividad sexual, historia de enfermedades de transmisión sexual y el coito anal receptivo (**Diamond C et al, 2003; Russi J et al, 2003**).

La posibilidad de que el VHB sea transmitido por insectos, como mosquitos, aunque no ha sido totalmente descartada, no parece ser un medio mayor de diseminación (**Ghoda M et al, 2005; Zheng Y et al, 1995; Fouche A et al, 1990**).

I.4.2. Transmisión vertical.

La transmisión materno-neonatal debido a madres infectadas (HBeAg +) es bien sabida y de suma trascendencia ya que la infección en etapas tempranas de la vida, particularmente en el primer año, esta asociado al desarrollo de una infección persistente en el infante (**Wang J et al, 2005; Chakravarti A et al, 2005**). Se han reportado infecciones fulminantes en neonatos nacidos de madres HBsAg+;

HBeAg- (Friedt M et al, 2004; Chen H et al, 2004; Soderstrom A et al, 2003) quienes poseen bajos niveles de ADN-VHB detectable en suero medido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Wang J et al, 2005; Sangfelt P et al, 2004; Wang Z et al, 2003). Se consideran que estos pacientes se encuentran en una fase de inmunotolerancia. Muchos de ellos desarrollan una hepatitis crónica HBeAg+ con elevados niveles de transaminasas (Lok A et al, 2007).

Los recién nacidos de mujeres infectadas por VHB están expuestos a infectarse en el momento del parto presentando un riesgo superior al 90% de evolucionar a una infección crónica por el VHB (Boxall E et al, 2004; Ranger R et al, 2002). Algunos infectados con la variante *precore* defectiva del VHB (casos anti-HBe positivo) pueden desarrollar una hepatitis fulminante (Iitsuka T et al, 2004; Friedt M et al, 1999; Sterneck M et al, 1998). La transmisión intrauterina ocurre en menos de 5% de los casos y no es prevenible, en tanto que el restante 95% de las infecciones ocurre durante el período perinatal y pueden evitarse por inmunoprofilaxis. Se estima que en el mundo cada año nacen 1.3 millones de niños infectados, con posibilidades de morir con hepatitis B crónica a largo plazo (Wright T, 2006).

En España la vacunación universal frente a la infección, introducida a principios de la década de 1990 (Kane M, 1998), ha reducido la incidencia de esta infección, sobre todo en el grupo de población más joven (Sallera L et al, 2005; Rodríguez C et al, 2003). En Taiwán, la vacunación de los recién nacidos iniciada en 1984, ha conseguido una reducción del número de portadores crónicos de HBsAg (Lin H et al, 2003), de la tasa de hepatitis fulminante por VHB en niños de más de un año de edad (Chen H et al, 2004; Kao J et al, 2001) y de la tasa de carcinoma hepatocelular infantil, que ha pasado de 0,7 casos a 0,36 casos por 100.000 habitantes a los 10 años de iniciarse el programa de vacunación universal (Chang M et al, 1997).

Los distintos mecanismos de contagio tienen un impacto epidemiológico diferente. La transmisión por vía sexual, actualmente la más importante por su

frecuencia, está implicada en el 41% de las hepatitis y explica la mayor prevalencia encontrada en las edades cercanas a la adolescencia y que los promiscuos homos o heterosexuales sean grupos de riesgo. El riesgo de transmisión por punción accidental se calcula en un 20% si el material infectante es HBeAg positivo. La transmisión por vía nosocomial a través de un médico o personal auxiliar portador del virus, aunque cuantitativamente es despreciable, plantea una serie de medidas ético-legales. El riesgo de transmisión se ha calculado para cirujanos portadores en un 0.24% y este riesgo es variable en razón de la existencia o no de replicación (Harling R, 2007; Buster E et al, 2004).

I.5. CICLO EVOLUTIVO DEL VIRUS B.

La adsorción del VHB a los hepatocitos se produce por interacción entre las glucoproteínas de superficie virales y algún receptor celular aún no identificado presente en la célula hepática. La penetración viral tiene lugar por fusión de membranas. La replicación se desarrolla luego en dos fases:

Una primera fase, en la que el genoma entra al núcleo, ocurre su conversión a un ADN circular covalentemente cerrado cuya cadena negativa es transcrita por la ARN

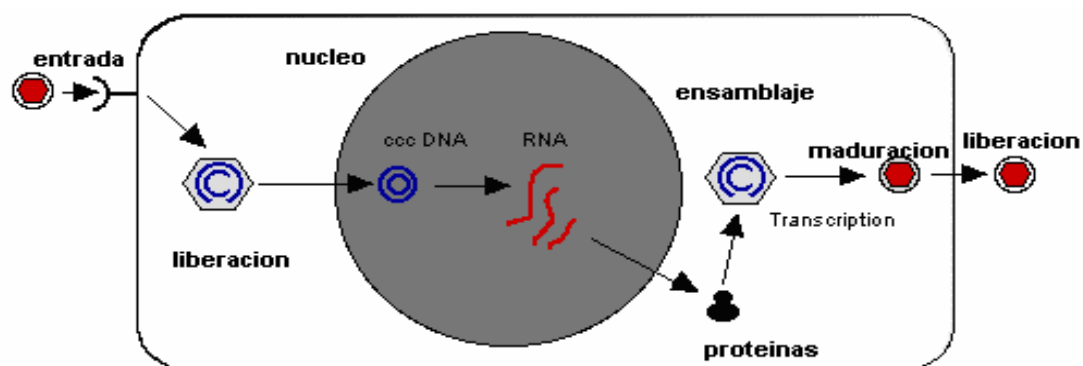


Figura 3. Ciclo evolutivo del VHB.

Fuente: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/HBV.html>

polimerasa II celular para dar lugar a varios mensajeros. Uno de ellos produce el HBcAg y otro por iniciación interna da origen a la ADN polimerasa viral. Este

segundo mensajero servirá además de molde para la retrotranscripción, que se produce durante la segunda fase, tras la salida al citoplasma. El acoplamiento de la ADN polimerasa viral al ARN molde induce, además, la incorporación de dímeros de HBcAg, con formación de cápsides incompletas (**Figura 3**).

De manera simultánea, otros mensajeros dirigen la síntesis de las glucoproteínas de la envuelta viral, que durante su paso por el retículo endoplásmico se van agregando en oligómeros para producir partículas virales vacías que emergen en el pre-Golgi. En este estado, con el ADN viral parcialmente sintetizado, las nucleocápsides que lo contienen se asocian a glucoproteínas de superficie ancladas en las membranas del retículo endoplásmico y, más tarde, brotan adquiriendo así la envuelta. La liberación de los viriones sucede por un mecanismo de excreción a través de las cisternas del retículo endoplásmico, lo que permite que se complete el proceso sin producir roturas en la membrana celular y sin originar la muerte de la célula.

Al mismo tiempo el genoma viral dirige la síntesis de HBsAg en cantidades muy superiores a las necesarias para generar envueltas. Este exceso de HBsAg es internalizado en el retículo endoplásmico en forma de agregados, que son excretados por el mismo mecanismo al exterior de la célula. Por su parte, la expresión de la región pre-C origina moléculas de HBeAg que presentan en su extremo aminoterminal un péptido señal para excreción y son vertidas al medio extracelular tras la separación del péptido por proteólisis. Así, la célula infectada produce y libera, a un tiempo, viriones maduros, agregados de HBsAg y moléculas individuales de HBeAg.

Durante todo este proceso, una parte de las proteínas estructurales del virus son procesadas por la maquinaria celular generando péptidos que son expuestos en la superficie celular en asociación con proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I. El HBcAg es el que genera los péptidos más inmunógenos y la respuesta inmunitaria celular se dirige, fundamentalmente, hacia epítomos contenidos en dicho antígeno (**Echevarria JM, 2006; Desfilis M, 2006**).

I.6. CLINICA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS B.

La expresión clínico patológica de la hepatitis B variará de acuerdo a la respuesta del sistema inmunitario pudiendo ser categorizada de la siguiente forma: expresiones de portador, hepatitis aguda, hepatitis fulminante y hepatitis crónica, las cuales pueden ser determinadas por estados de tolerancia, respuesta efectiva del sistema inmunitario, respuesta efectiva pero inadecuada y respuesta defectuosa respectivamente (Chisari F, 1995).

I.6.1. Hepatitis aguda.

Se expresa este cuadro con manifestaciones clínicas y biológicas y elevación de transaminasas con o sin elevación de la bilirrubina. El cuadro es clínicamente mucho más expresivo en adultos que en niños y no presenta ninguna característica clínica ni biológica especial que lo diferencie de otras hepatitis agudas virales o tóxicas. La evolución del proceso es hacia la curación en el 90% de los casos, con normalización de la cifra de transaminasas y seroconversión de los marcadores virales (Figura 4). En un 5% de casos la enfermedad evoluciona hacia una hepatitis crónica y sólo en un 1% puede desarrollar un fallo hepático agudo con elevada mortalidad (Echevarria JM, 2006; Desfilis M, 2006).

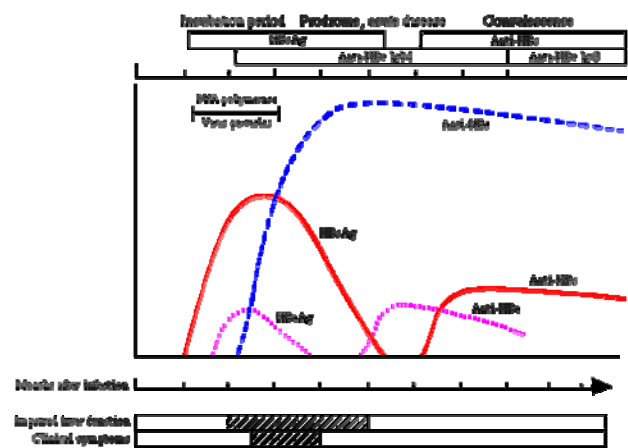


Figura 4. Curso clínico de la infección.

Fuente: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/HBV.html>

I.6.2. Hepatitis crónica.

Definido por la Asociación Americana para el Estudio de enfermedades del Hígado (AASLD) según consenso de definición y criterio diagnóstico para los términos clínicos de infección por el VHB adoptado por el Instituto Nacional de

Salud (national Institutes of Health) en la conferencia “Manejo de la hepatitis B” en el 2000 (Lok A et al, 2001) de acuerdo a las siguientes características: a) HBsAg positivo superior a 6 meses, b) DNA-VHB $>10^5$ copias/ml, c) elevación de las transaminasas de forma persistente o intermitente, y d) biopsia hepática demostrando actividad necroinflamatoria (índice de Knodell ≥ 4 ; criterio opcional).

Las características clínicas de las hepatitis crónicas no son diferentes de otras etiologías y son tanto más intensas cuando mayor lesión histológica existe. Se distinguen según la situación del sistema antígeno/anticuerpo dos tipos:

I.6.2.1. Hepatitis crónica B HBeAg positiva.

Se caracteriza, además de la positividad del HBeAg, por unos niveles de replicación relativamente constantes. Se calcula una posibilidad de seroconversión del sistema con pérdida de replicación viral del 50% y 70% a los 5 y 10 años desde el diagnóstico. Esta seroconversión, suele acompañarse de actividad citolítica e incremento de la actividad necrótico inflamatoria. Virologicamente, un porcentaje elevado de estos enfermos queda como portadores asintomáticos, con menor o mayor grado de lesiones. Esta seroconversión, en algunos casos, va seguida posteriormente de desaparición del HBsAg y aparición de anticuerpos contra el HBsAg (anti-HBs). En un porcentaje de casos éstos evolucionan negativizando el HBeAg y desarrollan anti-HBe pero mantienen un nivel replicativo viral fluctuante, citólisis y lesión histológicamente activa constituyendo el grupo siguiente (Desfilis M, 2006; Nuñez M et al, 2004) (Tabla 2).

I.6.2.2. Hepatitis crónica B HBeAg negativo.

Constituyen un grupo de enfermos que reúnen las características de toda hepatitis crónica B pero que no expresan en suero el HBeAg por haberse producido la infección por el VHB cuya mutación impide la síntesis del mismo. Las características clínicas de este grupo de enfermos son generalmente, sujetos de edades más avanzadas que el anterior grupo, con mayor actividad histológica. De hecho, más del 50% tienen cirrosis hepática en el momento del diagnóstico y los

niveles de replicación y de actividad citolítica son mucho más fluctuantes que en el grupo anterior. La evolución de ambos tipos de hepatitis crónica es hacia la cirrosis con una frecuencia anual entre el 2 y el 5,4% (Tabla 2).

I.6.3. Portador asintomático.

De acuerdo al criterio diagnóstico de la AASLD se caracterizan estos pacientes por presentar: a) HBsAg positivo más de 6 meses, b) HBeAg negativo y anti-HBe positivo, c) DNA-VHB $<10^5$ copias/ml, d) valores normales de transaminasas de forma persistente, y e) biopsia hepática con nula o mínima actividad necroinflamatoria (índice de Knodell <4); (criterio opcional). (Lok A et al, 2001)

Luego de la seroconversión espontánea del HBeAg, 67-80% de los portadores tendrán niveles normales de transaminasas y DNA viral no detectable en suero con mínima o ninguna necroinflamación hepática. Aproximadamente el 4-20% de los portadores asintomáticos tienen una o mas reactivación hacia el HBeAg. Aquellos que permanecen anti-HBe positivo, el 10-30% continúan presentando niveles aumentados de transaminasas y de DNA luego de la seroconversión de HBeAg y entre un 10-20% pueden presentar reactivaciones del VHB y exacerbación de la hepatitis. Por lo que se hace necesario determinar si un HBsAg+, HBeAg- es ciertamente un portador asintomático realizándole un seguimiento a lo largo de su vida para confirmar si su estado de portador se mantiene, una reactivación podría conllevar a una fase necroinflamatoria hepática (Lok A et al, 2007). (Tabla 2).

I.6.4. Cirrosis.

La morbilidad de los enfermos diagnosticados de cirrosis está condicionada por la aparición de hepatocarcinoma y las complicaciones de la cirrosis. El desarrollo de hepatocarcinoma está calculado en 2,2% anual, mucho más elevada que la calculada para los portadores asintomáticos (0,1% anual), y para los enfermos con hepatitis crónica sin cirrosis (1% anual). El riesgo de desarrollar esta

complicación es independiente de la existencia o no de replicación viral o situación del sistema antígeno-anticuerpo en el momento del diagnóstico. Frente a esto, se considera que incrementan el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma el sexo masculino, la edad avanzada, el consumo de alcohol y la sobreinfección por el VHC (Liaw Y et al, 2006; Williams R, 2006).

La aparición de complicaciones en la cirrosis es otro factor de riesgo y se ha calculado en un 3,3% anual, tanto la aparición de estas complicaciones como el hepatocarcinoma son determinantes de la mortalidad de la hepatitis crónica B (Chan H et al, 2006). Así, se ha calculado que la mortalidad de los enfermos con hepatitis crónica sin cirrosis está entre el 0 y el 1,06% anual. Esta mortalidad se incrementa al 3,5% anual cuando el enfermo desarrolla una cirrosis y aumenta considerablemente cuando se desarrolla alguna complicación, hasta determinar tasas de mortalidad entre el 30 y 45% al año. Se ha demostrado que son factores predictivos de mortalidad la persistencia de la replicación viral y citolítica, incrementando la presencia de estos dos factores hasta cuatro veces sobre los enfermos cirróticos con DNA-VHB negativo y transaminasas normales (Desfilis M, 2006).

I.6.5. Hepatocarcinoma celular.

Entre los factores de riesgo a evolucionar a un hepatocarcinoma celular (HCC) se encuentran el sexo, historia familiar, edad, historia de reversión anti-HBe hacia HBeAg, presencia de cirrosis, genotipo C del VHB, coinfecciones con VHC. Aunque la cirrosis es un fuerte factor de riesgo, 30-50% de los HCC ocurren en ausencia de cirrosis. Recientes estudios en portadores de Asia encontraron que la presencia de HBeAg y niveles incrementados de DNA fueron factores de riesgo independientes en el desarrollo de HCC (Lok A et al, 2007).

Dado que la mayoría de los portadores probablemente adquieren la infección en forma perinatal y su media de edad es alrededor de 40 años, estos datos indican que altos niveles de replicación viral persistentes por más de 4 décadas

están asociados con el riesgo a un HCC. Sin embargo, debido a las fluctuaciones naturales de la hepatitis crónica, asegurar que niveles aumentados de DNA en un determinado momento apunta a la predicción de un pronóstico en un portadores de forma individual puede ser limitada y el riesgo de HCC en un portador joven quien es HBeAg+ con DNA aumentado puede ser sustancialmente mas bajo (Lok A et al, 2001).

I.6.6. Infección oculta por el virus B.

Conceptualmente se trata de enfermos que muestran un perfil serológico de hepatitis B resuelta o con ausencia de marcadores de VHB, en los que se detecta la presencia de DNA-VHB integrado o libre en suero o hígado, o en ambos, aunque con más frecuencia en hígado sólo. Desde el punto de vista clínico, no existen pruebas de que esta infección oculta pueda tener un papel constante en el daño hepático y sólo explicaría casos aislados. Esta infección oculta explicaría la reaparición de actividad viral en situación de inmunodeficiencia o la posibilidad de transmitir la infección durante un trasplante de hígado. La explicación de la infección oculta por VHB sin expresar serológicamente el HBsAg puede deberse a dos mecanismos: uno es que ciertos reordenamientos del genoma del virus dan lugar a cambios en las proteínas S que las hace indetectables con las técnicas comerciales, y la segunda posibilidad, mucho más frecuente, es que sin existir cambios en el genoma hay una supresión de la replicación y de la expresión de éste que determina la ausencia de marcadores serológicos (Desfilis M, 2006; Torbenson M et al, 2002).

La importancia clínica de esta infección oculta no está totalmente aclarada y se ha implicado en cierto grado de lesión o mala respuesta a tratamiento antiviral de otras coinfecciones. Actualmente, desde el punto de vista práctico, la implicación es clara para contraindicar la donación de un hígado de un enfermo con hepatitis B resuelta a un receptor que no posee marcadores de VHB, ya que el riesgo de infección en el receptor es de casi el 100% (Raimondo G, 2007; El Zaatari M et al, 2007; Chun J et al, 2006; Sucupira, 2006).

I.6.7. Significado del termino portador crónico del VHB y hepatitis crónica por el VHB.

Es importante en aras de la claridad definir el significado científico de estos términos. En primer lugar el termino “infección crónica por el VHB” se establece sobre la base de pruebas microbiológicas y se aplica a todo paciente en el cual estas pruebas demuestren que el virus ha establecido una infección persistente, en otras palabras todo aquel paciente que presente una persistencia mayor a 6 meses del HBsAg, por lo que pasado ese tiempo estos pacientes sufren una “infección crónica por el VHB”, independientemente de cualquier otra consideración.

El termino “hepatitis crónica por el VHB” hace referencia al estudio anatomopatológico de la biopsia hepática y solo se debe aplicar cuando en dicho estudio se aprecien las lesiones características de la hepatitis crónica, previamente diagnosticado microbiológicamente.

Adicional a esto, se debe tomar en cuenta la expresión del genoma del VHB, de acuerdo a esta expresión, tendremos pacientes en los cuales puede detectarse tanto el HBsAg como el DNA viral en suero, esta situación suele asociarse a presencia de lesiones hepáticas, es decir a una “hepatitis crónica por el VHB”. Por otro lado tendremos pacientes en los cuales se detecta el HBsAg con negativización del ADN, esta situación rara vez se asocia a lesiones hepáticas y se clasificaría este paciente como “portador sano de HBsAg” aun cuando no se hayan realizado pruebas anatomopatológicas para descartar una hepatitis crónica. En todo caso estos “portadores sanos” albergan la infección viral persistente y sufren por lo tanto de una “infección crónica por el VHB”.

Para concluir, el termino “infección crónica por el VHB” debe aplicarse a todo paciente portador crónico del HBsAg, presente o no presente viremia o lesiones hepáticas. Pudiendo clasificarse a su vez estos pacientes en pacientes con “infección crónica productiva por el VHB” o “infección crónica no productiva por el

VHB”, en función de que presenten o no viremia. Y se reservara el término “hepatitis crónica por el VHB” a aquellos pacientes diagnosticados de infección crónica y que además presenten alteraciones histológicas en biopsia hepática. Todos estos pacientes serán, por consiguiente y sin distinción “portadores crónicos del VHB” (Echevarria JM, 2004).

Tabla 2. Términos clínicos empleados en la infección por el VHB.

Hepatitis aguda	Elevaciones transitoria de transaminasas (>10 veces el límite superior de la normalidad. HBsAg (+), anti-HBc(+), anti-HBc IgM (+)
Hepatitis crónica	Enfermedad necroinflamatoria causada por la infección persistente por el VHB que se subdivide en HBeAg (+) y HBeAg(-)
Portador asintomático	Infección persistente por el VHB. DNA. (+/-). sin enfermedad necroinflamatoria
Hepatitis B resuelta	Infección previa del VHB, sin evidencia virológica, bioquímica o histológica de infección activa o enfermedad hepática.
Reactivación aguda	Elevaciones transitoria de transaminasas (>10 veces el límite superior de la normalidad y >2 veces el valor basal
Reactivación crónica	Reaparición de actividad necroinflamatoria hepática en un portador asintomático o que tenía una hepatitis B resuelta
Aclaramiento del HBeAg	Desaparición del HBeAg en una persona previamente positiva para el HBeAg
Seroconversión de HBeAg	Negativización del HBeAg y detección de anti-HBe en un individuo previamente positivo para HBeAg y asociado a DNA-VHB <10 ⁵ copias/ml
Reversión del HBeAg	Reaparición del HBeAg en una persona previamente HBeAg negativa y anti-HBe positiva

Fuente: La ASSLD (Lok A *et al*, 2007)

I.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO, EVOLUCION Y SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS B

El diagnóstico inicial de la hepatitis se puede establecer por síntomas clínicos y el incremento en los niveles séricos de enzimas hepáticas en sangre. Las infecciones agudas y crónicas se pueden diferenciar por la presencia de HBsAg y HBeAg en el suero, y el patrón de anticuerpos frente a los antígenos individuales del virus. Los antígenos HBsAg, HBcAg y HBeAg son secretados hacia la sangre durante la replicación vírica. Aunque el core y el antígeno “e” del VHB comparten secuencias proteínicas, las diferencias en el procesamiento, la secreción y la estructura terciaria los convierten en útiles como marcadores serológicos. No existen pruebas disponibles con facilidad para el HBcAg pero el HBsAg y HBeAg se pueden detectar con técnicas de laboratorio clínico. La presencia de HBeAg es

el dato que guarda mejor relación con la presencia del virus infeccioso (**Beker B et al, 1997**).

La infección crónica se puede distinguir por presencia continuada de HBsAg y/o HBeAg y falta de anticuerpos detectables frente a esos antígenos. Durante la fase de infección sintomática está oscurecida la detección de anticuerpos anti-HBe y anti-HBs, puesto que los anticuerpos forman complejos con los antígenos en el suero. La presencia de infección aguda reciente, sobretodo durante el período en el que no se detectan HBsAg ni anti-HBs (ventana), se establece mejor por la medición de anti-HBc IgM (**Morales N, 2007**) (Tabla 3).

I.7.1. Pruebas funcionales hepáticas

Una de las enzimas hepáticas más importantes es la alanina aminotransferasa (ALT), que en algunos informes de laboratorio se denomina SGPT. Un nivel elevado de ALT significa que el hígado no funciona adecuadamente y que existe el riesgo de lesión hepática irreparable. Durante la infección aguda, los niveles de ALT pueden estar elevados transitoriamente, pero esto no suele provocar problemas hepáticos a largo plazo. En la Hepatitis B crónica, los niveles de ALT pueden estar elevados periódica o continuamente, lo que implica un mayor riesgo de lesión hepática a largo plazo (**Delgado A et al, 2006**).

I.7.2. Marcadores Serológicos.

I.7.2.1. Detección del antígeno de superficie del VHB

Se detecta en suero a partir de la cuarta semana de infección mediante técnicas de enzimoimmuno-análisis (ELISA), con un límite de detección de 0,12 ng/ml. Con un método de estas características, la posibilidad de falsos negativos no supera el 1%. La detección de este marcador serológico se relaciona invariablemente con una infección por el VHB. La posibilidad de que exista infección siendo este marcador serológico negativo sólo se puede dar en tres circunstancias excepcionales. La primera, durante el primer mes del periodo de

incubación de la infección. La segunda, en la fase de resolución de la infección cuando se ha negativizado el antígeno sin llegar a desarrollarse anti-HBs todavía (Tabla 3). Por último, en el caso de mutación del VHB que determina una incapacidad de éste para sintetizar el HBsAg. No obstante, estas circunstancias son excepcionales en la práctica habitual y la negatividad de este antígeno se considera sinónimo de ausencia de infección por el VHB (Echevarria JM, 2006; Desfilis M, 2006).

I.7.2.2. Detección del antígeno del core

Es una proteína sintetizada por el propio virus y, aunque su detección en el núcleo celular en la biopsia hepática, con técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa, es signo evidente de replicación viral, el desarrollo de las técnicas de detección del DNA le ha hecho perder utilidad. La detección en suero es posible, previo tratamiento del mismo, pero carece de utilidad clínica (Delgado A et al, 2006; Beker B et al, 1997).

I.7.2.3. Detección del antígeno “e”

Es una proteína que se produce por escisión de la proteína *precore* y *core*, de tal forma que su tamaño se transforma de 25 kDa en 17 kDa. Se detecta en suero con técnicas de ELISA y su positividad va unida, casi invariablemente, a la replicación viral (Tabla 3). Sin embargo, la negatividad de este marcador no implica la ausencia de ésta, ya que en los enfermos infectados por virus mutantes que no sintetizan el HBeAg, no lo presentan en suero a pesar de la existencia de replicación viral. (Delgado A et al, 2006).

I.7.2.4. Detección de otros antígenos del virus B.

Se pueden detectar, con técnicas de ELISA, otros antígenos como los pre-S1, pre-S2 y el HBxAg, de escaso interés para la aplicación clínica.

I.7.2.5. Anticuerpos frente al antígeno de superficie del virus B

Estos anticuerpos se detectan en la actualidad por técnicas de ELISA, considerándose nivel de protección específico cifras superiores a 10 UI. La detección de este anticuerpo supone un estado inmunitario frente al HBsAg, por lo que se detecta tras una infección pasada frente al VHB apareciendo entonces unido al anticuerpo contra el core del virus hepatitis B (anti-HBc). En los sujetos con inmunidad activa a través de la vacunación este marcador es el único positivo (Tabla 3). Estos anticuerpos aparecen tras la desaparición del HBsAg y nunca antes de los cuatro meses de la infección por el virus. Excepcionalmente, puede detectarse en un enfermo la presencia simultánea de HBsAg, anti-HBc y anti-HBs. Esta circunstancia se explica cuando una persona con inmunidad frente al virus B se infecta por la cepa mutante del virus descrita por Carman C (1990) (Delgado A et al, 2006; Beker B et al, 1997.).

Tras aparecer en suero el anti-HBs, éste puede permanecer de por vida como señal de infección pasada, pero en algunas personas puede perderse y detectarse únicamente el anti-HBc. Esta eventualidad ha sido puesta de manifiesto en los casos de infección por el VHB en enfermos transplantados con donante que expresaban en suero el anti-HBc acompañado o no de anti-HBs, ya que el riesgo de ser infectados es casi del 100%, esto se produce por dos circunstancias, una es el trasplante de un hígado con restos ocultos de infección por el VHB que no se expresa serológicamente y la otra por el estado de inmunosupresión que conlleva el trasplante.

I.7.2.6. Detección de anticuerpos frente al antígeno del core del virus B

La respuesta humoral a la presencia en suero del HBcAg es la producción de anticuerpos frente a él. Aparece casi simultáneamente a la detección del HBsAg y permanece después de la resolución de la infección como prueba de haber estado en contacto con el VHB (Tabla 3). Las personas vacunadas frente al VHB no presentan este anticuerpo, ya que la vacuna sólo contiene el HBsAg. Su método

de detección habitual es el ELISA, que tiene una especificidad muy alta, detectándose sólo del 1 al 3% de falsos positivos (Delgado A et al, 2006).

En la clínica habitual la detección de anti-HBc como único marcador de infección por el VHB no es excepcional y su significado puede ser triple. La primera posibilidad es que se trate de un falso positivo, dada la gran sensibilidad de la técnica, y en estos casos no se detecta el DNA del virus, siendo la respuesta a la vacunación frente al VHB completamente normal. La segunda posibilidad es que se trate de una infección oculta por el VHB que sólo se exprese por este marcador: esta posibilidad, dada la alta sensibilidad de las técnicas de detección de HBsAg, es muy rara, detectándose en estos casos el DNA vírico y la respuesta a la vacunación es nula. Puede ser el único marcador que se detecte durante la **fase de ventana, en cuyo caso estas personas deben ser reactivas para el anticuerpo de tipo Ig-M del virus de hepatitis B (HBc-IgM)**. La última posibilidad, con mucho la más frecuente, es que se trate de una infección pasada y que no se detecten, por haberse perdido los estímulos antigénicos, la presencia de anti-HBs, en este caso no se detecta tampoco el DNA y la respuesta a la vacuna es anamnésica.

I.7.2.7. Detección anticuerpos frente al antígeno del core de tipo IgM

Realizado con técnicas de ELISA, se le aplica un punto discriminante que proporciona una sensibilidad de detección de hepatitis aguda por el VHB de casi el 100%, de tal forma que su negatividad descarta una infección aguda, es decir de menos de seis meses de evolución. Su especificidad no es del 100%, ya que puede ser positivo en caso de infección crónica por el VHB (evolución superior a seis meses) con replicación viral elevada (Tabla 3). De cualquier forma en la práctica clínica habitual constituye un marcador específico de hepatitis aguda por VHB (Delgado A et al, 2006).

I.7.2.8. Detección de anticuerpos frente al antígeno “e”

Se detecta con técnicas de ELISA y con sensibilidades muy altas. Su presencia en general es indicativa de baja o nula replicación y, consecuentemente, poca infectividad. Este marcador puede ser positivo, con replicación viral elevada, cuando el enfermo está infectado por una cepa del VHB mutante que no expresa el HBeAg. Su utilidad actual en el diagnóstico y toma de decisiones terapéuticas es muy baja salvo para identificar la infección por una cepa salvaje, que expresa el HBeAg, o por una cepa mutante, que no lo expresa (Delgado A et al, 2006) (Tabla 3).

Tabla 3. Serología diagnóstica en la infección por VHB

Estado de la infección	HBsAg	Anti-HBsAg	IgG-HBc	Anti-HBc- IgM	HBeAg	Anti-HBe	DNA del VHB
Inmunización Natural	-	+	+	-	-	-	-
Vacunado	-	+	-	-	-	-	-
Infección aguda temprana	+	-	+	+	+	-	+
Infección aguda en resolución	+	-	+	+	-	+	-
Infección crónica con baja infectividad	+	-	+	-	-	+	-
Infección crónica con infectividad alta	+	-	+	-	+	-	+

Fuente: Delgado A et al, 2006

I.7.2.9. Otros anticuerpos frente al VHB (anti-HBx, anti- PreS1 y anti- PreS2).

Como respuesta humoral es posible detectar anticuerpos frente a los antígenos x y pre-S1 y pre-S2, pero sin ninguna utilidad en la clínica habitual para el diagnóstico, pronóstico y terapéutica.

I.7.3. Análisis de la alfa-fetoproteína

Esta prueba verifica si hay niveles altos de AFP, una proteína que generan las células hepáticas cancerosas. Debido a que las personas con hepatitis B crónica corren mayor riesgo de desarrollar cáncer de hígado, los proveedores de

atención médica suelen indicar esta prueba cada 6 a 12 meses (Delgado A et al, 2006).

I.7.4. Tecnología de biología molecular.

I.7.4.1 DNA del VHB (DNA-VHB).

Su positividad en suero indica replicación viral y se detecta con técnicas de hibridación, *branched* DNA y PCR. El límite de detección con la técnica comercial más sensible que existe es de 10^2 a 10^3 copias/ml sin diferencias entre los distintos genotipos. En la práctica clínica se considera como replicación viral positiva, según la AASL, la presencia de valores superiores a 10^4 copias/ml (Lok A et al, 2007).

Las indicaciones actuales para solicitar la determinación de DNA del VHB son las siguientes

- Valoración inicial de una infección crónica por el VHB, ya que la replicación es un factor de progresión de la enfermedad y de su actividad.
- Decisión de tratamiento de una hepatitis crónica por VHB, ya que sólo deben tratarse los enfermos con replicación viral positiva.
- Monitorizar el tratamiento con antivirales o interferón en las hepatitis crónicas por VHB.

I.7.5. OTROS ESTUDIOS.

I.7.5.1 Carga viral del VHB.

Al igual que la técnica usada para medir la cantidad de VIH en la sangre, la carga viral puede determinar si el VHB se está multiplicando en el hígado. En una persona que tenga el antígeno HBeAg detectable (carga viral >100.000) o una mutante precore, (carga viral >10.000), indicaría que el virus está activo y que tiene muchas posibilidades de causar daño en el hígado. Siempre y cuando la carga viral del VHB se conserve por debajo de los valores mencionados y los

análisis de las enzimas del hígado sean normales, podría ser que el tratamiento y la biopsia hepática no fueran necesarios (Delgado A et al, 2006).

I.7.5.2 Ecografía.

Muchos expertos en enfermedades hepáticas recomiendan este tipo de examen a fin de detectar cáncer en personas que tienen infección crónica por el virus B, ya que este procedimiento resulta más confiable que el análisis de la AFP para detectar tumores. (Delgado A et al, 2006).

I.7.5.3 Biopsia hepática.

Se utiliza para determinar el grado de lesión hepática en caso de existir ya que tanto la carga viral del VHB como los niveles de las enzimas hepáticas y de la AFP en la sangre no permiten determinar si existe lesión hepática y cuán grave es. Este tipo de examen se recomienda en aquellos pacientes que tienen una carga viral del VHB alta (más de 100.000 o superior a 10.000 para pacientes con la mutante precore del VHB) y un nivel elevado de enzimas hepáticas (Delgado A et al, 2006).

I.8. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS B.

La infección por el VHB es un alarmante problema de salud pública en muchas partes del mundo. Aproximadamente 2000 millones de personas viven en zonas donde la prevalencia de hepatitis crónica es mayor de 2% y donde la enfermedad afecta cerca de 350 millones de individuos (Lai C et al, 2003). De estas personas, cerca del 25-40% morirán de cirrosis hepática ó de carcinoma hepatocelular primario (Lok A et al, 2007; Bourliere M, 2003).

Los portadores crónicos HBsAg constituyen el reservorio de principal de la infección; en algunos países tropicales de 5-15% de todas las personas son portadoras crónicas, aunque la mayoría de ellos asintomáticos. En Estados Unidos la presencia del HBsAg elevada en ciertos grupos, como los hombres

homosexuales, los enfermos sometidos a hemodiálisis o a tratamientos inmunosupresores, los enfermos con síndrome de Down y los adictos a drogas, que utilizan métodos de inyección. La determinación rutinaria de HBsAg en los donantes de sangre y la eliminación de los bancos de sangre comerciales ha reducido notablemente la incidencia de hepatitis B postransfusional. Las tasas de incidencia son también elevadas entre los esposos y compañeros sexuales (semen) de los pacientes afectados **(Morales N, 2007)**.

Se ha establecido que el virus B causa el 80% de los casos de cáncer primario del hígado por lo que esta enfermedad se considera una de las mayores causas de mortalidad en humanos, es una de las tres primeras causas de muerte por cáncer en el hombre del este y sudeste asiático, la cuenca del Pacífico y África sub-Sahara, donde la infección por el VHB es mayor del 45% **(Hasegawa I et al, 2006; Ugwu B et al, 2006; Msuya S et al, 2006)**.

Su asociación con el Carcinoma Hepatocelular Primario (CHP) produce entre 25,000 y un millón de muertes anuales en todo el mundo. En Estados Unidos se atribuyen unos 5,000 fallecimientos anuales al CHP. El período de latencia entre la infección por VHB y el desarrollo del CHP puede ser tan corto como 9 años o tan largo como 35 años **(Morales N, 2007)**.

En Europa y Estados Unidos la incidencia de la infección por el VHB es baja, la transmisión usualmente ocurre en la edad adulta. Sin embargo, en áreas donde la infección por el virus B es endémica, la infección ocurre a edad temprana o en el periodo perinatal. Taiwán es una de las áreas hiperendémica para la infección por el VHB, aproximadamente 15 a 20% de la población general es portadora del HBsAg **(NI YH et al, 2001)**.

I.8.1. Prevalencia del Virus B.

Aproximadamente el 45% de los infectados por VHB viven en áreas de alta endemicidad, que incluyen el África subsahariana, Asia y el Pacífico con una prevalencia del 10-20% (Liang X et al, 2005; Huang Z et al, 2005; Lavanchy D, 2004; Lai C et al, 2003). En estas áreas los individuos son infectados en su mayoría a edades tempranas de la vida, en las que hasta un 90% evolucionan hacia la cronicidad. Otras regiones no endémicas pero con prevalencia alta incluyen el sur y el este de Europa, la cuenca del Amazonas, Oriente Medio y el subcontinente indio. En Estados Unidos, países de Europa occidental y del norte y en Australia la infección es poco frecuente (0,2-0,5%) y es adquirida sobre todo en la edad adulta (Wright T, 2006).

En Latinoamérica la data de la frecuencia de la infección por el VHB varía de una región a otra. La mayoría de los países presentan una baja prevalencia (<2%), otros tienen una prevalencia intermedia (2-7%), sin embargo existen regiones con una alta prevalencia como es la zona del Amazona (parte del norte de Brasil, Colombia, Perú y Venezuela). En base a la presencia de anti-HBc total la prevalencia en la población general del VHB en República Dominicana es de 21.4%, seguida de Brasil con 7.9%, Venezuela (3.2%), Argentina (2.1%), México (1.4%) y Chile con 0.6% (Dehesa V et al, 2007). Sin embargo, ciertas regiones de estos países indican una prevalencia del VHB del 19.8 -66.1% en Brasil (Motta A et al, 2003, 2005; de Paula V et al, 2001), Bolivia con un 74% (León P et al, 1999). Por alguna razón, hasta ahora no conocida las comunidades indígenas de Suramérica son altamente endémicas para el VHB (Cardona et al, 2004; Echevarria JM et al, 1996; Blitz L et al, 1996; Torres JR et al, 1991) peculiaridades importantes como aislamiento geográfico, social o cultural podrían estar implicados en tal situación (Echevarria JM et al, 2003).

La alta prevalencia del VHB en algunos lugares del mundo está determinada por múltiples factores como; calidad deficiente en los servicios de atención

médica, índices de prostitución entre la población, drogadicción, educación sexual deficiente y el uso de tatuajes. Solo el suero, el semen y la saliva se han demostrado como potenciales vehículos conteniendo partículas infectantes del virus B de la hepatitis (Parana R et al, 2005; Custer B et al, 2004).

I.8.2. Prevalencia del Virus B en Venezuela.

Venezuela presenta un nivel de prevalencia intermedia (3.2%) (Tanaka Y, 2000; Silveira T, 1999), con tres focos de alta endemicidad; Amerindios del Sur en el Estado Amazona, amerindios del Oeste en la Sierra de Perijá del Estado Zulia y en el Estado Barinas (Echevarria JM, 1996; Vetencourt R et al, 1997; Blitz L et al, 1996).

Las poblaciones amerindias constituyen los primeros pobladores en Venezuela y han estado aislados de los sistemas urbanos, de las masas migratorias a lo largo de los años y de los sistemas asistenciales de salud en su gran mayoría. Por lo tanto, la diversidad de los virus y agentes infecciosos que los afectan son en mayoría el reflejo de las cepas autóctonas originadas en Sur América o introducidas durante los movimientos migratorios en la prehistoria que dieron origen a los primeros pobladores humanos en Sur América. Existe un cierto consenso que apunta a sugerir que el Hombre Amerindio proviene de una migración humana hace unos 20.000 años, desde el Sur Este de Siberia y Mongolia, aunque el número de olas migratorias que originaron la población Americana Precolombina es todavía controversial (Gibbons A, 1996; Salzano F et al, 1988).

Se estima que por lo menos el 40% de las hepatitis aguda B en Latinoamérica incluyendo a Venezuela, se adquiere por transmisión sexual. En todo caso, entre menos de un 6% a un 10% de los pacientes adultos que sufren hepatitis aguda B puede evolucionar hacia el estado de portador crónico. Cuando la infección es adquirida por vía perinatal el 90% de los neonatos nacidos de madres infectadas con el VHB pueden progresar hacia hepatitis crónica por lo que la prevención

mediante inmunización pasiva y activa aplicada al niño en las primeras 12 horas del nacimiento es obligatoria. (Machado I, 2006).

I.8.3. Prevalencia del Virus B en España.

En España, el número de portadores oscila entre el 1 y el 2% de la población, con tendencia a disminuir por la política de vacunación general de la población. La capacidad infectante de un portador es tanto mayor cuanto mayor es la replicación viral (Moreno D et al, 2004; Rodríguez C et al, 2003; Sallera L et al, 1992).

La epidemiología de la hepatitis B en este país ha experimentado cambios en los últimos años (Echevarria JM et al, 2004; Domínguez A et al, 2000). A esto ha contribuido la determinación de los genotipos del VHB, cuya distribución está sufriendo algunas modificaciones, como la aparición de genotipos poco prevalentes o inexistentes (Echevarria JM, 2004). La transmisión del virus por transfusiones sanguíneas prácticamente ha sido eliminada con el cribado de los donantes de sangre mediante el examen del HBsAg (Álvarez M et al, 2002). Los grupos de población más expuestos a contraer en la actualidad una hepatitis B por vía parenteral siguen siendo los que consumen drogas por vía intravenosa, los profesionales sanitarios que sufren pinchazos o cortes con agujas y bisturís contaminados con sangre de pacientes y los pacientes en hemodiálisis (Bruguera M et al, 2004).

Los recién nacidos de mujeres con una infección por VHB están expuestos a infectarse en el momento del parto. Este riesgo es superior al 90% cuando la madre está en período de replicación viral alta. El examen sistemático del HBsAg de las gestantes y la aplicación el primer día de vida de medidas de inmunización pasivo-activa en los recién nacidos de mujeres infectadas, es decir, la administración de gammaglobulina rica en anti-HBs y de la primera dosis de vacuna de la hepatitis, evita considerablemente la transmisión del virus de la madre al hijo (Bruguera M et al, 2004).

La vacunación universal frente a la hepatitis B, introducida en algunos países entre los que se cuenta España, a principios de la década de 1990 (**Kane M, 1998; Salleras L et al, 1992**), es con toda seguridad el factor más destacado en la reducción de la incidencia de esta infección, sobre todo en el grupo de población más joven (**Salleras L et al, 2003, 2005**).

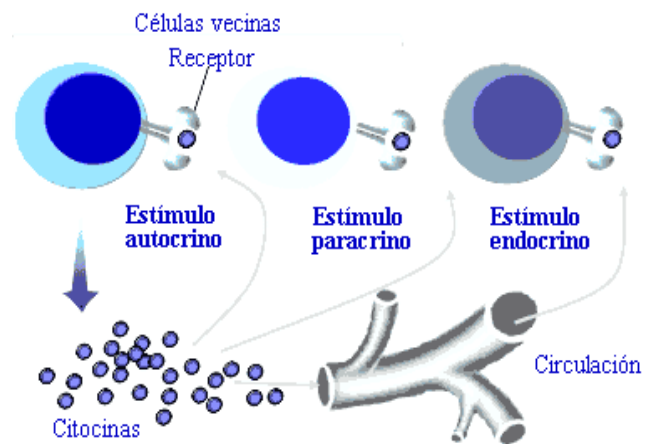
I.9. CITOQUINAS.

I.9.1. Concepto.

Son moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos. Aunque en general son producidas por leucocitos, determinadas citoquinas pueden también ser secretadas por otros tipos celulares. Originariamente se estableció el término linfocina para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno. Posteriormente su uso se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se utilizó el término más amplio de citoquina. El término interleucina (IL) se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose correlativamente a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, etc.). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales in vitro y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor transformador de tejidos (TGF) (Aguzzi A et al, 2005; Gosain A et al, 2005; Stephen G, 2002).

La expresión de la mayoría de las citoquinas está estrictamente regulada. En general, no se detecta una producción constitutiva significativa de estas moléculas, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan citoquinas en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. La mayoría de las citoquinas son secretadas al espacio extracelular, muchas de ellas en forma glicosilada que incrementa su estabilidad y solubilidad. No obstante, algunas citoquinas se pueden acumular en el interior de la célula, o, bien, permanecer ancladas a la membrana o en la matriz extracelular. En general, son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otros muy variados tipos celulares.

Las citoquinas ejercen un efecto autocrino cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora. También pueden tener un efecto paracrino, actuando sobre diferentes tipos celulares que se encuentran en su vecindad. En algunos casos pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas, de forma endocrina (Aguzzi et al., 2005) (Figura 5).



Efecto autocrino, paracrino y endocrino de las citoquinas.

Figura 5. Efecto de citoquinas.
Fuente: (Aguzzi A et al, 2005)

Dos importantes características funcionales de las citoquinas son su pleiotropismo, de tal manera que una misma citoquina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, y su redundancia, es decir, que varias citoquinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular. Una consecuencia de estas propiedades es que, en ausencia de una determinada citoquina, sus funciones pueden ser reemplazadas total o parcialmente por otras. Muchas de estas características biológicas de las citoquinas se pueden explicar por la estructura y amplia distribución celular de sus receptores. Así, la secreción de una citoquina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citoquina que, a su vez, puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores (Hunter C, 2005).

I.9.2. Citoquinas producidas en la respuesta inmune innata.

Estas citoquinas se producen de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en las respuestas inmunes innatas con un agente extraño. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas aunque también pueden ser producidas por linfocitos activados y otras células no

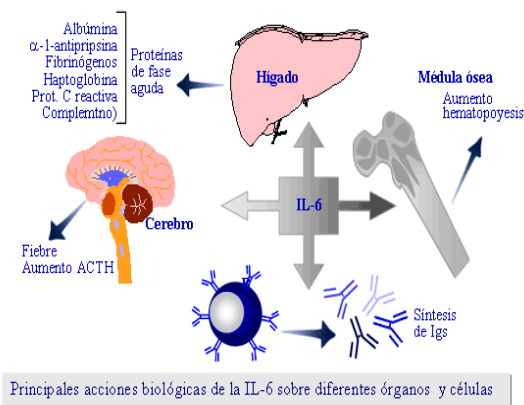
pertenecientes al sistema inmune, como células endoteliales y fibroblastos (Tabla 4)

I.9.2.1. Interleucina 1 (IL-1).

Es producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas, endoteliales, células NK y otros tipos celulares (tabla 4). Induce la liberación de histamina en los mastocitos, generando vaso dilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. Es el principal pirógeno endógeno, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandinas. Promueve la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y actúa sobre el sistema nervioso central induciendo sueño y anorexia, típicamente asociados con los procesos infecciosos (Joost J et al, 2000; Abbas A et al, 2000).

I.9.2.2. Interleucina 6 (IL-6).

Es una citoquina de aproximadamente 26kD que es sintetizada fundamentalmente por monocitos/macrófagos, fibroblastos,



por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno (Streez K et al, 2001). Además de su efecto en la inflamación (Hernández U et al, 2001; Durum S et al, 1993).

Figura 6. Efectos biológicos de IL-6.

Fuente: www.duke.edu

Se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. Aumenta la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos

dependientes de la IL-3. Sirve como co-estimulador de las células T y de los timocitos (Joost J et al, 2000; Abbas A et al, 2000) (Figura 6).

I.9.2.3. TNF.

Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores. Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF- α y el TNF- β , con elevada homología en su secuencia aminoacídica. El TNF- α es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el Lipopolisacárido, siendo esta citoquina el principal responsable del shock séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producido por linfocitos T y B, células NK, fibroblastos y mastocitos. Junto con la IL-1 está implicado en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos. Inducen la producción de factores de crecimiento endotelial y tienen actividad angiogénica. Por otra parte, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos. (Joost J et al, 2000 ; Abbas A et al, 2000).

I.9.2.4. Interleucina 10 (IL-10).

La IL-10 es un miembro de la familia de citoquinas de cuatro hélices α y probablemente actúa como un homodímero. Es producida por linfocitos del tipo Th2, células T CD8, así como también por monocitos/macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares (Hernández U et al, 2001; (Moore et al, 1993).

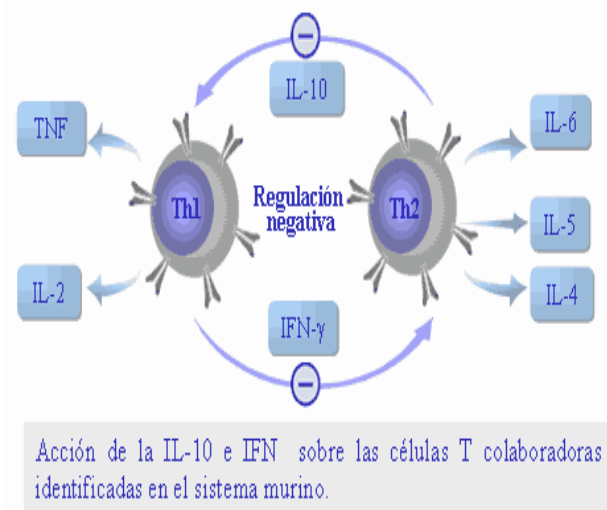


Figura. 7. Efectos biológicos de IL-10.
Fuente: www.duke.edu

Es la citoquina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de otras citoquinas, entre las que podemos citar IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, y la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase-II (MHC-II) y moléculas de adhesión en monocitos (**Figura 7**). Desactiva además macrófagos al suprimir su producción de oxígeno reactivo, óxido nítrico y proteínas de adhesión.

La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras. Se ha visto que es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas in vitro. Regula las funciones mediadas por linfocitos B induciendo la síntesis de IgG, influye en el desarrollo de timocitos y células T y ejerce además efectos reguladores sobre la angiogénesis (**Joost J et al, 2000; Abbas A et al, 2000**).

I.9.2.5. Interleucina 12 (IL-12).

Es producida mayoritariamente por monocitos/macrófagos, pudiendo también ser inducida por células dendríticas y linfocitos B. La actual importancia de esta citoquina deriva de su capacidad de dirigir la diferenciación de los linfocitos Th hacia células efectoras tipo Th1. La forma madura de esta molécula (p75) está compuesta de dos subunidades, p35 y p40. La síntesis de ambas subunidades está regulada diferencialmente, siendo ambas necesarias para la actividad funcional del heterodímero. Incrementa la actividad citotóxica de las células NK e induce células LAK (linfocitos asesinos activados por linfocinas) por linfocitos T y células NK y activa e incrementa la producción de IFN- γ y linfocitos T citotóxicos (**Abbas A et al, 2000; Trinchieri G et al, 1997**).

I.9.2.6. Interleucina 18 (IL-18).

Esta citoquina está estrechamente relacionada en sus funciones biológicas con la IL-12, ya que posee la misma capacidad de inducción de IFN- γ en linfocitos T y células NK. La IL-18 es producida por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo los monocitos-macrófagos y linfocitos T, siendo las células adrenales y

de Kupffer las principales fuentes de producción de la IL-18 (Abbas A et al, 2000). Es una citoquina pleitrópica que actúa en procesos tanto relacionados con la inmunidad innata como la adquirida. (Puren A et al, 1998).

I.9.2.7. Interferones tipo I.

Los interferones fueron inicialmente descritos como agentes producidos por células infectadas por virus. Se clasificaron en dos grupos. Los interferones tipo I, que incluyen el IFN- α y el IFN- β , con capacidad principalmente antiviral y antiproliferativa, y el IFN- γ (tipo II), con un mayor efecto inmunomodulador. El IFN- γ es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos, mientras que el IFN- α es secretado por fibroblastos y algunas células epiteliales. Ambos incrementan la expresión de moléculas de MHC de clase I. (Smith P et al, 2005).

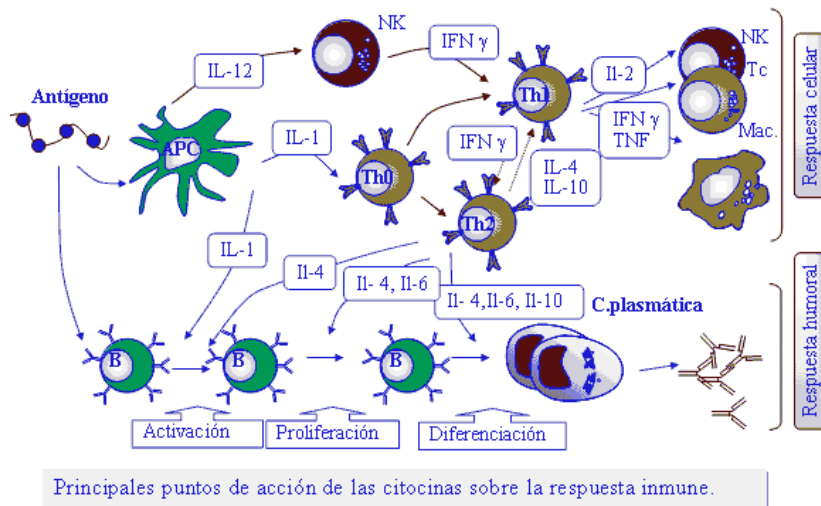
TABLA 4. Citoquinas producidas durante la respuesta inmune innata

Citoquina	Efectos biológicos principales	Célula productora principal
IL-1 α , IL-1 β	Proinflamatorias. Inducen la síntesis de proteínas de fase aguda. Pirógenos	Monocitos, macrófagos
IL-6	Proinflamatoria. Induce la síntesis de proteínas de fase aguda. Regula la hematopoyesis. Estimula la secreción Igs	Monocitos, macrófagos
TNF- α	Proinflamatoria. Responsable del shock endotóxico. Pirógeno. Induce expresión de moléculas de adhesión	Monocitos, macrófagos, LT
IL-10 IL-19 IL-20 IL-22	Inmunosupresoras. Inhiben la expresión de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. Estimulan B e inducen síntesis de IgG	Monocitos, macrófagos, LT, LB
IL-12	Inductor de la diferenciación Th1. Estimula la actividad citotóxica de T y NK	Monocitos, macrófagos
IL-18	Estimula la actividad citotóxica de T y NK	Células adrenales y células de Kupffer
IL-23	Estimula la actividad citotóxica de T y células NK	Células dendríticas activadas
IFN- γ IFN- β	Efecto antiproliferativo e inmunomodulador. Actividad antitumoral	Monocitos, macrófagos Fibroblastos y células epiteliales

Fuente: citocinas y quimiocinas en: www.uco.es

I.9.3. Citoquinas producidas en la respuesta inmune adaptativa.

Los linfocitos T CD4+, como consecuencia de una estimulación antigénica, pueden diferenciarse hacia linfocitos T cooperadores de tipo Th1 o Th2, esta diferenciación estará condicionada por las citoquinas que se encuentran en el medio. Así, la presencia de IL-12 promueve la diferenciación hacia Th1, mientras que la IL-4 condiciona el desarrollo Th2. Los linfocitos Th1, en colaboración con



los macrófagos, están implicados en la respuesta inmune celular, mientras que los Th2 promueven la respuesta inmune humoral. Para llevar a cabo su función los linfocitos Th1 secretan IL-2, IFN- γ

Figura. 8. Acción de las citoquinas durante la respuesta inmunitaria.

y TNF, mientras que los Th2 producen IL4, IL-5, IL-10 e IL-13. Se han descrito otras subpoblaciones de linfocitos T CD4+ efectoras que secretan un perfil de citoquinas diferente y llevan a cabo funciones específicas (Stites D et al, 1999). (Figura 8)

Los linfocitos T CD8+ por su parte se diferencian hacia linfocitos T citotóxicos como respuesta a la estimulación antigénica y a la presencia de citoquinas secretadas por otras células. Ejercen su función efectora mediante la secreción fundamentalmente de IL-2, IL-16, IFN- γ y TNF. Finalmente hay una serie de citoquinas que pueden ser producidas por ambos tipos de linfocitos T, CD4+ y CD8+, tales como IL-2, Factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) y Factor transformante de tejidos beta (TGF-beta) (Tabla 5).

I.9.3.1. Interleucina 2 (IL-2).

La IL-2 secretada es una glucoproteína de entre 14 y 17 kD codificada por un único gen en el cromosoma 4 de los seres humanos, en su forma natural esta plegada formando una proteína globular que consta de un par emparejado de hélices α . Responsable principalmente de la progresión de los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados en respuesta a un estímulo antigénico. Tiene un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares. Es un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T, B y NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK, así como el desarrollo de células LAK. Tras unirse a su receptor en linfocitos T, activa la secreción de IFN- α , linfoxina, IL-4, IL-3, IL-5 y GM-CSF. Sobre los linfocitos B estimula su crecimiento y diferenciación e incrementa la expresión de moléculas de MHC de clase II (Aguzzi A et al, 2005). Es el principal factor autocrino para los linfocitos T, la cantidad de IL-2 sintetizada por las células T CD4+ activadas es un determinante importante en la intensidad de la respuesta inmunitaria mediada por células T. Estimula la síntesis de otras citoquinas como el IFN- γ y la linfoxina (Abbas A et al, 2000; Sugamura K et al, 1996).

TABLA 5. Citoquinas producidas durante la respuesta inmune adaptativa

Citoquina	Efectos biológicos principales	Célula productora principal
IL-2	Induce proliferación de T, B y NK. Citotóxica e inflamatoria	LT activados, LTh1, LT citotóxicos
IFN- γ	Incrementa la expresión de MHC-I y II. Activa macrófagos y NK. Inhibe la proliferación de células Th2.	LTh1, LT citotóxicos, NK
TNF- α	Proinflamatoria. Pirógeno. Induce expresión de moléculas de adhesión	LTh1, LT citotóxicos
IL-4	Inductor de la diferenciación Th2. Inhibe citoquinas y mediadores proinflamatorios e induce IL-1Ra. Estimula crecimiento y diferenciación de linfocitos B. Induce IgE e IgG4.	LTh2, mastocitos, basófilos.

IL-5	Diferenciación, proliferación y activación de eosinófilos	LTh2
IL-10	Inhibe la expresión de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. Estimula B e induce la síntesis de IgG	LTh2, monocitos, macrófagos, LB
IL-13	Inhibe la expresión de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios. Estimula crecimiento y diferenciación de B y promueve el cambio de isotipo hacia IgE.	LTh2
IL-16	Quimiotáctico de T	LT citotóxicos
TGF-B	Inmunosupresora. Inhibe el crecimiento de muchos tipos celulares, la síntesis de varias citoquinas y la citotoxicidad natural	LT activados
GM-CSF	Desarrollo y diferenciación de granulocitos y macrófagos	LT activados

Fuente: citocinas y quimiocinas en: www.uco.es

I.9.3.2. Interferón (IFN).

Es producido por linfocitos Th1, linfocitos T citotóxicos y por células NK. Además de su efecto antiviral posee una importante actividad inmunomoduladora. Incrementa la expresión de antígenos de MCH de clase I y II en varios tipos celulares, lo que facilita su función presentadora de antígeno y activa a los macrófagos, incrementando su capacidad tumoricida y de defensa contra las infecciones (Figura 9).

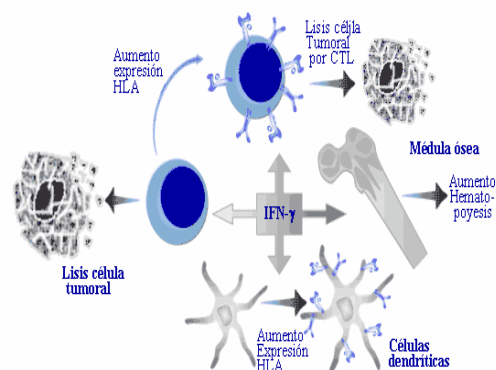


Fig. 9. Acciones de IFN- γ sobre médula ósea y células.
Fuente: Aguzzi A et al, 2005.

Actúa de forma autocrina sobre las propias células NK que lo producen, aumentando su actividad citolítica y, como consecuencia, incrementando su efecto antitumoral. Sobre los linfocitos Th2 inhibe la proliferación, de manera que su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T hacia células efectoras tipo Th1 favoreciendo, por lo tanto, el desarrollo de las respuestas inflamatorias (Smith P et al, 2005).

I.9.4. Receptores de las citoquinas.

Los receptores de citoquinas son proteínas de membrana glicosiladas que constan de una región extracitoplasmática de unión con la citoquina, una región transmembranal y una región citoplasmática que interviene en la transmisión de señales al interior de la célula.

Los receptores funcionales son de alta afinidad (10^{-9} - 10^{-11} M), es decir, únicamente son necesarias bajas concentraciones de citoquinas para la unión efectiva con su receptor y para desencadenar su correspondiente efecto biológico. La distribución de algunos de ellos, como por ejemplo los de la IL-2 y de la IL-5, está restringida a unos pocos tipos celulares mientras que otros, entre los que se pueden citar los de la IL-1, IL-4 e IL-6, se encuentran distribuidos en una amplia variedad de tipos celulares. La expresión de los receptores de citoquinas en la superficie celular puede ser constitutiva, es decir, tiene lugar sin necesidad de ningún estímulo fisiológico o por el contrario, puede requerir que la célula sea activada previamente (Aguzzi A et al, 2005).

I.10. RESPUESTA INMUNITARIA Y PARTICIPACION DE LAS CITOQUINAS EN LA INFECCIÓN POR VIRUS B.

El VHB no es un virus citopático y su capacidad de lesión está condicionada por una respuesta inmunológica, básicamente a través de la inmunidad celular, que es capaz de eliminar las células infectadas y bloquear la infección de nuevas células (Cora M, 2004; Chisari F et al, 2005; Chee K et al, 2005).

El huésped ante la patogénesis de la enfermedad hepática viral inicia una respuesta inmunitaria celular antiviral específica al antígeno que pone en movimiento una cascada de sistemas efectores no específicos al antígeno, tales como la activación de macrófagos hepáticos, linfocitos T, células Killer, citotóxicas naturales "NK", anticuerpos, complejos inmunitarios y citoquinas (Figura 10) Todos ellos participan en la reacción inflamatoria hepática, pudiendo suprimir la

replicación y expresión del gen viral en el hepatocito (Trinchieri G et al, 1997; Arai K et al, 1990; Ferrari C et al 1990).

La infección causada por el VHB se caracteriza por un infiltrado celular mononuclear y polimorfonuclear con evidencia de activación de macrófagos hepáticos. Estas células inflamatorias producen citoquinas tales

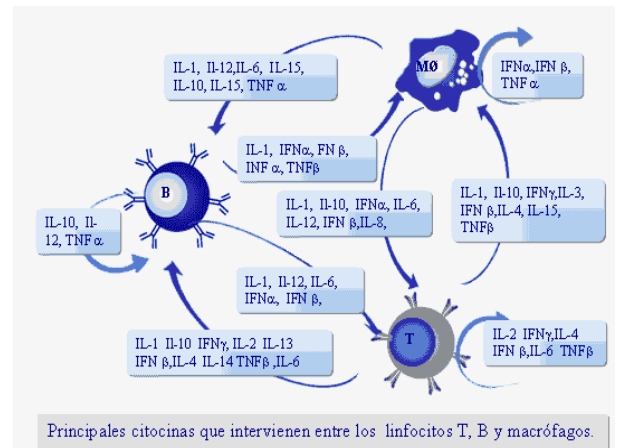


Figura 10. Respuesta antiviral

Fuente: Aguzzi A, 2005

como $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IFN-\alpha$, $IL-1\alpha$ e $IL-6$, las cuales median el proceso inflamatorio y pueden contribuir a la clarificación viral, a la evasión de la respuesta inmunitaria, o la progresión y persistencia del virus (Jung M et al, 2002; Chee K et al, 2005).

Por lo tanto, la respuesta inmunitaria ante el virus, estará determinada por la capacidad del huésped de eliminar la partícula viral de los hepatocitos infectados y el grado de daño hepatocelular subsiguiente variará de acuerdo a la respuesta del sistema inmunitario del individuo afectado (Nassal M, 1999; Chee K et al, 2005).

La eliminación de las partículas vírales intracelulares no depende sólo de una actividad citolítica específica, sino también de la supresión de la actividad viral por factores solubles como el $TNF-\alpha$ y el $IFN-\gamma$ liberados por células T. El mecanismo de cronicidad depende de una respuesta atenuada frente a los antígenos vírales expresados en la superficie celular. Esta respuesta inmunológica se observa en los enfermos portadores asintomáticos y se mantiene incluso décadas después de la resolución de la infección por el VHB (Ferrari C et al, 2003; Szkaradkiewicz A et al, 2003; Vingerhoets J et al 2001).

El sistema inmunitario posee diferentes estrategias celulares directas (células NK, linfocitos T citotóxicos) e indirecta a través de citoquinas con actividad antiviral para eliminar los agentes infecciosos. Las células infectadas por virus son eliminados por células T citotóxicas CD8+. Estos linfocitos reconocen péptidos derivados de patógenos unidos a moléculas clase I del MHC y secretan Perforina, Granzyme y frecuentemente citoquinas como IFN- γ , TNF- α , TNF- β , enlace del Fas, entre otros (Jung M, 2002; Abbas A et al, 2000; Stites D et al, 1999) (Figura 11).

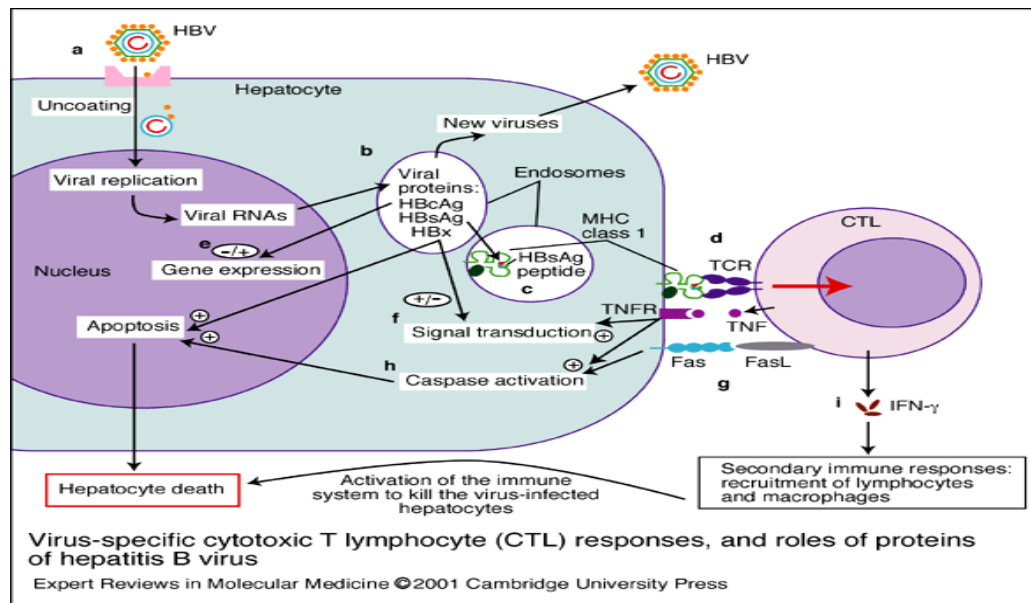


Figura 11. Respuesta inmunitaria celular. Y el rol de las proteínas del VHB.
Fuente: www.ermn.cbcu.cam.cu

Los linfocitos TCD4+ por su parte reconocen péptidos unidos a las moléculas clase II del "MHC" y comprende dos tipos funcionales: las células Th1 y las Th2.

El fenotipo Th1 participa en la activación de macrófagos infectados o que han fagocitado patógenos y secreta proteínas reguladoras como: IL-2, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TNF- β , IL-3, enlace del CD48 y del Fas. El fenotipo Th2 esta constituido por células que secretan citoquinas (IL-4, IL-5, IL-3. GM-CSF, IL-10, TGF- β , Eotoxina y enlace del CD40) inductoras de la activación de linfocitos B. La respuesta mediada por linfocitos CD4+ Th1 es efectiva en la resistencia contra patógenos intracelulares en cambio los linfocitos CD4+ Th2 favorecerá una

respuesta humoral (You J et al, 2007; Priimiagi L et al, 2003; Jiang R et al, 2002) cuyos efectos pueden ser benéficos hacia agentes extracelulares pero también suelen encontrarse asociados con el progreso de enfermedades por patógenos intracelulares (Kong L et al, 2005).

Existen además otros dos tipos de células conocidas como Th0 la cual tiene el potencial de transformarse en Th1 y Th2 y presenta algunas de las funciones efectoras características de estas células. Y un patrón de células Th3 que secreta el factor transformante del crecimiento B, ejerciendo una acción inmunoregulatoria negativa sobre la respuesta inmune (You J et al, 2007; Jiang R et al, 2002, 2000).

Estudios recientes utilizando linfocitos de sangre periférica de niños con hepatitis aguda y crónica por el VHB demuestran predominio del fenotipo Th1 durante la fase aguda y su disminución en la infección crónica se encuentra aunado a un incremento de las citoquinas mas controversiales por sus efectos, como la IL-10. Estos resultados revelan que la respuesta Th1 es eficiente en el control de la hepatitis B aguda (Sun Y et al, 2004; Szkaradkiewicz A et al, 2003; Jiang R et al, 2000). En el caso de la infección crónica puede estar determinada por una alteración de la respuesta Th1 y Th2. El incremento de la IL-10 puede suprimir la actividad de la respuesta inmune a través de una respuesta anti-inflamatoria por inhibición de células presentadoras de Antígeno y/o linfocitos T CD4+ Th1 (Cheong J et al, 2006; Ayada M et al, 2006). Durante la infección crónica por el VHB algunos estudios indican una disminución de la IL-10 junto al IFN- γ y un incremento de las mismas durante una cirrosis hepática (Song L et al, 2003).

La IL-10 se considera clave en la respuesta Th2 al inducir la diferenciación de linfocitos B en plasmocitos y secretores de inmunoglobulinas. La IL-10 puede actuar, no sólo como potenciador de la inmunidad humoral sino también como supresor general de la respuesta inmunitaria celular, con disminución del IFN- γ y del TNF- α (Joost J et al, 2002; Abbas A et al, 2000; Stites D et al, 1999).

Falasca y cols, (2006) indican una elevación de IL-6 e IL-18 durante el curso crónico de la infección por el VHB. Otras investigaciones indican además, la participación de la IL-10 durante el proceso patológico de la enfermedad hasta la fase de cirrosis (Song L et al, 2003; Zhang W et al, 2002; Tangkijvanich P et al, 2000). Otros estudios no encontraron significancia alguna entre los niveles en suero de IL-6 e IL-12(p70) y los cambios histopatológicos, por lo cual indican que niveles aumentados de IL-6 e IL-12 no reflejan actividad inflamatoria hepática alguna, durante la infección crónica por el VHB, sin embargo pueden ser marcadores útiles durante esta fase de la infección (Ayada M et al, 2006; Song L et al, 2003).

La presencia de IFN- γ , IL-4 e IL-5, ha sido detectada en CMSP, patrón similar al fenotipo celular Th0 (Hyodo N et al; 2003; Jiang R et al, 2000). El predominio de las células con patrón Th0 sin diferenciación posterior puede representar un mecanismo que involucre disminución de las citoquinas del patrón Th1, lo cual puede determinar daño en el huésped y cronicidad de la enfermedad por inhibición progresiva de la población de células T con efecto antiviral (Abbas A et al, 2000; Stities D et al, 1999). Los estudios en CMSP de Penna y cols (1997) demuestran que durante la fase aguda de la infección predomina un perfil de citoquinas Th1 y en la fase convaleciente el Th0.

Por otro lado, se ha observado una disminución en la síntesis de INF- γ , IL-2, TNF- α , IL-4 e IL-5 e incremento en los niveles IL-1 y del receptor soluble de IL-2 (RsIL-2) en pacientes con enfermedad hepática crónica por el VHB (Debnath C et al, 2005; Pawlowska M et al, 2005; Anastassako C et al, 1988). Así mismo, otros investigadores demostraron un aumento en la expresión del fenotipo Th2 en estudios realizados en CMSP en pacientes con hepatitis crónica por el VHB (Szkaradkiewicz A et al, 2003, Ferrari C et al, 2003; Tulek N et al, 2000).

Estudios realizados por Monsalve y cols (2002) en pacientes que evolucionaron a la resolución de la infección por el virus B indican un comportamiento similar del INF- γ y del TNF- α , manteniéndose dentro de sus

valores normales al compararlos con los de una población control. Una respuesta inmunitaria exagerada por parte de esas citoquinas frente a la carga de antígenos vírales, sería responsable de la muerte de un número elevado de hepatocitos produciendo una hepatitis fulminante.

El papel que juegue cada una de las citoquinas variara de acuerdo a la fase en que se encuentra la infección, a las concentraciones séricas de los antígenos vírales presentes, los tipos de antígenos y sobre todo la respuesta inmunitaria del paciente serán factores determinantes en la variabilidad de los resultados.

Si bien no se sabe con exactitud porqué en la mayoría de las personas la infección viral desaparece pero en otras persiste en forma indefinida, se considera que ello se debe más a las peculiaridades de la respuesta inmunitaria de la persona afectada que a la cepa viral involucrada. La investigación del papel de las citoquinas en determinadas patologías puede aportar datos que permitan un mejor conocimiento de su participación como mediadores de la respuesta inmunitaria.

I.11 INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

Diversos estudios han demostrado la asociación entre la exposición al ambiente y el desarrollo de diferentes entidades clínico-patológicas. Se considera al proceso inflamatorio como el inicio para la afectación del estado salud (**Hetland R et al, 2005; Myrianthefs P et al, 2003**).

Hetland y cols, en el año 2005 estudiaron la repercusión de partículas grandes (2.5-1 μm) y pequeñas (0.1-2.5 μm) del medio ambiente de ciudades europeas como Ámsterdam, Lodz, Oslo y Roma sobre el sistema inmunitario de modelo murino. Las partículas fueron recolectadas durante las estaciones de verano, primavera e invierno. Todas las fracciones fueron analizadas, tomando en consideración su efecto sobre la producción de citoquinas por macrófagos

alveolares aislados de los pulmones de ratas. Se correlacionaron las características físico-químicas de los elementos particulados y su potencial efecto inflamatorio. Las muestras de Lodz y Roma son consideradas las más estimulantes. Las de Lodz causaron la respuesta celular más alta durante las estaciones de verano y primavera. La liberación de citoquinas podría no ser atribuidas a parámetros químicos, sin embargo, las partículas grandes más que las pequeñas del medio ambiente, de las ciudades mencionadas, estimulan la secreción de las proteínas reguladoras inflamatorias tales como IL-6 y TNF- α . En las partículas grandes se apreció un contenido alto de hierro, cobre, algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos y lipopolisacaridos, no obstante, variaciones en la concentración de estos componentes no reflejaron modificaciones en la liberación de las citoquinas.

Estos investigadores demostraron que existe heterogenicidad en relación al efecto inflamatorio ejercido por las partículas de acuerdo a su tamaño, a su ubicación geográfica y a la estación del año en la cual fueron recolectadas las muestras. Para Becker y cols (2005) en el estudio de células epiteliales bronquiales y macrófagos humanos normales, los elementos constituyentes de las partículas del medio ambiente incluyeron efectos adversos relacionados con la inflamación pulmonar, sus conclusiones son contrarias a las de Hetland y cols pero hay que considerar que el modelo en estudio es diferente.

Myrianthefs P y cols (2003) realizaron estudios en humanos, procedentes del área urbana de Atenas, Grecia, examinando diferentes estaciones del año y la producción de citoquinas por CMSP estimuladas con lipopolisacarido en el grupo bajo estudio con patrón normal de vigilia/sueño. Estos investigadores encontraron una disminución de la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y de los receptores I y II del TNF- α en los 17 individuos sanos estudiados, durante los meses de junio y septiembre correspondientes a la estación de verano y otoño respectivamente. Estos resultados revelan las significativas implicaciones en la

determinación de los valores de referencia, en la exploración del sistema inmune y la prevalencia de enfermedades inflamatorias en las diferentes estaciones del año.

Mann D y cols (2000) estudiaron la influencia del patrón estacional sobre el desarrollo de una enfermedad común a monos Rhesus machos denominada campylobacteriosis, monitorizaron las alteraciones de la secreción de citoquinas del fenotipo Th1 (IL-2, IFN- γ) y Th2 (IL-4) provenientes de CMSP y recolectadas las muestras durante el invierno y la primavera. Se apreció un predominio significativo de las citoquinas tipo Th1 durante la primavera al compararla con el invierno, la respuesta Th2 no varió en las dos estaciones. La respuesta proliferativa de CMSP en mitógenos y la actividad de células NK variaron con las estaciones del año. La prevalencia de Campylobacter fue más alta en verano que durante la primavera, otoño e invierno. Por lo tanto, concluyeron que las fluctuaciones estacionales pueden alterar la capacidad de los primates a responder adecuadamente a patógenos.

Todo lo expuesto, revela que la influencia del medio ambiente sobre el sistema inmunitario es una realidad demostrada y que debería ser tomada en cuenta al momento de iniciar una investigación científica. Además, algunos autores consideran que pueden existir otros factores aunados a los ya citados que modificarían el comportamiento del sistema, tales como exposición a antígenos externos en especial a los de origen microbiológico (Purokivi M et al, 2001), ciertos hábitos alimenticios (Zhao G et al, 2007; James M et al, 2000), los cuales podrían incidir en la respuesta inmune por secreción o inhibición de citoquinas pro o anti-inflamatorias.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La función del sistema inmunitario es dependiente de diversas variables que incluyen las características genéticas de cada individuo, las interacciones entre los diferentes sistemas del organismo, incluyendo el neuroendocrino, la alimentación, la exposición a antígenos externos en especial los de origen microbiológico y/o parasitario. En conjunto, consideramos relevante caracterizar el impacto que el entorno geográfico epidemiológico ejerce sobre el estado funcional del sistema inmune.

El VHB es considerado un agente etiológico de hepatitis aguda, crónica, cirrosis, hepatocarcinoma y manifestaciones inflamatorias extrahepáticas, su presencia determina el estímulo para una respuesta inmunitaria humoral y/o celular.

Uno de los factores que podría modificar el curso de la infección por el VHB lo constituye la red de intercomunicación del sistema inmune conformada por las proteínas reguladoras llamadas citoquinas. Estas juegan un papel importante en la respuesta inmunológica ante la infección por el VHB, pudiendo contribuir a la eliminación de la partícula viral o a su persistencia, con la subsiguiente cronicidad de la infección e inducción de daño tisular.

La finalidad del presente estudio es incrementar nuestro conocimiento sobre el comportamiento funcional del sistema inmune en diferentes ámbitos de presión antigénica. En primer lugar, comparando el perfil sérico de citoquinas de individuos pertenecientes a grupos sociales con marcadas diferencias en su cultura, en las condiciones higiénicas de sus viviendas y en su acceso a los servicios sanitarios, como son los indígenas de un área rural agreste de Venezuela y los habitantes de un área urbana de Venezuela y España. En segundo lugar, hemos analizado, también mediante el estudio del perfil sérico de citoquinas, el diferente impacto de la infección crónica por el VHB en el sistema inmune de individuos de estos distintos grupos sociales, como son los indígenas de un área rural y sujetos urbanos, ambos de Venezuela.

HIPOTESIS

- ✓ La presión antigénica ambiental, determinada por el área geográfica y las diferencias en el acceso a determinados niveles de condiciones higiénicas y sanitarias, condiciona la respuesta funcional del sistema inmune del individuo, definida por el perfil sérico de citoquinas.
- ✓ Las poblaciones indígenas rurales de Venezuela presentan un estado de depresión funcional de la respuesta inmunitaria que pudiera determinar la elevada frecuencia de infección crónica por el VHB

OBJETIVOS

Para poder avanzar en el conocimiento de la infección por virus B y poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas es clave caracterizar el estado funcional inmune durante esta patología y los diferentes factores involucrados en pacientes con estado de portadores procedentes de distintos entornos epidemiológicos, entre los que se encuentra una etnia de alta prevalencia de esta infección de un medio rural agreste e individuos del entorno urbano venezolano y europeo respectivamente. Esta estrategia tiene los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el estado funcional del sistema inmune mediante el perfil sérico de citoquinas circulantes (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α e INF- γ) de individuos no infectados por el VHB pertenecientes a diferentes áreas geográficas de Venezuela y de España.
2. Investigar el impacto de la infección por el VHB en el estado funcional del sistema inmune a través de la cuantificación de citoquinas circulantes (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α e INF- γ) en individuos con infección crónica asintomática por el virus B pertenecientes a diferentes entornos geográficos

(rural y urbana) de Venezuela, comparándola con la de individuos controles de ese mismo entorno.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

III.1.1 Tipo de diseño

El presente estudio fue de tipo prospectivo, inferencial, transversal, translacional.

III.1.2 Periodo de estudio.

Esta investigación fue realizada durante el periodo comprendido entre el año 2005 y año 2006.

III.1.3 Ámbito de estudio:

El estudio serológico de la infección crónica asintomática por el VHB y la detección del DNA viral por PCR de los pacientes de las poblaciones de Venezuela se realizó en el Laboratorio Regional de Referencia Viroológica de la ciudad de Maracaibo y en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) de la ciudad de Caracas respectivamente.

Estas muestras fueron trasladadas luego hasta el Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología del Departamento de Medicina de la Universidad de Alcalá, previo permiso sanitario por parte de las autoridades correspondientes en España, para la determinación de citoquinas séricas.

III.1.4 Selección de la población y procedencia de la misma

La muestra de nuestro estudio la constituyeron 97 individuos que fueron categorizados en dos grupos. El primero lo formaban 56 individuos no infectados por el VHB (NI -VHB) pertenecientes a diferentes áreas geográficas de Venezuela (N= 36) y España (N=20). El segundo grupo lo formaban 41 pacientes con infección crónica asintomática por el VHB pertenecientes a un área rural (N=20) y urbana (N=21) de Venezuela.

Las muestras de la población NI-VHB fueron obtenidas por punción venosa fueron tomadas en los respectivos centros hospitalarios (IVIC, Caracas, Laboratorio Regional de Referencia Viroológica, Maracaibo, Venezuela y en Laboratorio de enfermedades del Sistema Inmune del Departamento de Medicina, Universidad Alcalá, Madrid, España) previo consentimiento de todos los participantes en el estudio, durante el periodo 2005-2006.

La recolección de las muestras de los pacientes crónicos asintomáticos de Venezuela se realizó en el año 2005-2006 y fueron almacenadas apropiadamente a -20 °C hasta su traslado en el año 2006 al laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune del Departamento de Medicina, Universidad Alcalá, Madrid, España, respetando las normas de seguridad de transporte de muestra biológicas y garantizando el mantenimiento de la cadena de frío para la preservación de las mismas.

Los individuos analizados en el presente estudio se clasificaron del siguiente modo:

Grupo de individuos no infectados por el VHB (N=56):

Grupo 1.- 16 personas entre 15 a 60 años de edad de uno u otro sexo sin antecedentes clínicos y de laboratorio de hepatitis, pertenecientes a la población urbana de Caracas y Maracaibo, Venezuela.

Grupo 2.- 20 individuos indígenas, en edades comprendidas entre 15 a 60 años de edad de uno u otro sexo sin marcadores serológicos ni antecedentes clínicos de infección por el VHB.

Grupo 3.- 20 individuos procedentes del entorno europeo español en similares edades y sexo con los individuos obtenidos del entorno sudamericano.

Grupo de pacientes con infección crónica asintomática por el VHB (N=41)

Grupo 1.- 21 pacientes de la población urbana venezolana de la ciudad de Caracas y Maracaibo, Venezuela: De uno u otro sexo en edades comprendidas entre 20 a 60 años, diagnosticados con infección crónica asintomática por el VHB

Grupo 2.- 20 pacientes de una etnia indígena, de la comunidad Japreira de la Sierra de Perijá, Estado Zulia, Venezuela. De uno u otro sexo en edades comprendidas entre 20 a 60 años, con infección crónica asintomática por el VHB.

Los grupos controles de estas poblaciones fueron los respectivos individuos no infectados por el VHB de su mismo entorno geográfico.

III. 1.5 Criterio de inclusión:

Padecer una infección crónica asintomática por el VHB basado en el hallazgo de marcadores serológicos indicativos de esta fase y siguiendo los criterios diagnósticos de la ASSLD como fueron: presencia de HBsAg por más de seis meses, anti-HBc, anti-HBe, DNA viral $< 10^5$, y ausencia de HBeAg, anti-HBc-IgM y anti-HBs con aminotransferasas normales.

III.1.6 Criterio de exclusión:

Se excluyeron del presente estudio mujeres embarazadas, pacientes hemodializados, leucémicos, hemofílicos, con enfermedades autoinmunitarias, pacientes inmunizados contra el VHB, con hepatitis B aguda, con infección crónica por el VHB y aminotransferasas elevadas, con hepatitis A, C y D e infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Citomegalovirus, Epstein-Barr, así como personas diabéticas y obesas.

III.2. ORGANIZACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA.

III.2.1 Recolección de la muestra de suero. A todos los individuos a ser evaluados, se les extrajo 10 cc de sangre venosa para obtención de suero por centrifugación (1600xg por 15 minutos) repartiéndose el suero en 4 alícuotas de 500ul cada una y guardándose a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

La comunidad Japreira habita en la Sierra de Perijá, la cual se ubica entre los $72^{\circ} 15'$ y $73^{\circ} 15'$ longitud W y los $9^{\circ} 00'$ y $11^{\circ} 10'$ latitud N. Estas coordenadas se corresponden con el oeste del Estado Zulia, en la parte septentrional de la cordillera de los Andes que conforma el límite occidental de la cuenca hidrográfica del Lago de Maracaibo, zona fronteriza entre Colombia y Venezuela. El entorno natural de la Sierra combina una rica diversidad de ecosistemas (bosque seco tropical, húmedo tropical, muy húmedo montañoso bajo, muy húmedo montañoso, y páramo). Las precipitaciones son abundantes (1500-2400mm), y las temperaturas oscilan entre máximas de 30°C y mínimas de 13°C .

Para la toma de la muestra se hizo necesario el traslado tanto del personal técnico y profesional como de los equipos hasta la comunidad, a 6 horas de la comunidad urbana mas cercana (Machiques), para lo cual requiere vehículo todo terreno y canoas para atravesar el río Palmar. Una vez en el sitio, el alojamiento se lleva a cabo en bohíos de paja al aire libre con algún mobiliario rustico adecuado para la instalación de equipos y fuentes de luz. El primer día comprendió la motivación y comunicación a la comunidad a través del líder o cacique, máxima autoridad de la comunidad, a fin de obtener la participación masiva de los integrantes previa explicación de los objetivos y beneficios de los exámenes por realizar. El segundo día se realizó un operativo medico-asistencial, odontológico, toma de muestra de heces para diagnóstico de parasitosis, realizado por profesional en el área y la toma de muestra sanguíneas a todos los individuos que acudieron voluntariamente al sitio del operativo, a cada uno se le trato de hacer una historia epidemiológica que comprendía: nombre, edad, síntomas compatibles con hepatitis u otras patologías a fin de detectar posible infección o

enfermedad previa en evolución para el momento del estudio. Entre las limitaciones encontradas tenemos diferencias en el idioma y carencia de comprensión por parte de los participantes, motivo por el cual no se pudo obtener toda la información necesaria para su análisis. Se procedió luego a la toma de 10 cc de sangre por punción venosa sin anticoagulantes para obtención de 5 alícuotas de suero de 500cc cada una, las cuales fueron guardadas en recipientes adecuados con hielo seco por 72 horas, el cual se fue renovando hasta su traslado a la ciudad de Maracaibo al Laboratorio Regional de Referencia Viroológica, en donde se guardo a -20°C hasta su procesamiento.

III. 3. METODOS:

La detección de marcadores de infección crónica asintomática por el VHB fue realizada por la técnica de Inmunoanálisis enzimático de micropartículas (MEIA). IMx (Abbott Lab. División de Diagnóstico).

La detección de DNA-VHB se realizo mediante la técnica HBV fase de Pharma Gen, S.A. (España).

Para la determinación de citoquinas (IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ), se utilizó el método cuantitativo de la técnica de Inmunoanálisis Enzimático (ELISA) sándwich, de acuerdo al laboratorio Diaclone a tepnel Company, (España).

Para la detección de las citoquinas IL-12, IL-18 y TNF- α se utilizó el método cuantitativo de la técnica de Inmunoanálisis enzimático (ELISA) de Bender MedSystems. Viena, Austria.

III.3.1 Detección de marcadores serológicos de Hepatitis B: anti-HBc, HBsAg HBeAg, anti-HBc-IgM y anti-HBs.

La detección de marcadores serológicos indicativos de infección crónica asintomática por el VHB se realizó por el método de ELISA, utilizando micropartículas submicrónicas como medio de captura de la sustancia a analizar,

cubiertas con Antígeno (Ag) ó un anticuerpo (Ac) de origen monoclonal (tabla 1). Durante el período de incubación, la sustancia a analizar se une a las micropartículas formando un complejo inmunitario. El complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) reaccionará posteriormente con el conjugado (C), el cual esta formado por un anticuerpo de origen monoclonal (especifico para la sustancia por analizar) unido a la fosfatasa alcalina. El complejo Ag-Ac-C es capturado sobre una matriz de fibra de vidrio de la celdilla de reacción para unirse posteriormente a un sustrato fluorífero (fosfato-4-metil-umbeliferil. MUP). Determinándose así la actividad enzimática por hidrólisis del MUP a 4-metilumbeliferona (MU). La tasa de generación de MU será proporcional a la concentración de la sustancia por analizar en la muestra. Siendo el producto fluorescente medido por el sistema óptico del IMx.

Sustancia por analizar	Origen de Acs monoclonales	Control Positivo	Control Negativo
HBsAg	Anti-HBs (ratón)	Plasma humano reactivo para HBsAg	Plasma humano no reactivo para HBsAg, anti-HBs y anti-HIV
HBeAg	Anti-HBe(ratón)	Ag "e"(DNAr) no reactivo para otros marcadores de HB	Plasma humano no reactivo para otros marcadores de HB
anti-HBc IgM	Anti-IgM humana (cabra)	Plasma humano reactivo para anti-HBc IgM	Plasma humano no reactivo para HBsAg, y anti-HBs
Anti-HBe	Anti-HBe (ratón)	Plasma humano reactivo para anti-HBe	Plasma humano no reactivo para otros marcadores de HB
Anti-HBs	AgsHB (DNAr) subtipo "ad" y "ay"	Plasma humano reactivo para anti-eHB	Plasma humano no reactivo para AgsHB, anti-HBs y anti-HIV

Especificidad: La especificidad fue determinada luego de analizar muestras de pacientes con infección crónica asintomática por el VHB y muestras con otras etiologías de origen parasitario, bacteriano y viral, muestras de pacientes hemofílicos, alcohólicos, dializados, factor reumatoide positivo y donantes de sangre. Ninguno de estas categorías de especímenes fue encontrado como causa

de falsos reactivo. Demostrándose que la especificidad, sensibilidad y precisión para los diferentes marcadores fue:

Marcador	Especificidad (%)	Sensibilidad	Precisión
HBsAg	97.8	0.43 ng/m	> 6%
HBeAg	99.64	Tit de 1:2.048	>10%
anti-HBc IgM	98.6	Tit de 1:100.000	>10%
Anti-HBs	99.4	Tit de 1:100.000	>10%
Anti-HBe	98.37	> 0.2 U/mL	>10%

III.3.2. Detección del DNA viral (técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa).

La detección del DNA viral se realizó mediante la técnica HBV fase de Pharma Gen, S.A. (España), amplificando un fragmento de 391 pb correspondientes a los nucleótidos 320-710 (secuencia del subtipo adw, Schaefer, 1992), por ser una región altamente conservada, detectándose todos los genotipos de un virus tan variable como el este.

La detección del producto amplificado se realiza mediante la técnica de ELISA. La reacción de amplificación contiene dUTP-Digoxigenina. Este complejo, sustituye al dTTP, y el producto amplificado queda marcado con moléculas de digoxigenina. La sonda, marcada con biotina, se pega a un pocillo de microplaca, que esta tapizado con estreptavidina. Una vez pegada la sonda a la placa, el producto amplificado se desnaturaliza a 100°C durante 10 minutos y se añade al pocillo donde hibrida con la sonda. A continuación se añade un anticuerpo anti-digoxigenina que tiene unido peroxidasa. La visualización se hace con la adición de un sustrato de la peroxidasa que produce un color verde tras la reacción.

Sensibilidad: de acuerdo a la casa comercial la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa en las muestras en las que se quiere detectar el virus es causal de

falsos positivos, lo cual queda eliminado gracias al desarrollo de un control interno de la reacción de amplificación, que es un fragmento de DNA, que se amplifica con los mismos cebadores que el VHB produciendo una banda de mayor tamaño que la que se obtiene a partir del DNA del virus. De este modo la amplificación del DNA viral en presencia del control interno produce dos fragmentos: uno de 391 pb correspondiente al genoma viral y otro de 1200 pb correspondiente al control interno. Lo cual conducirá a los siguientes casos:

✚ Si la muestra es positiva para el control interno y para el VHB, significa que la muestra contiene el virus y aparece el producto de la amplificación del virus y del control interno.

✚ Si la muestra es positiva para el control interno y no para el VHB, significa que la muestra no contiene el virus y solo aparece el producto de la amplificación del control interno.

✚ Si la muestra no es positiva ni para el control interno ni para el VHB, significa que la reacción ha estado inhibida, por lo que si el virus hubiese estado presente en la muestra no lo habríamos detectado.

El control interno ayuda a distinguir entre estos dos últimos casos, es decir, entre aquellos realmente negativos y los que son negativos porque se ha inhibido la Taq polimerasa o se ha degradado el DNA de la muestra (falsos negativos).

De acuerdo a esto la sensibilidad del kit HBV Fast es de menos de 500 copias de DNA viral por mL de suero.

Interpretación de Resultados:

Positivo: absorbancia en el pocillo con el oligo VHB mayor a dos veces el fondo (se toma como fondo el pocillo con el oligo VHB del control negativo de amplificación). Si la absorbancia de la muestra esta entre dos veces y dos veces y media el fondo, se recomienda repetir el ensayo de la muestra.

Negativo: absorbancia del pocillo con el oligo VHB por debajo de dos veces el fondo, y el pocillo con la sonda del control positivo por encima de 0.25 (color verde claramente visible).

- Reacción de amplificación inhibida: absorbancia del pocillo con el oligo VHB menor de dos veces el fondo y el del control interno por debajo de 0,25.

- Contaminación: absorbancia del pocillo con el oligo VHB del control negativo de amplificación por encima de 0,25. Repetir el ensayo.

III.3.3. Determinación de los niveles de Citoquinas:

III.3.3.1 Cuantificación de IL-2, IL-6, IL-10 e INF γ .

Las concentraciones de cada citoquina en suero fueron determinadas por la técnica de ELISA desarrollada por la casa comercial DIACLONE, (siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Este ensayo utiliza un Ac monoclonal específico a cada una de las citoquinas a determinar adsorbido a la superficie de los micropozos de la placa de microtitulación. Estándares (utilizados como controles) y citoquinas presentes en las muestras séricas reaccionarán con este Ac y un segundo Ac-biotinado formando un complejo Ac-citoquina-Ac biotinado. Luego de un período de incubación y el correspondiente proceso de lavado se añade un conjugado (streptavidina-HRP) que se unirá a este complejo. La actividad enzimática es revelada por la adición del sustrato (tetrametilbenzidina. TMB) específico a la enzima. El desarrollo de color producido por esta reacción será proporcional a la cantidad de citoquina presente en la muestra, pudiendo ser leída a 450 nm .A fin de determinar las concentraciones presentes de las citoquinas en las muestras se obtuvo una curva donde se visualizaban la densidad óptica versus la concentración conocida de los estándares de cada citoquina. Los valores de las citoquinas se expresan en pg/mL.

Observaciones metodológicas:

- Especificidad del Ensayo: cada kit reconoce cada una de las citoquina (IL-2, IL-6, IL-10 y IFN- γ) en su forma tanto natural como recombinante humana, no presentando interferencias o reacciones cruzadas con estas citoquinas en ratón o con otras citoquinas presentes en el suero.

- Sensibilidad del ensayo:

La sensibilidad de este ensayo determina que este es capaz de detectar: de:

- ❖ IL-2 menos de 10 pg/mL .
- ❖ IL-6 menos de 2 pg/mL.
- ❖ IL-10 menos de 5 pg/mL.
- ❖ IFN- γ menos de 5 pg/mL.

- Coeficiente de variación: El coeficiente de variación de ELISA para todas las citoquinas analizadas ha sido determinado, siendo menos del 10%.

III.3.3.2 Cuantificación de los niveles de citoquinas de: IL-12, IL-18 y TNF- α .

Las concentraciones de cada citoquina en suero fueron determinadas por la técnica de ELISA desarrollada por la casa comercial Bender MedSystem, Viena, Austria. Este ensayo utiliza un Ac monoclonal específico a cada una de las citoquinas a determinar adsorbido a la superficie de los micropozos de la placa de microtitulación. Estándares (utilizados como controles) y citoquinas presentes en las muestras séricas reaccionarán con este Ac y un segundo Ac biotinado formando un complejo Ac-citoquina-Acbiotinado. Luego de un período de incubación y el correspondiente proceso de lavado se añade un conjugado (streptavidina-HRP) que se unirá a este complejo. La actividad enzimática es revelada por la adición del sustrato (tetrametilbenzidina. TMB) específico a la enzima. El desarrollo de color producido por esta reacción será proporcional a la

cantidad de citoquina presente en la muestra, pudiendo ser leída a 450 nm .A fin de determinar las concentraciones presentes de las citoquinas en las muestras se obtuvo una curva donde se visualizaban la densidad óptica versus la concentración conocida de los estándares de cada citoquina. Los valores de las citoquinas fueron expresados en pg/mL.

Observaciones metodológicas:

- Especificidad del Ensayo: cada kit reconoce cada una de las citoquina (IL-12, IL-18 y TNF- α) en su forma tanto natural como recombinante humana, no presentando interferencias o reacciones cruzadas con estas citoquinas en ratón o con otras citoquinas presentes en el suero.

- Sensibilidad del ensayo:

La sensibilidad de este ensayo determina que este es capaz de detectar:

- ❖ De IL-12 menos de 12.6 pg/mL .
- ❖ De IL-18 menos de 9.2 pg/mL.
- ❖ De IL- TNF- α menos de 3.8 pg/mL.

- Coeficiente de variación: El coeficiente de variación de ELISA para todas las citoquinas analizadas ha sido determinado, siendo menos del 10%.

III.4. ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACION RECOGIDA

III.4.1 Descripción de las variables de la base de datos.

III.4.1.1 Variables Generales de los grupos en estudio:

1.- Número de historia: creada para control, manejo e identificación de los pacientes.

2.- Identificación de los pacientes: conformada por los nombres de cada paciente o sus respectivas iniciales.

III.4.1.2 Variable grupo: los datos recogidos se tabularon en una base de datos como variable cualitativa con los siguientes valores:

Sexo:

1= Mujer

2=Varón

III.4 .1.3 Variable Clínica:

1= Grupo de portadores asintomáticos por virus B pertenecientes a la población indígena Venezolana.

2= Grupo de portadores asintomáticos por virus B pertenecientes a la población urbana Venezolana.

3= Grupo control o NI-VHB de la población indígena Venezolana.

4= Grupo control o NI-VHB perteneciente a la población urbana Venezolana.

5= Grupo NI-VHB procedente de la población española.

III.4.1.4 Variable marcador serológico para infección crónica por virus B.

Los datos recogidos se tabularon en una base de datos como variable cualitativa con los siguientes valores:

1= Positivo para la presencia de alguno de los marcadores serológicos evaluados.

0= Negativo para presencia de marcadores serológicos.

III.4.1.5 Variables cuantitativas

Edad: expresada en años

Expresión de citoquinas: indicada en pg/mL.

III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se expresan como media \pm desviación estándar (media \pm DS). Para la comparación entre las medias de los grupos en estudio y el control se utilizaron pruebas no paramétricas en función de que en los grupos estudiados se rechazara la hipótesis de normalidad. Por tanto se utilizó la prueba de U Mann-Whitney y el análisis de W Wilcoxon según correspondiera, para definir las diferencias significativas entre las variables estudiadas en los diferentes grupos. Se utilizó igualmente como índice de confianza el 95% y se consideró toda probabilidad < 0.05 como significativa. Se determinó además la relación entre las variables estudiadas en cada grupo a través del análisis de correlación de Pearson.

III.6. Búsqueda bibliográfica.

La principal fuente de información ha sido la base de datos *Medline*, accesible en la siguiente dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>. Se trata de la base mas completa, fiable y rigurosa de que se dispone en biomedicina, de gran cobertura y bien estructurada. La búsqueda se realizó mediante la introducción de palabras clave en inglés, seleccionando los artículos de las revistas de mayor impacto dentro del tema que nos ocupa. En algunos casos se realizó introduciendo el nombre del primer autor firmante de artículos de gran impacto relacionados con el tema en estudio, revisando sus publicaciones hasta la actualidad.

IV. RESULTADOS

En la siguiente sección presentamos la evaluación de las variables inmunológicas en individuos NI-VHB pertenecientes a diferentes entornos geográficos (Venezuela y España) y en pacientes con infección crónica asintomática por el VHB comparada con los grupos anteriores.

Inicialmente presentamos un análisis demográfico y clínico de los individuos que participaron en nuestro estudio. En segundo término, exponemos los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de citoquinas séricas mediante gráficos de barras y de cajas y bigotes

IV.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

IV.1.1. Características de los individuos NI-VHB

Con el fin de caracterizar el impacto que el contorno geográfico y socioeconómico pueda ejercer sobre el estado funcional del sistema inmunológico se evaluó la relación que pudiese haber entre la secreción de niveles séricos de citoquinas en individuos pertenecientes a diferentes entornos geográficos de áreas rurales y urbanas de Venezuela y área urbana de España.

Con tal finalidad se solicitó la colaboración voluntaria de individuos NI-VHB, sin antecedentes clínicos ni de laboratorio de infecciones por los virus de hepatitis B, C y del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), así como de enfermedades autoinmunes. Las muestras obtenidas de estos individuos fueron cotejadas en edad y sexo.

Previo a su inclusión en este estudio, estos individuos fueron informados en relación al objetivo de la investigación y del procedimiento experimental de la muestra obtenida, dando su consentimiento a participar en el mismo. El consentimiento de los miembros de la comunidad indígena se obtuvo del líder o cacique, a quien se le informó de las características de esta investigación.

Se cumplieron los procedimientos éticos para la toma de muestra en humanos según directrices del Comité Ético del Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, entidad que conoció y aprobó el desarrollo de este trabajo.

Tabla 5. Características demográficas de individuos NI-VHB pertenecientes a diferentes áreas geográficas de Venezuela y España.

	Individuos NI-VHB del área geográfica de Venezuela		Individuos NI-VHB del área geográfica de España
T (total)	36		20
Población	Indígena	Urbanos	Urbanos
N / T (%)	20 / 36 (55.5) *	16 / 36 (44.4) *	20 / 20 (100) ‡
Sexo (total)			
Varón/Mujer	11/9 (55% / 45%)*	9/7 (56.25%/ 43.75%)*	3/17 (15% / 85%) ‡
Edad (años)	20.0±5.6	34.8±11.3	31.8±5.6
	28.2±20.5*		31.8±5.6 ‡

T = numero total de pacientes de cada área geográfica

N = numero total de cada población estudiada

%= porcentaje

* Del numero total de individuos NI-VHB del área geográfica de Venezuela

‡ Del numero total de individuos NI-VHB del área geográfica de España

IV.2. EVALUACIÓN DE CITOQUINAS SÉRICAS EN GRUPOS NI-VHB DEL ENTORNO GEOGRÁFICO DE VENEZUELA Y ESPAÑA.

Para el estudio funcional del sistema inmune en individuos NI-VHB de diferentes entornos geográficos se evaluó el nivel de cada citoquina sérica (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- γ) en todos los pacientes de nuestro marco muestral.

El análisis de las diferentes citoquinas se realizó a través del ensayo inmunoenzimático de ELISA, cuyos fundamentos se explican en la sección de materiales y métodos (ver Capítulo 3). La unidad de medida de los diferentes datos se expresa en picogramos por mililitro (pg/ml). Se evaluaron y compararon los niveles de citoquinas séricas de individuos NI-VHB del área geográfica de Venezuela y España, a fin de conocer si la respuesta funcional del sistema inmunológico de estos individuos está condicionada por la presión antigénica

ambiental de acuerdo al entorno geográfico en el cual habitan. Los valores se reflejan en la tabla 6.

Tabla 6. Evaluación de los niveles séricos de citoquinas en individuos NI-VHB de diferentes entornos geográficos (rural y urbano venezolano y urbano europeo).

	IL-2	IL-6	IL-10	IL-12	IL-18	TNF- α	INF- γ
Indígena NI- VHB	14,5 \pm 4.6	1,98 \pm 0.2	9,7 \pm 0.6	214,9 \pm 36,9	316,1 \pm 66,6	37,6 \pm 3,8	6,4 \pm 0,2
Urbano Venezolano NI-VHB	8,7 \pm 0.9	0,7 \pm 1,0	5,8 \pm 0.2	N.D.	N.D.	6,0 \pm 0.2	11,8 \pm 0.1
Urbano español NI-VHB	0,00 \pm 0,0	1,5 \pm 0,03	3,3 \pm 0,4	0,7 \pm 0,08	276,23 \pm 37,6	2,10 \pm 0,2	7.02 \pm 1.2

Los valores se expresan en media \pm desviación estándar
N.D.= No determinado.

IV.2.1. Evaluación de IL-2

La citoquina IL-2 es un potente factor de crecimiento autocrino de las células T, determinante en la amplificación de la respuesta inmunológica celular. Es considerada un elemento clave en la respuesta del sistema inmune dependiente de las células T, siendo de capital importancia en la regulación de la tolerancia inmunológica periférica (Ma A et al, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa una disminución significativa ($p < 0.0001$) en la población de españoles NI-VHB comparada con los individuos venezolanos NI-VHB (indígenas y urbanos). Mientras que entre estas dos últimas poblaciones no se presentó

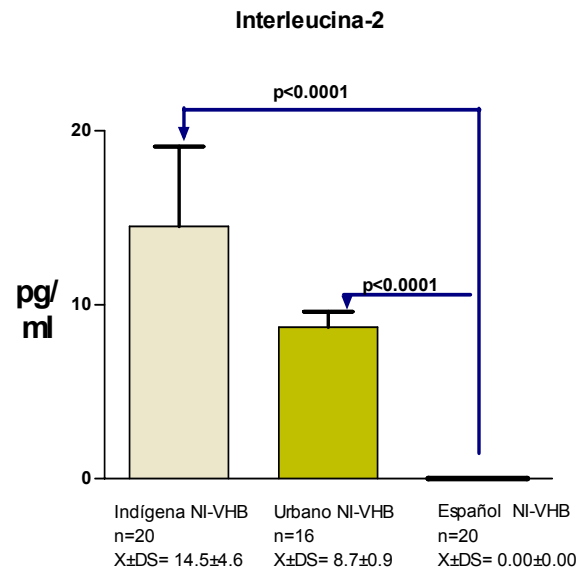


Figura 12. Evaluación de la IL-2 en las poblaciones estudiadas (Indígena venezolano, urbano Venezolano y españoles NI-VHB)

diferencia significativa a pesar del aumento en las concentraciones séricas de la IL-2 en la población de indígenas.

IV.2.2. Evaluación de IL-6

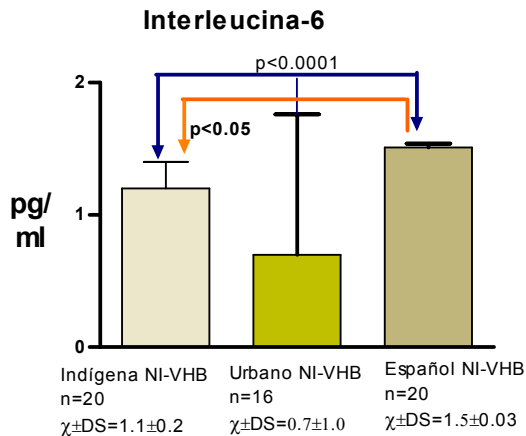


Figura 13. Evaluación de la IL-6 en las poblaciones estudiadas (Indígena venezolano, urbano Venezolano y españoles NI-VHB)

La IL-6 estimula la síntesis de proteína de fase aguda por los hepatocitos, la proliferación de linfocitos T maduros, células B para producir anticuerpos e incrementa la actividad de factores de crecimiento hematopoyético como el GMC-SF. (Hernández U et al, 2001)

En la presente figura se señala una disminución significativa ($p < 0.0001$) presente en la población de urbanos venezolanos NI-VHB con respecto a los indígenas del mismo entorno geográfico y con respecto a los españoles. Igualmente se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en la población de españoles NI-VHB con respecto a los indígenas NI-VHB.

IV.2.3. Evaluación de IL-10

La IL-10 es producida por clones de células CD4+ Th2, Th1 y Th0 linfocitos T CD8+, citotóxicos, células mastocitarias, monocitos, queratinocitos, eosinófilos y varias células tumorales. Inhibe citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α), factores de crecimiento (GMC-SF y GC-SF), quimiocinas (MIP-1 α) producido por fagocitos mononucleares, IFN- γ y TNF- α secretados por células NK (Abbas A 2002; Hernández U et al, 2001).

La determinación de IL-10 indica un aumento significativo ($p < 0.01$) en la población de indígenas NI-VHB con respecto a los urbanos venezolanos. Un aumento significativo ($p < 0.001$) en los indígenas NI-VHB frente a los españoles NI-VHB. Además se observa una disminución significativa ($p < 0.01$) en los españoles en relación a los urbanos venezolanos (Figura 14)

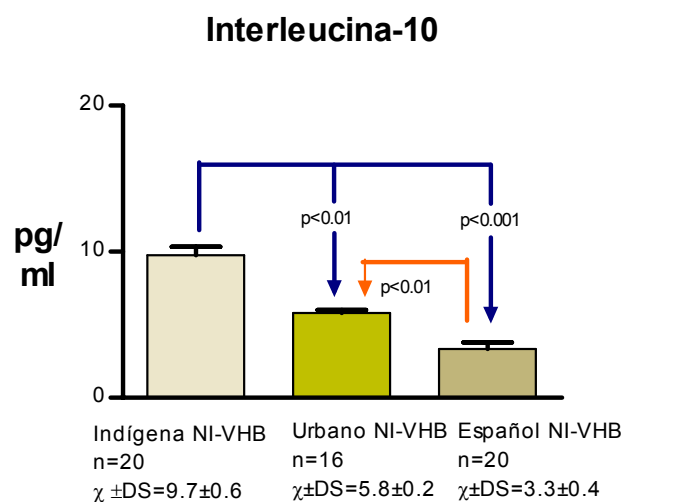


Figura 14. Evaluación de IL-10 en las poblaciones evaluadas (Indígenas venezolanos, urbanos venezolanos y españoles NI-VHB)

IV.2.4. Evaluación de TNF- α e INF- γ

Otras citoquinas importantes en la respuesta inmunitaria contra patógenos intracelulares son el IFN- γ y el TNF- α , con un efecto sinérgico para controlar la proliferación viral a través de la inhibición de la expresión del gen del VHB (Tilg H et al, 2006)

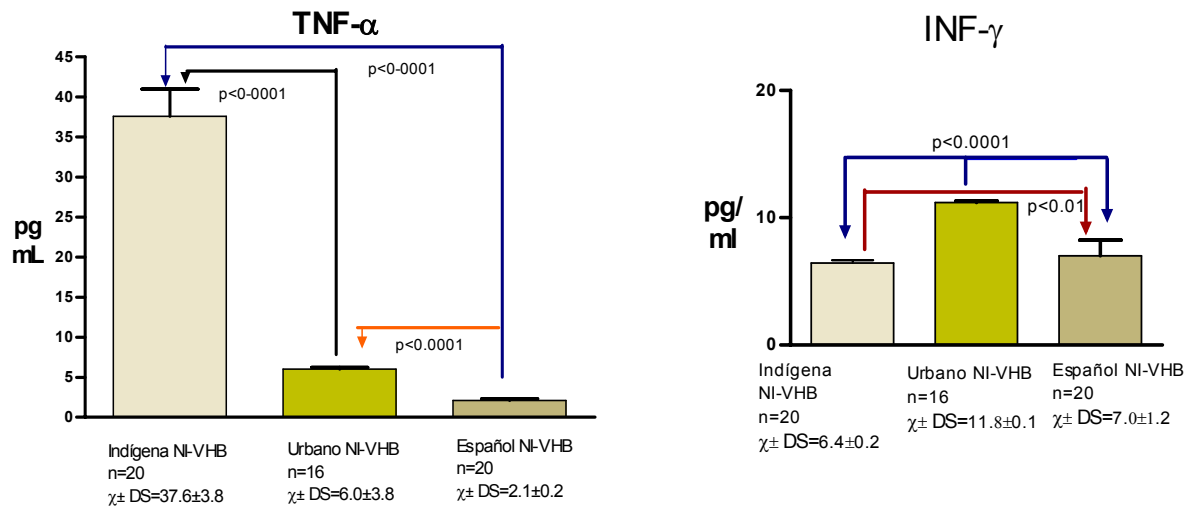


Figura 15. Evaluación de TNF- α e INF- γ en las poblaciones estudiadas (Indígenas venezolanos, urbanos venezolanos y españoles NI-VHB).

De acuerdo a los resultados encontrados se indica una disminución significativa ($p < 0.0001$) de TNF- α en la población de españoles NI-VHB frente a los urbanos venezolanos e indígenas NI-VHB y una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en los urbanos venezolanos NI-VHB con respecto a los indígenas NI-VHB.

Por otra parte, los niveles séricos de INF- γ se encontraron incrementados significativamente ($p < 0.0001$) en la población de venezolanos NI-VHB con respecto a los indígenas y españoles. Y una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los indígenas venezolanos NI-VHB quienes presentan una disminución de los niveles de INF- γ con respecto a los españoles NI-VHB.

IV.2.5 Evaluación de IL-12 e IL-18

Ambas citoquinas están estrechamente relacionadas en sus funciones biológicas al estimular la secreción de IFN- γ en linfocitos T y células NK, actúan además como factor de diferenciación de linfocitos Th0 hacia el fenotipo Th1 (Cavanaugh et al, 1997; Szkaradkiewicz et al 2004).

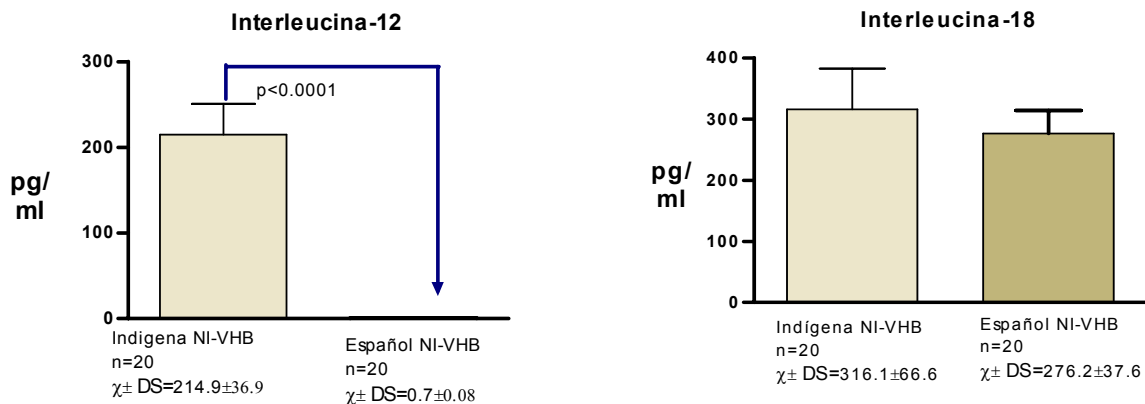


Figura 16. Evaluación de IL-12 e IL-18 en las poblaciones estudiadas (Indígenas venezolanos, urbanos venezolanos y españoles NI-VHB).

La figura 16 indica un aumento de IL-12 significativo ($p < 0.0001$) en la población de indígenas venezolanos NI-VHB frente a la población de españoles NI-VHB. Mientras que la IL-18 se comportó en forma similar en ambas poblaciones no encontrándose diferencia significativa alguna en ellas.

Los valores séricos de IL-12 e IL-18 no fueron evaluados en la población de urbanos venezolanos NI-VHB por insuficiencia de muestras séricas de esta población.

IV.3. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA ASINTOMÁTICA POR EL VHB.

Para este estudio se evaluaron 41 pacientes seleccionando dos poblaciones, una perteneciente a un área urbana (Maracaibo) considerada la segunda ciudad de Venezuela y la otra perteneciente a un área rural agreste, cuyos individuos tienen particularidades especiales en cuanto a su hábitat y patrones socio-culturales.

En la tabla 7 se refleja el análisis estadístico de la población estudiada, según su área de procedencia (rural o urbana). Se puede apreciar que las cohortes de pacientes comparten características demográficas en relación a la edad y sexo, lo que permitió el manejo homogéneo de la muestra.

Los grupos controles estuvieron constituidos por individuos no infectados por el VHB, pertenecientes a las mismas regiones de los pacientes afectados, similares también en edad y sexo.

Tabla 7. Características demográficas de pacientes con infección crónica asintomática por el VHB y grupos NI-VHB pertenecientes al entorno geográfico de Venezuela.

	Pacientes con infección crónica asintomática por el VHB		Grupo NI-VHB	
T (total de pacientes)	41		36	
Población	Indígenas	Urbanos	Indígenas NI-VHB	Urbanos NI-VHB
N/T (%)	20/41 (48.7) *	21/41 (51.2) *	20/36 (55.5) ‡	16/36 (44.4) ‡
Sexo (total) Varón/ Mujer	10/10 (50% / 50%)*	13 / 8 (61.7 % / 38.3)*	9 / 11 (45% / 55%)	9 / 7 (56.25%% / 43.75%)‡
Edad (años)	33.8±14.0	36.7±17.5	20.0±12.9	38.5±13.7
	35.3±2.0*		27.8±13.0 ‡	

N= numero de pacientes

Los valores de edad se representan como media ± desviación estándar

* Del total de pacientes con infección crónica por el VHB

‡ Del total de individuos NI-VHB

La población urbana venezolana cuenta con un adecuado nivel de vida, disponiendo de los servicios básicos, acceso a agua potable, correcta eliminación de excretas, viviendas con más de dos ambientes para una sola familia de aproximadamente 4-5 individuos, centros de salud y hospitales tipo IV, en los cuales se presta una adecuada atención en salud ya que cuentan con la infraestructura y suministros para tal fin, así como clínicas privadas con equipos de alta tecnología. La fuente de trabajo es diversa, derivada principalmente de la industria petrolera, agrícola y ganadera, por lo que esta población tiene un ingreso per capita que le permite una calidad de vida por encima de los estándares de la clase media. Es pertinente hacer referencia que la prevalencia de portadores del VHB es de aproximadamente el 3.2% (Silveira et al., 1999) en los individuos de ésta población.

Los Japreira o indígenas motivo de estudio son una subclase de otra etnia indígena (Yukpa), se caracterizan por ser altamente endogámicos, nómadas de asentamiento disperso con viviendas temporales, con tendencia a agruparse en pequeños caseríos en condiciones de hacinamiento por ser familias muy numerosas. Viven de la escasa cosecha, basada principalmente en tubérculos; la caza y la pesca son esporádicas, por lo que su alimentación es deficitaria en proteínas. Sus ingresos económicos dependen de trabajos esporádicos como peones o en labores domesticas en haciendas cercanas. Habitan en modestas viviendas construidas con palma y madera; carecen de servicios básicos y de infraestructura, tales como agua potable, disposición de aguas negras. No cuentan además con los servicios básicos de salud, sus enfermedades son atendidas por el curandero de la comunidad. Este aplica los conocimientos adquiridos de sus ancestros, que incluyen la preparación de bebidas y aplicación de compresas obtenidas de plantas consideradas medicinales. Sólo cuando estos bebedizos no dan el resultado esperado, acuden a un centro sanitario cercano, generalmente de pequeñas dimensiones y carentes de la infraestructura y los suministros básicos para una adecuada atención en salud. (Jaramillo O, 1987).

IV.3.1 Evaluación de citoquinas séricas en pacientes con infección crónica asintomática por el VHB y en individuos NI-VHB.

El análisis de los resultados que se presenta a continuación consiste en la comparación de los pacientes con infección crónica asintomática por el VHB con sus homólogos NI-VHB.

Diversos estudios se han llevado a cabo en la búsqueda por conocer el papel inmunológico de las citoquinas durante la infección por el VHB. Es evidente, la necesidad de evaluar este comportamiento en las diferentes fases de la infección. En este sentido, el análisis de las muestras obtenidas por venopunción refleja el comportamiento y distribución de los elementos del sistema inmune en condiciones fisiológicas y de enfermedad.

Por lo tanto, hemos considerado pertinente determinar las concentraciones séricas de IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 e IL-18, con el objeto de conocer el perfil inmunológico presente en el suero de pacientes con el VHB y controles no infectados por el virus perteneciente al entorno geográfico de Venezuela.

A fin de conocer si las poblaciones indígenas con infección crónica asintomática por el VHB presentan un estado de depresión funcional de la respuesta inmunitaria que pudiese determinar en ellos la elevada prevalencia de cronicidad por este virus, se evaluaron y compararon los niveles de citoquinas séricas en indígenas con el VHB y pacientes urbanos infectados igualmente con el VHB, comparando los resultados obtenidos en estas poblaciones con sus congéneres NI-VHB. Los valores se reflejan en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones séricas de citoquinas en pacientes con infección crónica asintomática por el VHB e individuos NI-VHB procedentes de Venezuela

	IL-2 pg/mL	IL-6 pg/mL	IL-10 pg/mL	IL-12 pg/mL	IL-18 pg/mL	TNF- α pg/mL	INF- γ pg/mL
Indígena con VHB	8,18 \pm 0,86	1,80 \pm 0.14	10,716 \pm 0.90	184,49 \pm 21,45	291,34 \pm 39,94	43,23 \pm 8,04	7,36 \pm 0.60
Urbano con VHB	11,12 \pm 0.99	1,09 \pm 0.03	12,76 \pm 0.54	294,62 \pm 23,45	327,06 \pm 34,78	31,82 \pm 6,43	5,54 \pm 0,78
Indígena NI-VHB	14,51 \pm 4.60	1,98 \pm 0.19	9,75 \pm 0.61	214,90 \pm 36,94	316,10 \pm 66,61	37,60 \pm 3,83	6,44 \pm 0,22
Urbano NI-VHB	8,70 \pm 0.91	0.70 \pm 1,06	5,80 \pm 0.17	N.D.	N.D.	6,02 \pm 0.21	11,85 \pm 0.13

Los valores representan media \pm desviación estándar

N.D.= No determinado.

En este contexto se presenta los resultados mediante gráficos de cajas (que representa el 75% de cada población) y bigotes (que representan el 25% de cada población) de los análisis realizados al comparar los valores obtenidos de cada una de las citoquinas en pacientes con VHB (20 pacientes indígenas, 21 pacientes igualmente portadores del VHB de población urbana) y sus respectivos homólogos NI-VHB.

IV.3.1.1. Evaluación de IL-2.

Los resultados obtenidos en la medición de IL-2 se aprecian en la figura 17 donde podemos observar el incremento significativo ($p < 0.05$) en la población de portador urbano con respecto a sus homólogos NI-VHB, así como en relación con los indígenas portadores. No se reflejan diferencias entre los indígenas portadores con sus homólogos NI-VHB.

Interleucina - 2

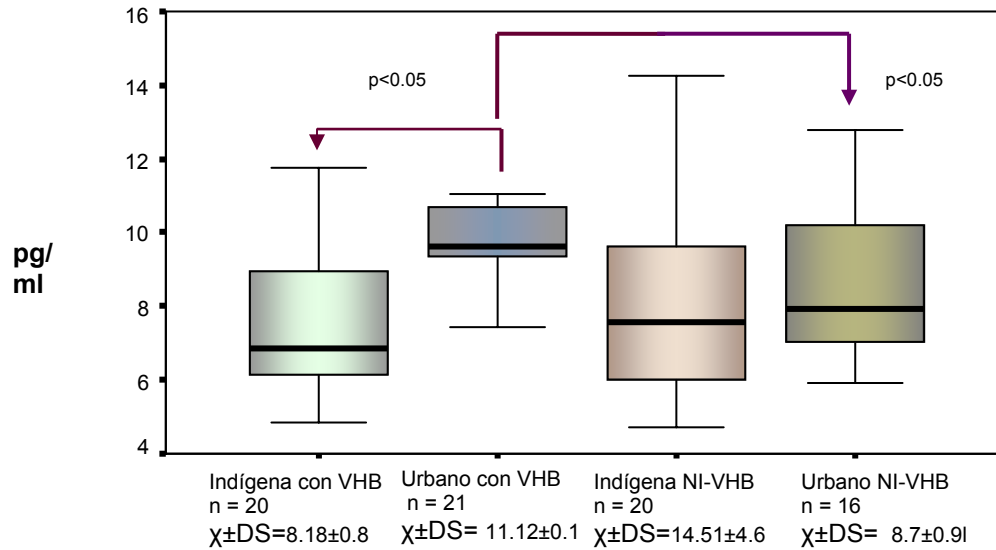


Figura 17. Distribución de los niveles de las concentraciones de IL-2 en las diferentes poblaciones estudiadas (Indígenas con VHB; Urbanos con VHB; Indígenas NI-VHB y Urbanos NI-VHB)

IV.3.1.2. Evaluación de IL-6

En el presente estudio, los indígenas asintomáticos presentaron un aumento significativo ($p < 0.0001$) al compararlos con los valores obtenidos en los urbanos portadores asintomáticos. Se indica también una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los urbanos portadores y sus homólogos no infectados. No se encontró diferencia significativa entre los indígenas portadores y sus homólogos no infectados.

Interleucina-6

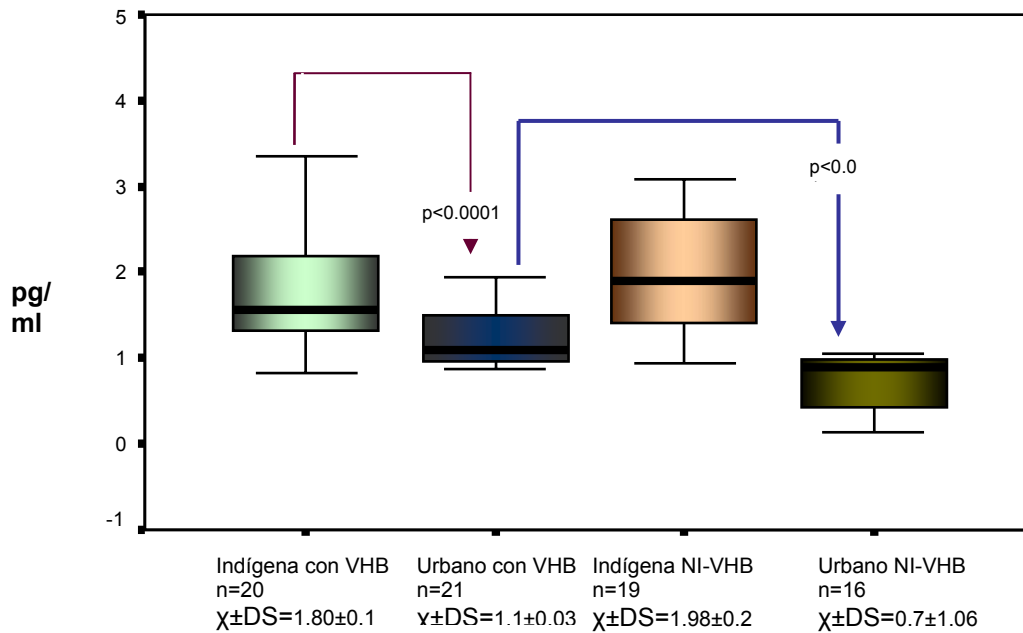


Figura 18. Distribución de los niveles de las concentraciones de Interleucina-6 en las poblaciones estudiadas (Indígena con VHB, Urbano con VHB, Indígena NI-VHB, Urbano NI-VHB).

IV.3.1.3. Evaluación de IL-10.

Los valores obtenidos en los niveles de IL-10 en urbanos infectados con virus B estuvieron incrementados significativamente ($p < 0.05$) en relación a sus respectivos testigos.

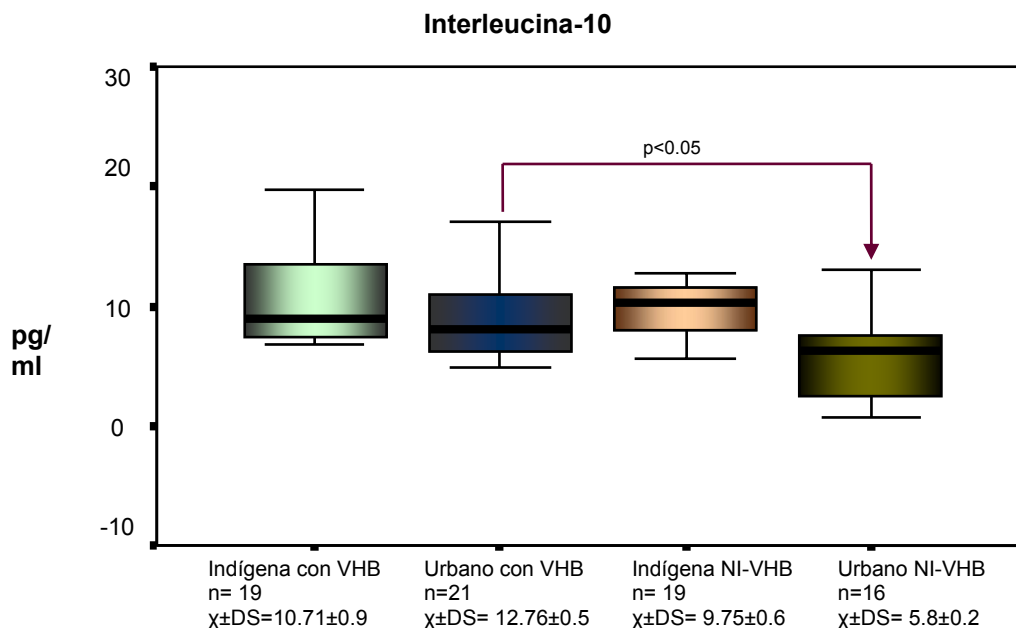


Figura 19. Distribución de los niveles de las concentraciones de interleucina-10 en las poblaciones estudiadas (Indígena con VHB, urbano con VHB, indígena y urbanos NI-VHB).

IV.3.1.4. Evaluación de IFN- γ

Los resultados encontrados indican una disminución significativa ($p < 0.0001$) en la población de urbanos con VHB con respecto a los urbanos NI-VHB. No se encontró diferencia significativamente estadística entre los indígenas con VHB frente a los indígenas no infectados y urbanos con VHB.

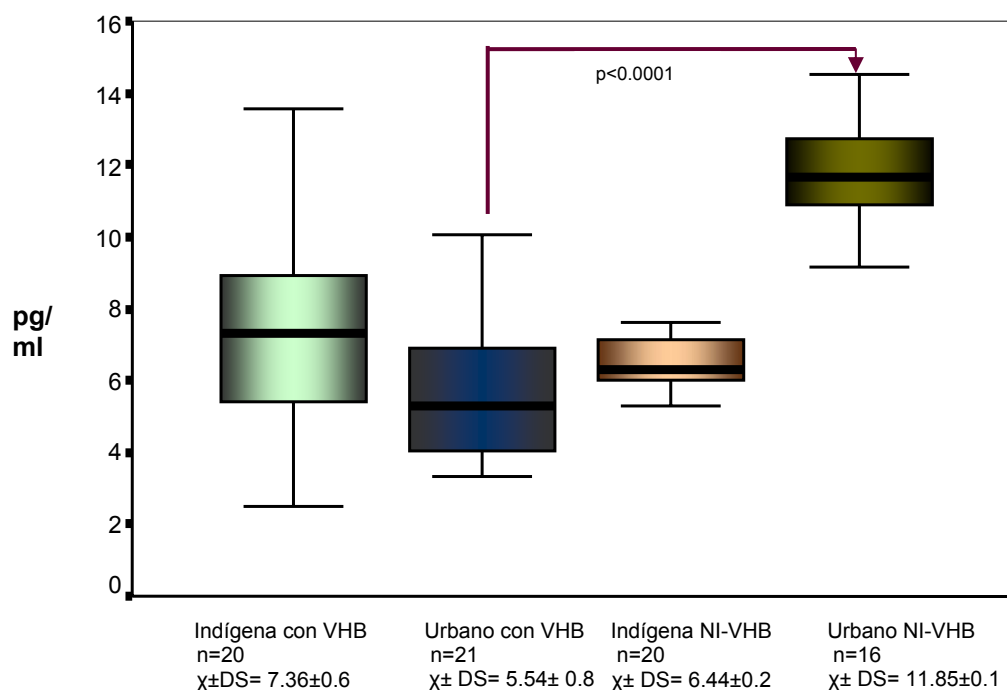
INF- γ 

Figura 20. Distribución de los niveles de las concentraciones de INF- γ en las poblaciones estudiadas. (Indígena con VHB, urbano con VHB, indígena y urbano NI-VHB).

IV.3.1.5. Evaluación de TNF- α .

A diferencia de los resultados obtenidos en relación a los niveles séricos del IFN- γ , estos valores estuvieron significativamente ($p < 0.0001$) incrementados en los urbano con VHB al compararlos con la población de urbanos NI-VHB (Figura 21).

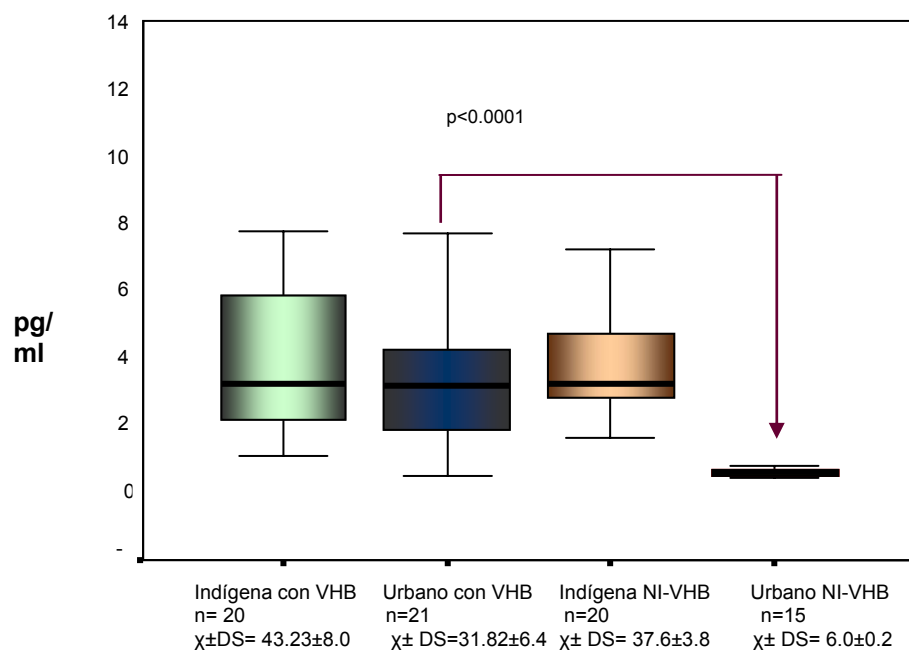
TNF- α 

Figura 21. Distribución de los niveles de las concentraciones de TNF- α en las poblaciones estudiadas. (Indígena con VHB, urbano con VHB, indígena y urbano NI-VHB).

IV.3.1.6. Evaluación de IL-12 e IL-18

El análisis de los valores séricos de estas citoquinas indica que no existen diferencias entre las poblaciones evaluadas del entorno geográfico venezolano. La población de urbanos NI-VHB no pudo ser evaluada para estas dos citoquinas por muestras insuficientes.

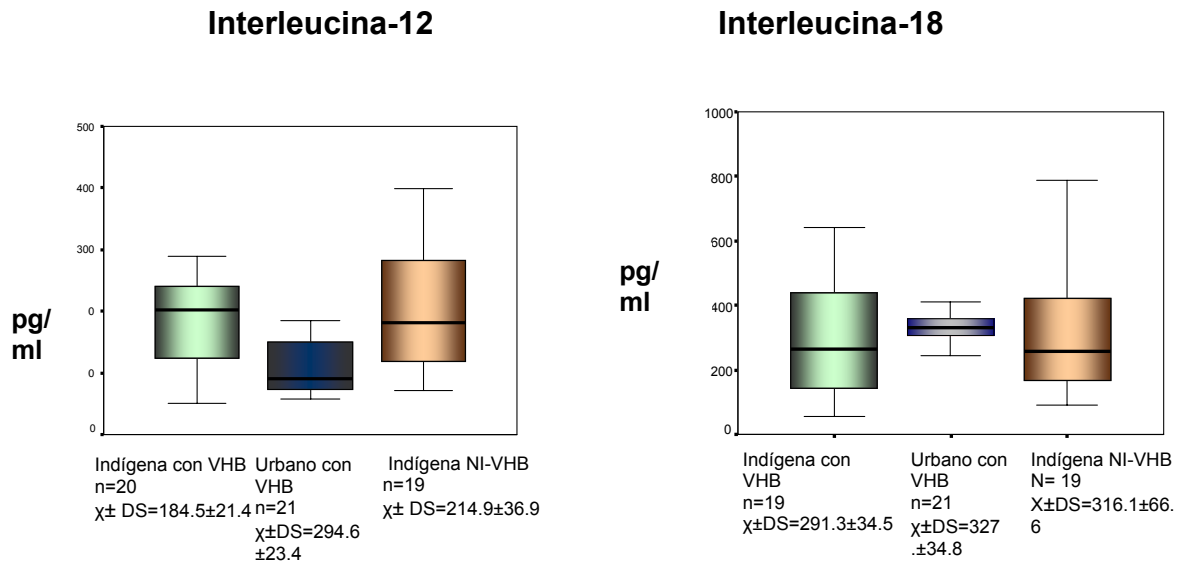


Figura 22. Distribución de los niveles de las concentraciones de IL-12 y de IL-18 en las poblaciones estudiadas. (Indígena con VHB, urbano con VHB, indígena NI-VHB).

IV.4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL PATRÓN DE CITOQUINA EN SUERO.

1. En los indígenas no infectados por el VHB predominó el fenotipo Th2: IL-6, IL-10 y TNF- α con disminución del IFN- γ .
2. En urbanos venezolanos no infectados la citoquina predominante es el IFN- γ del fenotipo Th1 con disminución de las citoquinas de alerta (IL-6, IL-10 y TNF- α).
3. En españoles NI-VHB se aprecia aumento significativo de la IL-6 con IL-2 (fenotipo Th1) no detectable e IL-10 disminuida.
4. En los portadores indígenas en relación a los indígenas NI-VHB, las citoquinas mostraron un comportamiento similar.
5. En los portadores urbanos venezolanos se presentan niveles séricos significativos de citoquinas inflamatorias (elevación de IL-6, IL-10 y TNF- α) y una marcada reducción del patrón Th1 (disminución de IFN- γ).

V. DISCUSIÓN

V.1. Individuos no infectados por el virus B

La integridad del sistema inmunitario humano depende de la presencia de cantidades adecuadas de células funcionalmente competentes, Estas células y sus productos secretados interactúan conformando una red compleja para proteger al individuo de los elementos nocivos para la salud. Uno de los parámetros, para determinar la suficiencia o no de la respuesta inmunitaria humoral y/o celular, es la detección de proteínas reguladoras denominadas citoquinas, las cuales presentan un comportamiento diferente en individuos sanos o enfermos.

En nuestros datos, originales a nivel mundial en poblaciones rurales venezolanas, se aprecia en los indígenas Japreira NI-VHB predominio del fenotipo Th2 (TNF- α , IL-6 e IL-10) con disminución del IFN- γ de origen linfocitario. Este comportamiento es contrario al observado en urbanos venezolanos NI-VHB. El aumento significativo de estas citoquinas (**Figuras 13-15**) en indígenas NI-VHB con respecto a los urbanos venezolanos podría deberse a factores exógenos como son los procesos infecciosos (parasitosis entre otros) (**Chacín B et al, 2000, 2001^{a,b}, 2006; Ferrer E et al, 2002; Marcano T et al, 2004**) que son frecuentes en el 90% (**Rivero Z et al, 2007**) de los indígenas Japreira, debido a sus condiciones de vida precaria desde el punto de vista de salud, socio-cultural y ambiental, en clara desventaja con las condiciones de vida de la población urbana venezolana. Algunos estudios indican la presencia de altos niveles de ciertas citoquinas (IL-10, IL-6 y TNF- α) en infecciones parasitarias (**Sharma M et al, 2005; Bansal D et al, 2005; Yeom JS et al, 2003; Maciorkowska E et al, 2005**) en concordancia con los resultados encontrados en la presente investigación. Sin embargo, establecer los efectos de este comportamiento en la respuesta inmunitaria ante procesos infecciosos y de otra índole requiere un mayor estudio.

El TNF- α es una citoquina de “alerta” junto con la IL-1 y la IL-6, y estimula la producción de proteínas de fase aguda (Streetz K et al, 2001; Kmiec Z, 2001). Es secretada en forma incrementada en procesos infecciosos e inflamatorios. Además, induce la secreción de IL-10, la cual inhibe el IFN- γ . Lógicamente, la disminución del TNF- α , apreciado en urbanos venezolanos NI-VHB sería responsable de una respuesta contraria a la expuesta. Estos aspectos son coincidentes con los conocimientos básicos de la Inmunología.

La disminución significativa del IFN- γ (Figura 15) en los indígenas NI-VHB podría afectar la generación de linfocitos Th1, activación de linfocitos T citotóxicos, alteración de la respuesta inmunitaria adquirida y de los mecanismos de defensa contra infecciones intracelulares. Sin embargo, niveles de IL-2, dentro de los límites controles tanto en indígenas como en los urbanos venezolanos, favorecen la respuesta inmunitaria antiviral y /o modula el desbalance existente. El aumento de la IL-10 en los indígenas NI-VHB, podría deberse al estímulo provocado por el incremento del TNF- α entre otros factores involucrados en la amplia red de citoquinas.

En este estudio el comportamiento del estado funcional inmune de los urbanos venezolanos NI-VHB permite inferir que su sistema inmunitario es capaz de controlar las infecciones intracelulares, como la provocada por el VHB, debido al predominio de proteínas reguladores del fenotipo Th1 (IFN- γ).

Al comparar españoles NI-VHB y urbanos venezolanos NI-VHB, se aprecia en el grupo europeo un aumento significativo de IL-6 (fenotipo Th2), una disminución evidente de IL-10, con cifras no detectables de IL-2. El aumento de la IL-6 puede potenciar los efectos de otras citoquinas (IL-1, TNF- α), estimulando la respuesta de fase aguda y la producción de anticuerpos de la clase IgG, al actuar en conjunto con IL-2, IL-4 e IFN- γ . Sin embargo, sus acciones no sustituyen la relevancia de IFN- γ y de la IL-2 participantes en la eliminación de patógenos intracelulares. El incremento de la IL-6 compensa el descenso cuantitativo del

TNF- α ; y la disminución de la IL-10 podría afectar la respuesta ante cualquier proceso inflamatorio inducido por agentes etiológicos diversos, lo cual ha sido demostrado en estudios realizados en niños con trastornos anémicos y deficiencia de Vitamina A (Leal Y, 2004; 2006) y en procesos asmáticos (Stelmach I et al, 2002; Matsumoto K et al, 2004)

En españoles es necesario tener en cuenta la prevalencia de diferentes procesos alérgicos, que podrían estimular citoquinas del fenotipo Th2 (IL-4) no cuantificada en el presente estudio, y que es inhibidora de IL-2 e IFN- γ . En la población española se ha demostrado que el 82% sufre de rinitis alérgica con un 56% de casos moderados a severos (Pereira C et al, 2006). Niveles incrementados de IL-4 han sido detectados durante este proceso alérgico (Klemens C et al, 2007; Fukushima A et al, 2006). Se considera que el polen de la grama y los ácaros del polvo son los aeroalérgenos relevantes. En Madrid, existe una estación de exposición al polen de grama de corta duración pero intenso, en la cual se libera el 79% de la carga de aeroalérgeno entre los meses de Mayo a Junio. Incluso la actividad alérgica ha sido detectada durante todo el año y no sólo durante la estación de mayor carga de polen (Cabrera M et al, 2002). Diversos estudios indican además, un incremento significativo de la IL-6 durante la rinitis alérgica, lo cual concuerda con los resultados encontrados en esta población (Zhang et al, 2004^{a,b} ; Velázquez B et al, 2004).

Al analizar en su contexto los resultados obtenidos, se puede inferir que en los españoles NI-VHB y sus contrapartes venezolanos (urbanos e indígenas) existe en el primer grupo niveles no detectables de IL-2 y predominio de IL-6 con disminución de la IL-10 y TNF- α y en los segundos aumento de IL-2 e IL-10 y TNF- α circulante y disminución de IL-6. El aumento observado de la IL-12 en los indígenas NI-VHB podría ser estimulado por la presencia de las infecciones parasitarias como ya se ha descrito anteriormente, la IL-12 es una citoquina que estimula la diferenciación del fenotipo Th0 hacia el fenotipo Th1 y regula negativamente el fenotipo Th2, promoviendo la inmunidad contra infecciones

parasitarias por protozoarios y helmintos (Pfaff A et al, 2003), y la sobrevivencia de nematodos intestinales en vivo en ausencia de IFN- γ (Helmbly H et al, 2003). En la población española las condiciones higiénicas sanitarias adecuadas llevan a la baja prevalencia de infecciones helmínticas lo que posiblemente origina la disminución de la citoquina evaluada.

Ante la presencia de valores séricos de citoquinas alterados en relación a los grupos NI-VHB es recomendable realizar, en investigaciones futuras, estudios funcionales del sistema inmunitario, ya que, los linfocitos y monocitos pueden ser secuestrados fuera de los vasos sanguíneos o no estar distribuidos en la sangre en la misma proporción que en otros órganos.

Las diferencias existentes en el comportamiento de las citoquinas séricas, entre los grupos urbanos e indígenas venezolanos y españoles NI-VHB, podrían ser debidas a:

- Características inmunogenéticas de los individuos estudiados: El polimorfismo de los nucleótidos de citoquinas pueden afectar su transcripción y expresión génica. Es predictor genético de la susceptibilidad a las enfermedades y de la evolución clínica (Kidd L et al, 2002; Amirzargar A et al, 2006; Wang J et al, 2006; Liaw J et al, 2006). La red de citoquinas es muy compleja, por sus efectos sinérgicos, antagonistas, redundantes y pleiotrópicos, así como también, por la interacción del sistema inmunitario con otros sistemas orgánicos.
- Tipo de alimentación: El tipo de alimentación en los españoles diferente al de los indígenas y urbanos venezolanos, como es el consumo de aceite de Oliva extravirgen y el vino blanco constitutivos de fenoles antioxidantes, podrían afectar la producción de citoquinas inflamatorias y ser responsables de la disminución del TNF- α tal como lo demuestran algunas investigaciones (Bertelli A et al, 2002; Raimund J et al, 2005). Para otros (Márquez M et al, 2007), las concentraciones de 100 μ M de los componentes de aceite de oliva (uvaol, eritrodol y acido oleanólico) reducen significativamente la producción de

TNF- α , mientras que 10 μ M de uvaol y ácido oleanólico la incrementan. Además, los autores referidos concluyen que los triterpenes pentacíclicos del aceite de oliva pueden exhibir propiedades pro y anti-inflamatorias dependiendo de su estructura química y la dosis empleada. En los indígenas su alimentación es en base a tubérculos y deficitaria en proteínas. De acuerdo a Leal y cols (2004) la desnutrición puede ser causal de un déficit en la secreción de citoquinas del fenotipo Th1.

- Ubicación geográfica: El presente estudio ha demostrado que existen variaciones en las concentraciones séricas de citoquinas en los grupos estudiados en los diferentes entornos geográficos (España y Venezuela), investigaciones en este sentido en otros países son indispensables para verificar esto.
- Tipo y tamaño del estímulo antigénico: Según Hetland y cols (2005) la liberación de las citoquinas podrían no ser atribuidas a parámetros químicos de las partículas del medio ambiente, Sin embargo, las partículas grandes más que las pequeñas estimulan la secreción de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- α (Jalava P et al, 2007). En la presente investigación estas variables referidas al estímulo antigénico no fueron individualizadas para su estudio.
- Estación del año: Myrianthefs y cols (2003) encuentran una disminución de la producción de IL-10 y de los receptores solubles del TNF- α , en sobrenadantes de cultivo de CMSP de humanos procedentes de un área urbana de Atenas, Grecia, durante la estación de otoño y de IL-10 durante el verano y el otoño, al compararla con el resto de las estaciones. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los españoles NI-VHB en cuanto a la disminución de IL-10 durante las estaciones de primavera y verano. Los

venezolanos NI-VHB fueron estudiados en verano y no se encontraron referencias bibliograficas mundiales comparativas en este aspecto.

- **Condiciones medioambientales y socioculturales:** Es importante el medio ambiente y su influencia sobre el sistema inmunitario ya que, en modelos murinos, se ha demostrado que el humo del cigarrillo afecta la respuesta inmunitaria antiviral primaria (IL-6 y TNF- α), mientras que la protección inmune secundaria se mantiene (Robbins C et al, 2006). En la población española se observa una exposición incrementada al cigarrillo, hábito este menos frecuente en los urbanos venezolanos y ausente completamente en los indígenas. Otros factores del medio ambiente y sociocultural son referidos en el contexto de la discusión.

V.2. Pacientes asintomáticos con infección crónica por VHB

En Venezuela alrededor del 2% de los adultos de la población general tiene el HBsAg del virus B presente en forma persistente en su sangre. La gran mayoría de ellos no presentan alteraciones hepáticas y por lo tanto son considerados portadores asintomáticos, no se sabe el porqué en la gran mayoría de las personas la infección viral desaparece pero en otras persiste en forma indefinida, se considera que ello se debe más a las peculiaridades de la respuesta inmunitaria de la persona afectada que a la cepa viral involucrada.

Los portadores asintomáticos del virus B por lo general no tienen lesión hepática pero se encuentran a riesgo de infectarse con el virus D o de presentar una reactivación de la infección, pasando nuevamente a la fase replicativa en forma espontánea o inducida. Igualmente se encuentran a riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma (Machado I et al, 1997). Cuando persiste la replicación viral se presenta un proceso necroinflamatorio progresivo llamado hepatitis crónica que produce con los años una fibrosis, regeneración nodular, cirrosis y hepatocarcinoma.

La mayoría de los investigadores han evaluado el desbalance Th1 y Th2 en la infección crónica por el VHB. Los análisis de los porcentajes de células Th0/Th1/Th2/Th3 en CMSP en diferentes fases de la infección crónica por el VHB es discutido (Jiang R et al, 2000; You et al, 2007). Diversos estudios han demostrado que la mayoría de células T CD4+ de individuos infectados crónicamente por el VHB fueron Th0 (Jiang R et al, 2002; You et al, 2007). Se considera que el fenotipo Th1 incrementa significativamente la actividad inflamatoria hepática en la hepatitis B crónica, mientras que las células Th2 pueden estar asociadas con la persistencia del virus (Lee M et al, 1999; Jiang R et al, 2002; Hyodo N et al, 2003). El cambio de Th0 a Th1 suele ocurrir durante la infección por el VHB, el predominio de las citoquinas Th1 incrementa la actividad de células NK, macrófagicas y de

linfocitos TCD8+ citotóxicos y al promover la respuesta inmune celular determinan el agravamiento del proceso inflamatorio hepático (Jiang R et al, 2002).

Machado (1997) expresa que con los avances tecnológicos, las evidencias demostraron que la interacción hospedero-VHB depende de las características genómicas del virus, capacidad de mutar durante la evolución de la infección crónica y las alteraciones de la red intermoleculares monocito-linfocitos T y proteínas virales. La intrincada red de citoquinas se comporta diferente dependiendo de las entidades clínico-patológicas y su estudio podría explicar los mecanismos inmunoregulatorios que participan en la infección crónica por el VHB.

Al evaluar los resultados de esta investigación se observa que los portadores asintomáticos del área urbana de Venezuela presentaron un incremento significativo de IL-2, IL-6, IL-10 y TNF- α al compararlos con sus homólogos no infectados. El aumento de la IL-2 aunque suficiente para controlar la infección, no llega a los límites inductores de una respuesta inmunitaria agresiva contra el hepatocito: es por ello que los niveles de aminotransferasas se mantienen dentro de los valores controles. La IL-2 es un factor que interviene en la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T. Se considera una de las citoquinas más importantes. Es producida por linfocitos T CD4 Th1, CD8+ y células "NK" actúa sinérgicamente con IL-12 induciendo la síntesis de IFN- γ por CMSP (Abbas et al, 2000; Joost J et al, 2002).

La IL-6 es una citoquina que actúa en la inmunidad innata y adquirida. Es producida por fagocitos mononucleares, linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales, entre otras. Estimula la síntesis de proteína de fase aguda por los hepatocitos, la proliferación de linfocitos T maduros y de células B para producir anticuerpos e incrementa la actividad de factores de crecimiento hematopoyético como el GM-CSF (Hernández U et al, 2001; Abbas A et al, 2000). En los urbanos se observa un incremento de la IL-6 durante la infección por el virus B, lo que indica

una eficiente participación en la estimulación de anticuerpos y proteínas de fase aguda, necesaria para el control de la infección.

Una vez revisados los aspectos conocidos de la IL-10 se puede indicar en este estudio que se encontraron niveles séricos aumentados significativamente de la citoquina en portadores urbanos venezolanos, a diferencia de lo indicado en su grupo testigo NI-VHB. Este comportamiento de la citoquina quizás se produzca para mantener bajo control la infección y las aminotransferasas normales, tal como se observó con relación a la IL-2. Recientemente se ha demostrado que la IL-10 normaliza los niveles de ALT sérica, mejora la histología y reduce la fibrosis hepática en el 63-86% de los pacientes con hepatitis C, que reciben tratamiento con la citoquina recombinante (**Dharancy S et al, 2001**).

Hyodo y cols (**2003**) señalan que la IL-10 juega un papel modulador antiviral contribuyendo no solo a la protección del daño hepático grave sino también en la persistencia de la infección por virus B, refiere que la IL-10 puede ser bifuncional en esta infección, participando en una fuerte respuesta celular antiviral en las fases tempranas de la infección o en la exacerbación aguda de la infección crónica y suprimiendo la respuesta en la fase de recuperación y en la infección crónica por virus B. Señalan estos investigadores que la sobreproducción de IL-10 podría provocar anergia de la célula T específica del HBsAg. La inducción de anergia puede ser un mecanismo inmunoregulador activo para prevenir la sobreestimulación de células T específicas del antígeno y limitan o controlan el daño hepatocelular en infección aguda (**Diepolder HM et al, 1996; Steinbrink D et al, 2002**). La incapacidad de los portadores crónicos a producir una eficiente respuesta a anticuerpos específicos contra el HBsAg está posiblemente relacionada a la no respuesta de células T (**Chisari FV et al 1995; Böcher WO et al, 1996; Vingerhoets J et al, 1998**).

El aumento de la IL-10 puede incrementar el sIL-2R, el cual al unirse a la IL-2 disminuye las concentraciones séricas de esta última y evita la unión de la IL-2

al receptor de membrana de alta afinidad (Alberti A et al, 1989; Tulek et al, 2000), esto podría regular los niveles elevados de la IL-2 en portadores urbanos. El aumento de la IL-10 en los portadores urbanos coincide con la disminución de IFN- γ en el mismo grupo.

Otra citoquina importante en la respuesta inmunitaria contra patógenos intracelulares es el IFN- γ , el cual sinergiza con TNF- α para controlar la proliferación viral a través de la inhibición de la expresión del gen del VHB. La mayoría de los estudios sobre IFN- γ en hepatitis B se han basado en la forma crónica de la infección (Jiang R et al, 2002; Hyodo N et al, 2003; Priimiagi L et al, 2003), utilizando cultivos de células o modelo murino (Naoko et al, 2003; Hyodo N et al, 2003). Machado (1997) indica que el portador crónico del HBsAg presenta compromiso funcional de su sistema inmunológico con hiporespuesta en CMSP hacia estímulos mitogénicos y antigénicos específicos, así como disminución de la producción de IFN- γ . A pesar de que la metodología utilizada y el tipo de muestra fue diferente, la afectación en la producción de la citoquina coincide con los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la disminución del IFN- γ en portadores urbanos al compararlos con sus homólogos no infectados por el virus.

En nuestro estudio (Figura 20) al observar los valores séricos del IFN- γ se aprecia que la disminución cuantitativa de esta citoquina coincide con el aumento de la IL-2 en portadores urbanos venezolanos en relación a su grupo control. La disminución significativa del IFN- γ en portadores asintomáticos urbanos podría perjudicar la evolución del individuo infectado, sobre todo teniendo en cuenta la importancia de la citoquina en la inhibición del gen del VHB y la eliminación de la partícula viral. Existen citoquinas que compensan tal deficiencia como el TNF- α y la IL-2 y otras inmunosupresoras como la IL-10 que podría ser determinante en esta disminución del IFN- γ . Biron y cols (1994) señalan que el IFN- γ puede participar en la defensa contra algunas, pero no en todas las infecciones virales. Recientes estudios sugieren que el balance en la producción de citoquinas es

determinante en la resolución o persistencia de la infección (Lee M et al, 1999; Jiang R et al, 2002; Szkaradkiewicz A et al, 2003; You J et al, 2007).

El **TNF- α** es la citoquina mediadora soluble de la inmunidad celular producida por macrófagos, células Th1, células Th2, y linfocitos T citotóxicos, células B y células NK en respuesta a una amplia variedad de estímulos, incluyendo agentes infecciosos. En pacientes con enfermedad hepática aguda y crónica por el VHB hay elevados niveles circulantes de ciertas citoquinas como: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ (Offner et al, 1990; Tilg H et al, 2006).

En el presente estudio, los portadores urbanos venezolanos presentaron un aumento significativo del TNF- α al comparar las cifras con los urbanos NI-VHB. Esto podría significar, considerando los estudios de Zhang W y cols (2002) que el VHB induce a los hepatocitos a producir TNF- α , seguido por el aumento de la IL-6 y del Factor Inhibidor de Macrófagos (MIF) inducido por TNF- α . Una vez liberado el MIF éste regula la acumulación de macrófagos a nivel hepático. Como ya se explicó con anterioridad el TNF- α , sinergiza con IFN- γ para controlar la proliferación viral a través de la inhibición del gen viral. En nuestro caso, la disminución de IFN- γ en los portadores urbanos venezolanos podría ser compensada con el aumento del TNF- α y la IL-2 para el control de la infección.

Al evaluar los resultados obtenidos en ambas poblaciones portadoras del virus (urbanos e indígenas venezolanos) se aprecia en los urbanos un incremento de la citoquina IL-2 (patrón Th1) y disminución de la citoquina proinflamatorias (IL-6), patrón este diferente al observado en los indígenas infectados. El aumento de la IL-2 junto al TNF- α podría inhibir la replicación de la partícula viral a través de sus acciones biológicas. En los indígenas portadores la normalidad de las citoquinas al compararlos con sus homólogos no infectados de las citoquinas proinflamatorias e inhibitoras del virus podría explicar el comportamiento de este grupo poblacional en relación a la mayor cronicidad que se ha estipulado en esta población (60%).

A diferencia de los individuos que pernotan en el área urbana de Venezuela, los indígenas NI-VHB como los que se infectan no presentaron diferencias significativas en los niveles de las citoquinas evaluadas (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ y TNF- α), ya que se mantiene el estímulo provocado por factores endógenos y exógenos ya referidos. Mientras que el urbano infectado que desarrolla la condición de portador, manifiesta predominio de las citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-10 y TNF- α) y una marcada reducción el patrón Th1 (disminución de IFN- γ). Debido a la participación de diferentes variables en la respuesta inmunitaria ante la presencia del virus se necesitan estudios funcionales (CMSP estimuladas o no con mitógenos) que podría aportar mayor información y corroborar los resultados obtenidos.

VI. CONCLUSIONES

De este estudio de análisis de los niveles séricos de las citoquinas (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- γ) en individuos infectados por el virus de la hepatitis B del medio rural y urbano venezolano y de sujetos españoles libres de esta infección se concluye que:

1. Diferencias en la ubicación geográfica y en los factores medioambientales y socioculturales se asocian a distintos patrones de concentraciones séricas de citoquinas circulantes. En los individuos NI-VHB se observó: a) predominio de un patrón inflamatorio de citoquinas circulantes (elevación de IL-6- IL-10, IL-12 y TNF- α) en los indígenas, b) predominio de un patrón Th1 (elevación de IFN- γ) en los urbanos venezolanos, y c) reducción de las proteínas reguladoras en los españoles.
2. El impacto de la infección crónica por el virus B de la hepatitis se asocia a un patrón diferente de las concentraciones séricas de citoquinas en pacientes indígenas o urbanos venezolanos
3. En el medio urbano, la infección por el virus B de la hepatitis se asocia a mayores cifras séricas de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-10 y TNF- α) y a una marcada reducción el patrón Th1 (disminución de IFN- γ). Por el contrario en los pacientes rurales no se observa un cambio significativo en las cifras de las citoquinas circulantes.

Por lo tanto, existen factores exógenos que condicionan el estado funcional del sistema inmune de los sujetos sanos y de los que presentan evidencia de una infección crónica, lo que determina que los márgenes de normalidad en las variables analíticas inmunológicas deben adaptarse a las poblaciones objetos de estudio.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J, editores. Citoquinas. En: *Inmunología Celular y Molecular*. Editora Interamericana McGraw-Hill. 4º Ed. Mexico 2000. pp 276-307.
2. Aguzzi A, Heikenwalder M. Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity* 2005; 22:145-54.
3. Akuta N, Susuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Susuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis virus genotype on the development of lamivudine resistance during long term treatment. *J hepatol* 2003;38: 315-21.
4. Al-W, Mansour AJ, Syed R. Cytokine profile of viral and auto immune chronic active hepatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 902-8.
5. Alamillos OP, Failde MI. The prevalence of serological markers of the hepatitis B virus in the hospital and primary health care workers of the Jerez area (Cadiz). *Aten Primaria* 1999; 15; 23:212-7.
6. Alberti A, Chemello L, Fattovich G, Pontisso P, Semenzato G, Colletta C, Vinante F, Pizzolo G. Serum levels of soluble interleukin-2 receptors in acute and chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sc* 1989; 34:1559-63.
7. Álvarez M, Oyonarte S, Rodríguez PM, Hernández JM. Estimated risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain. *Transfusion* 2002; 42:994-8.
8. Amirzargar A, Sadeghi M, Khosravi F, Dianat S, Naroueynejad M, Nicknam M, Hatmi N, Ansaripour B, Moradi B, Nikbin B. Th1 and Th2 cytokine gene polymorphisms in two indigenous ethnic groups in Iran. *Int J Immunogenet* 2006; 33: 429-37.
9. Arie J.Z. Hepatitis Viruses: Hepatitis B. disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/books (citado en Feb 12 de 2007).
10. Atkins M, Nolan M. Sexual transmission of hepatitis B. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18:67-72.
11. Ayada M, Ishikawa T, Okumura A, Tanabe J, Ito H, Ohashi T, Matsumoto E, Sato K, Hotta N, Fukuzawa Y, Kakumu S. Alteration of serum cytokine balances among different phases of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2006; 34:214-21.
12. Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol.* 2005; 27:37-43.
13. Becker S, Dailey LA, Soukup JM, Grambow SC, Devlin RB, Huang YC. Seasonal Variations in air pollution particle-induced inflammatory Mediator Release and Oxidative Stress. *Environ Health Perspect* 2005; 113:1032-8.
14. Beker B, Beker S. El Laboratorio en el diagnóstico, evaluación y seguimiento de las hepatitis vírales. *Gen* 1997; 51: 94-109.
15. Bertelli A, Migliori M, Bertelli AA, Origlia N, Filippi C, Panichi V, Falchi M, Giovannini L. Effect of some white wine phenols in preventing inflammatory cytokine release. *Drugs Exp Clin Res* 2002; 28:11-5.
16. Bilski B, Wysocki J. Epidemiology of viral hepatitis cases, types B and C, transmitted from carriers-health service workers to patients. Is it still a "no problem". *Med Pr* 2005; 56:491-4.
17. Blitz L, Monsalve F, Atencio R, Monzón M, Favorov MO, Fields HA, Echevarria JM. Serological survey of markers of infection with viral hepatitis among the Yukpa Amerindians from western Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol* 1996; 90: 655-7.

18. Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, Costa L, Monsalve DC, Torres JR, Fields HA, Lambert S, Van GC, Norder H, Magnius LO, Echevarría JM, Stuyver L. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998; 36:648-51.
19. Blumberg BS. Polymorphism of serum proteins and the development of isoprecipitines in transfused patients. *Bull N Y Acad Med* 1964; 40: 377.
20. Böcher, W. Herzog-Hauff, S. Herr, W. Heerman, K. Gerken, G. Meyer, K. Löhr, H. Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*. 1996; 105: 52-8.
21. Bond WW, Favero MS, Petersen JJ, Ebert JW. Inactivation hepatitis B virus by intermediate to high level disinfectant chemicals. *J Clin Microbiol* 1983; 535-8.
22. Bourliere M. Transmission of hepatitis B and C viruses from caregiver to patients: myths and reality. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27:291-3.
23. Boxall EH, Sira J, Standish RA, Davies P, Sleight E, Dhillon AP, Schever PJ, Kelly DA. Natural history of hepatitis B in perinatally infected carriers. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89:456-60.
24. Bracho MA, Gosalbes MJ, González F, Moya A, González-CF. Molecular epidemiology and evolution in an outbreak of fulminant hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1288-94.
25. Bruguera M, Forns X. Epidemiología actual de las hepatitis virales: ¿quién las padece y quién puede protegerse? *Enf Inf Microbiol Clin* 2004; 22:443-7.
26. Burdick RA, Bragg-Gresham JL, Woods JD, Hedderwick SA, Kurokawa K, Combe C, Saito A, LaBrecque J, Port FK, Young EW. Patterns of hepatitis B prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. *Kidney Int* 2003; 63:2222-9.
27. Buster EH, Van der Eijk AA, De Man RA, Schalm SW. Doctor-to-patient transmission of hepatitis B virus: the potential of antiviral therapy for prevention. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2004; 45-9.
28. Cabrera M, Martínez-CC, Fernández-CE, Carnes SJ, Boluda L, Tejada J, Subiza JL, Subiza J, Jerez M. *Trisetum paniceum* (wild oats) pollen counts and aeroallergens in the ambient air of Madrid, Spain. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128:123-9.
29. Cardona N, Garzazo D, Loureiro C, González K, García D, Pacheco M, Botto C, Pujol F. Dificultades para el diagnóstico serológico de las hepatitis virales B y C en población indígena venezolana. En: **VIII Congreso Venezolano de Microbiología. 50 años de la SVM, Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Metropolitano.** Nov 1-14 2004. Caracas, Venezuela. Pg.1-7
30. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2:588-91.
31. Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1997; 71: 3236-43.

32. Chacín-BL, Panunzio AP, Monsalve-CF, Parra-CE, Martínez R. Microsporidiosis in Venezuela: Prevalence of intestinal microsporidiosis and its contribution to diarrhea in a group of human immunodeficiency virus-infected patients from Zulia State. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 482-6.
33. Chacín-BL, Sánchez-CY. Intestinal parasitic infections, with a special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:347-52.
34. ^aChacín-BL, Estévez J, Monsalve F, Quijada L. *Cyclospora cayentanensis* infections among diarrheal patients from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 351-4.
35. ^bChacín-BL, Sanchez Y, Monsalve F, Estevez J. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in Amerindians from western Venezuela. *Am J Top Med Hyg* 2001; 65:131-5.
36. Chakravarti A, Rawat D, Jain M. A study on the perinatal transmission of the hepatitis B virus. *Indian J Med Microbiol* 2005;23:128-30
37. Chan HL Sung JJ. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2006; 26:153-61.
38. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shaw WY, Chen DC. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood hepatoma study group. *N Engl J Med* 1997; 336:1855-9.
39. Che-Kin Hiu, George KK. Immune system and hepatitis B virus infection. *J Clin Virol*. 2005; 34:S44-8.
40. Chen HL, Chang CJ, Kong MI, Huang FC, Lee HC, Liu CC, Lee IH, Wu TC, Wu SF, Ni YH, Hsu HY, Chen DS, Chang MH. Pediatric fulminant hepatic failure in endemic areas of hepatitis B infection 15 years after universal hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004; 39: 58-63.
41. Chen Y, We H, Gao B, Hu Z, Zheng S, tian Z. Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: an underinvestigated innate immune response. *J Viral Hepat*. 2005; 12: 38-45.
42. Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, Lee JE, Hahm KB, Jim JK. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1163-9
43. Chisari F. Viruses, immunity and cancer: Lesson from hepatitis B. *Am J Pathol* 2000; 156: 1117-32.
44. Chisari, F. Ferrari,C. Hepatitis B virus Immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
45. Chu CJ and Lok ASF. Clinical significance of hepatitis B genotypes. *Hepatology* 2002; 35:922-9.
46. Chun-JL, Shyh-Ch L, Jia-HK, Ping-TT, Ming-YL, Yen-HN, Shiou-HY, Pei-JC, Ding-Sh C. Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. *J Hepatol* 2006; 44:39-46.
47. Cora M, Álvaro Vila. Hepatitis B. Disponible en: www.sitiomedico.com (citado en Oct 15 de 2004).
48. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38:158-68.

49. De Paula VS, Arruda ME, Vitral CL, Gaspar AM. Seroprevalence of Viral Hepatitis in Riverine Communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001; 96: 1123-8.
50. Debnath CR, Alam K, Sarker CB, Rahman S, Ahmad N, Rahman S, Khan GK, Sutradhar SR, Miah MT. Serum IL-2 in chronic hepatitis B virus infected patients and its association with disease activity. **Mymensingh Med J** 2005; 14:125-7.
51. Dehesa MV, Nunez RN. Epidemiology of hepatitis virus B and C. **Arch Med Res** 2007; 38:606-11. Review.
52. Delgado A, Echevarría JM, Rega LP. Serología de las hepatitis vírales en Procedimientos en microbiología clínica. Disponible en: <http://aidsmeds.com/espanol> (citado en Oct 25 de 2006).
53. Desfilis SM. Virus de la hepatitis B. 2006 Control Calidad SEIMC. Disponible en: www.seimc.org/control (citado en Feb 14 de 2007).
54. Devesa, M. y Pujol, F. Hepatitis B genetic diversity in Latin American. **Virus Res** 2007; 127:177-84.
55. Dharancy S, Conti F, Desreumaux P, Paris JC, Calmus Y. Cytokine imbalance during hepatitis C virus infection. Consequences on the pathophysiology of hepatic lesions. **Gastroenterol Clin Biol** 2001; 25: 595-604.
56. Diamond C, Thiede H, Perdue T, Secura GM, Valleroy L, Mackellar D, Corey L, Seattle Y Men's ST Viral hepatitis among young men who have sex with men: prevalence, risk behaviors, and vaccination. **Sex Transm Dis** 2003; 30:425-32.
57. Diel R, Helle J, Gottschalk R. Transmission of hepatitis B in Hamburg, Germany, 1998-2002: a prospective, population-based study. **Med Microbiol Immunol (Berl)** 2005; 194:193-9.
58. Diepolder HM, Jung MC, Wierenga E, Hoffmann RM, Zachoval R, Gerlach TJ, Scholz S, Pape GR. Anergic TH1 clones specific for hepatitis B virus (HBV) core peptides are inhibitory to other HBV core-specific CD4 T cells in vitro. **J Virol** 1996; 70: 7540-8.
59. Domínguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salleras L. Change in the seroepidemiology of hepatitis B infection in Catalonia, 1989-1996. **Vaccine** 2000; 18:2345-50.
60. Echevarría JM, León P. Epidemiology of viruses causing chronic hepatitis among populations from the Amazon Basin and related ecosystems. **Cad Saúde Pública** 2003; 19:1583-91. Review.
61. Echevarría JM, León P. Hepatitis B virus genotype identified by Line Probe Assay (LiPA) among chronic carriers from Spain. **Enf Inf Microbiol Clin** 2004; 22:452-4.
62. Echevarría JM. Correct use and meaning of the term "chronic hepatitis B carrier" in the scientific literature and medical practice. **Enf Inf Microbiol Clin** 2004; 22:306-7.
63. Echevarría JM., Blitz L, Pujol F. La Infección por los virus causantes de Hepatitis en Poblaciones Indígenas de Suramérica: Una Revisión del problema. **Invest Clin** 1996; 37: 191-200.
64. Echeverría JM. Etiología y patogenia de las hepatitis víricas. **Enf Inf Microbiol Clin**. 2006; 24: 45-56.
65. El-Zaatari M, Kazma H, Navoulsi-Majzoub M, Haidar M, Ramlawi F, Mahfoud Z, Ramia S. Hepatitis B virus DNA in serum of 'anti-HBc only' -positive healthy Lebanese blood donors: significance and possible implications. **J Hosp Infect** 2007; 66: 278-82.

66. Erhardt A, Blondin D, hauck K, Sagir A, Kohnie T, heintges T, haussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54:1009-13.
67. Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M, Zingariello P, Mancino P, Petrarca C. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36:144-50.
68. ^aFattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23:47-58.
69. ^bFattovich G. Natural history of hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39:50-8.
70. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 36-42.
71. Ferrari C, Penna A, Bertolotti A, Valli A, Antoni A, Giuberti T, Cavalli A, Petit M. Cellular Immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1990; 145:3442-9.
72. Ferrer E, Cortez MM, Pérez H, De la Rosa M, De Noya BA, D' Ávila I, Harrison LJ, Foster-CM, Parkhouse RM, Cabrera A. Serological evidence for recent exposure to *Taenia solium* in Venezuelan Amerindians. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 170-4.
73. Fouche A, Crewe RM, Windsor IM, and Karim SS. Persistence of hepatitis B antigen in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1990;27:697-700
74. Friedt M, Gerner P, Lausch E, Trubel H, Zabel B, Wirth S. Mutations in the basic core promotor and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999 ;29:1252-8.
75. Friedt M, Gerner P, Wintermeyer P, Wirth S. Complete hepatitis B virus genome analysis in HBsAg positive mothers and their infants with fulminant hepatitis B. *BMC Gastroenterol* 2004; 8: 4-11.
76. Fukushima a, Yamaguchi T, Fukuda K, Sumi T, Kumagai N, Nishida T, Imai S, Ueno H. CD8+ T cell play disparate roles in the induction and the effector phases of murine experimental allergic conjunctivitis. *Microbiol Immunol.* 2006; 50:719-28.
77. Ghoda MK, Shah RA. A prospective epidemiological study to see if mosquito bite could be responsible for spread of hepatitis B virus infection. *Trop Gastroenterol* 2005; 26:29-30.
78. Ghosh K, Joshi SH, Shetty S, Pawar A, Chipkar S, Pujari V, Madkaikar M, Pathare AV, Jijina F, Mohanty D. Transfusion transmitted diseases in hemophilic from western India. *Indian J Med Res* 2000; 112:61-4.
79. Góra-Gebka M, Liberek A, Szydłowska-Łysiak W, Bako W, Korzon M. Serum interleukin 6 and interleukin 12 levels in children with chronic hepatitis HBV treated with interferon alpha. *Ann Hepatol.* 2003; 2:92-7.
80. Gibbons A. The peopling of the Americas. *Science.* 1996; 274: 31-3.
81. Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 7-12
82. Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 2002; 20: 80-2.
83. Harling R, Turbitt D, Millar M, Ushiro-Lumb I, Lacey S, Xavier G, Pope J, Ijaz S, Teo C-G. Passage from India: an outbreak of hepatitis B linked to a patient who acquired infection from health care overseas. *Public Health* 2007; 121:734-41.

84. Hasegawa I, Tanaka Y, Kurbanov F, Yoshihara N, El-Gohary A, Lyamuya E. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in the United Republic of Tanzania. *J Med Virol* 2006; 78:1035-42.
85. Helmy H, Grecis RK. IFN-gamma-independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection. *J Immunol*. 2003; 171: 3691-6.
86. Hernández UM, Alvarado NA. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 2001; 12: 272-80.
87. Hetland RB, Cassee FR, Lag M, Refsnes M, Dybing E, Schwarze PE. Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: Heterogeneity in relation to size, city and season. *Part Fibre Toxicology* 2005; 2:4.
88. Huang ZM, Huang QW, Qin YQ, Huang CH, Qin HJ, Zhou YN, Xu X, Lu CL. Clinical characteristics and distribution of hepatitis B virus genotypes in Guangxi Zhuang population. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6525-9.
89. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005; 7: 521-31 Review.
90. Huo TI, Wu JC, Wu SI, Chang AL, Lin SK, Pan CH, Huang YH, Chang FY, Lee SD. Changing Seroepidemiology of hepatitis B, C, and D virus infections in high-risk populations. *J Med Virol* 2004; 72:41-5.
91. Hyodo N, Tajimi M, Ugajin T, Nakamura I, Imawari M. Frequencies of interferon- γ and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2003; 27: 109-16.
92. Iitsuka T, Nagata I, Kanzaki S. Clinical study of fulminant hepatitis B in infants caused by mother-to-infant infection. *Nippon Rinsho* 2004; 62:274-9.
93. Jalava PI, Solonen RO, Pennanen AD, Sillampaa M, Halinen AI, Happonen MS, Hillamo R, Brunekreef B, Katsouyanni K, Sunyer J, Hirvonen MR. Heterogeneities in inflammatory and cytotoxic responses of RAW 264.7 macrophage cell line to urban air coarse, fine, and ultrafine particles from six European sampling campaigns. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 213-25.
94. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 3435-85.
95. Jaramillo OG. Los Yuko-Yukpa. En: Introducción a la Colombia Amerindia. Editorial Presencia. Tomo II. Bogotá. 1987.
96. Jiang R, Lu Q, Hou J. Polarized populations of T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2000; 80: 741-4.
97. Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J* 2002; 115: 422-4.
98. Joost J, Oppenheim MD, Francis W.R. Citocinas. En: Introducción a la Inmunología Humana. Editorial Médica Panamericana. 5ª ed. 2000. Caracas. p 165-92.
99. Jung MC and Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2:43-50. Review.
100. Kane M. Status of hepatitis B immunization programmes in 1998. *Vaccine* 1998; 16:104-8.
101. Kao JH, Hsu HM, Sau WY, Chang MH, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination and the decreased mortality from fulminant hepatitis in infants in Taiwan. *J Pediatr* 2001; 139:349-52.
102. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 82: 1267-80. Review.

103. Klemens C, Rasp G, Jund F, Hilgert E, Devens C, Pfrogner E, Kramer MF. Mediators and cytokines in allergic and viral-triggered rhinitis. **Allergy Asthma Proc.** 2007; 28:434-41.
104. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. **Adv Anat Embryol Cell Biol** 2001;161:1-151
105. Kondili L.A, Genovese D, Argentini C, Chionne P, Toscani, Fabro R, Cocconi R, Rapicetta M. Nosocomial transmission in simultaneous outbreaks of hepatitis C and B virus infections in a hemodialysis center. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2006; 25: 527-31.
106. Kong L, Yao SK, Liu JX, Wang N. The prognostic values of cellular immunity function in patients with hepatocellular carcinoma. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi** 2005; 13:194-7.
107. Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. **Vaccine** 2005; 3:2409-23.
108. Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, Ndemi N, Ngansop C, Kaptue L, Miura T, Ido E, Hayami M, Ichimura H, Mizokami M. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. **J Gen Virol** 2005; 86:2047-56.
109. Lai C, Ratziu V, Yuen M, Poynard T. Viral hepatitis B. **Lancet** 2003;362: 2089-94.
110. Langar H, Triki H, Gouider E, Bahri O, Djebbi A, Sadraoui A, Hafsia A, Hafsia R. Blood-transmitted viral infections among hemophiliacs in Tunisia. **Transfus Clin Biol** 2005; 12:301-5.
111. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures: a review. **J Viral Hepat** 2004; 11:97-107.
112. Leal JY, Castejón HV, Romero T, Ortega P, Gómez G, Amaya D, Estévez J. Serum values of cytokines in children with vitamin A deficiency disorders. **Invest Clin** 2004; 45:243-56.
113. Leal JY, Castejón HV, Romero T, Ortega P, Gómez G, Amaya D, Estévez J. Serum levels of interferon-gamma and interleukine-10 in anemic children with vitamin A deficiency. **Arch Latinoam Nutr** 2006; 56:329-34.
114. Lee M, MyungAe L, Sung K, Minsik S, Sung-Won C, Sun P, Hyung-II K. Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. **J Korean Med Sci** 1999; 14:175-81.
115. León P, Venegas E, Bengoechea L, Rojas E, López JA, Elola C y Echevarría JM. Prevalencia de las infecciones por virus de las hepatitis B, C, D y E en Bolivia. **Rev Panam Salud Publica** 1999; 5: 144-51.
116. Liang T.J, Blum H.E, Wands J.R. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B serological markers. **Hepatology** 1990; 12:204-12.
117. Liang XF, Chen YS, Wang XJ, He X, Chen LJ, Wang J. A study on the sero-epidemiology of hepatitis B in Chinese population aged over 3-years old. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.** 2005; 26:655-8
118. Liaw YF, Sollano JD. Factors influencing liver disease progression in chronic hepatitis B. **Liver Int** 2006; 26 :23-9
119. Lin HH, Wang LY, Hu CT, Huang SC, Huang LC, Lin SS, Chiang YM, Liu TT, Chen CL. Decline of hepatitis B carrier rate in vaccinated and unvaccinated subjects: sixteen years after newborn vaccination program in Taiwan. **J Med Virol** 2003; 69:471-4.

120. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of Hepatitis B 2000, Summary of a Workshop. **Gastroenterology** 2001; 120:1828-1853.
121. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. **Hepatology** 2007; 45:507-33.
122. López L, López P, Aragon A, Rodríguez I, López J, Lima E, Insagaray J, Bentancor N. Risk factors for hepatitis B and C in multi-transfused patients in Uruguay. **J Clin Virol** 2005; 34 2:69-74.
123. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. **Ann Rev Immunol**. 2006; 24:657-79.
124. Maciorkowska E, Daczmariski M, Kemon A. the role of cytokines in giardiasis in children. **Med Wieku Rozwo**. 2005; 9:665-73.
125. Machado IB, Deibis L, Toro F. Respuesta Inmunológica en hepatitis viral. **Gen** 1997; 51: 85-93.
126. Machado IB. Avances en Hepatitis B. Intediagnost HV. Disponible en: www.intediagnost.com (citado en Ag 23 de 2006)
127. Man-FY, Sablon E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Doutrloigne J, Yuan HJ, Wong DK, Sum SM, Lai ChiL. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hon Kong. **J Hepatol** 2004: 119-25.
128. Mann DR, Akinbami MA, Gould KG, Ansari AA. Seasonal variations in cytokine expression and cell-mediated immunity in male rhesus monkeys. **Cell Immunol** 2000; 200: 105-15.
129. Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura JR. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. **Men Inst Oswaldo Cruz** 2004; 99:369-76.
130. Márquez-MA, Puerta RD, Fernández-AA, Ruiz-Gutierrez V, Yaqoob P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. **Cytokine** 2007; 36: 211 -7.
131. Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Tsuda M, Ikegami T, Kibe A, Yoshiura Y, Nakanishi Y. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. **Int Arch Allergy Immunol** 2004; 134: 295-302.
132. Meyer U, Chuard C, Regamey C. Occupational exposures with risk of transmission of HIV, HBC and HCV in health care workers. **Rev Med Suisse** 2005; 12; 1: 2327-31.
133. Minuk G.Y. Hepatitis B Viral Mutants and their Relevance to the Health Care System. **Can Comm Dis Report** 2001; 27; S3.
134. Monsalve FC, Romero TA, Estevez J, Costa L, Atencio R, Porto L, Callejas D. Concentrations of Cytokines, Soluble Interleukin-2 Receptor, and Soluble CD30 in Sera of Patients with hepatitis B Virus Infection during Acute and Convalescent Phases. **Clin Diagn Lab Immunol** 2002; 9:1372-5.
135. Morales, NC. Hepatitis víricas. Disponible en: <http://www.monografias.com/> (citado en feb 12 de 2007).
136. Moreno D, Alegre F, García-González N. Virology, epidemiology and transmission mechanisms of hepatitis B virus. **Ann Sist Sanit Navar** 2004; 27:7-16. Review.
137. Motta AR, Martins R, Yoshida C, Teles SA, Paniago AM, Lima K, Gómez S. Hepatitis B virus infection in isolated Afro-brazilian communities. **J Med Virol** 2005; 77:188-93.

138. Motta AR, Yoshida C, Lemos E, Oliveira JM, Cunha RV, Lewis XL, Cabellos PH, Lima K, Martins R. Seroprevalence of hepatitis B virus infection among an Afro-descendant community in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:13-7.
139. Msuya SE, Mbizvo EM, Hussain A, Sam NE, Stray-Pedersen B. Seroprevalence of hepatitis B and C viruses among women of childbearing age in Moshi Urban, Tanzania. *East Afr Med J* 2006; 83:91-4.
140. Murria R Die Fenbach WC. Effect of heat on the agent of homologous serum hepatitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84: 320-31.
141. Myrianthefs P, Karatzas S, Venetsanou K, Grouzi E, Evagelopoulou P, Boutzouka E, Fildissis G, Spiliotopoulou I, Baltopoulos G. Seasonal variation in whole blood cytokine production after LPS stimulation in normal individuals. *Cytokine* 2003; 24:286-92.
142. Naoko, H. Morihiro, T. Takuhiro, U. Ikuo, Nakamura. Michio, I. frequencies of interferon- γ and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepato Res* 2003; 27:109-16.
143. Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirol* 1999;42:100-16
144. Ni YH, Chang MH, Huang LM, Chen HL, Hsu HY, Chiu TY, Tsai KS, Chen DS. Hepatitis B virus infection in children and adolescents in a hyperendemic area: 15 year after mass hepatitis B vaccination. *Ann Intern Med* 2001; 135:796-800.
145. Norder H Courouce AM Coursaget P, Echevarría JM, Lee S-D, Mushahwar I, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes. *Intervirol* 2004; 47:289-309.
146. Núñez M, García-Samaniego J, Soriano V. Avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B. Formación médica continuada. *Enf Inf Microbiol Clín*. 2004: 539-50.
147. Offner F, Philippé J, Vogelaers D, Colardyn F, Baele G, Baudrihayé M, Vermeulen A, Leroux-Roels G. Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. *J Lab Clin Med* 1990; 116:100-5.
148. Parana R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin America. *J Clin Virol* 2005; 34:S130-3.
149. Patlak M, Blumberg B, Hilleman M, Rutter W. La historia de la hepatitis B. disponible en:<http://www7.nationalacademies.org/spanis> (citado en Ag 9 de 2006).
150. Pawlowska M, Halota W, Smukalska E, Grabczewska E. Serum IL-2 and sIL-2R concentration in children with chronic hepatitis B. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 18:33-5.
151. Penna A. Del Prete G, Cavalli A, Bertoletti A, D'elios M, Sarmiento R. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus Nucleocapsid-specific T cell in acute Self-Limited hepatitis B". *Hepatology* 1997; 25:1022-7.
152. Pereira C, Valero A, Loureiro C, Davila I, Martinez-Cocera C, Murio C, Rico P, Palomino R. Iberian study of aeroallergens sensitization in allergic rhinitis. *Allerg Immunol (Paris)* 2006; 38:186-94.

153. Pfaff AW, Kirch Ad, Hoffmann WH, Bania M, Schuiz Key H, Geiger SM, Sobosiay PT. Regulatory effects of IL-12 and IL-18 on *Onchocerca volvulus*- and *Entamoeba histolytica*-specific cellular reactivity and cytokines profiles. **Parasite Immunol.** 2003; 25:325-32.
154. Plewako H, Wosinska K, Arvidsson M, Bjorkander J, Hakansson L, Rak S. Production of interleukin-12 by monocytes and interferon gamma by natural killer cells in allergic patients during rush immunotherapy. **Ann Allergy Asthma Immunol.** 2006; 97: 464-8.
155. Priimiagi L, Tefanova V, Tallo T, Shmidt E, Solomonova O, Tuisk T. Immune-regulating Th1 and Th2-cytokines in chronic infections caused by hepatitis B and C viruses. **Vopr Virusol** 2003. 48:37-40.
156. Puren Aj, Fantuzzi G, Gu Y, Su MH, Dinarello CA. Interleukin-18 (INF-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNF-alpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. **J Clin Invest** 1998; 101:711-21.
157. Purokivi MK, Hirvonen MR, Randell JT, Roponen MH, Meklin RM, Nevalainen AI, Husman TM, Tukiainen HO. Changes in pro-inflammatory cytokines in association with exposure to moisture-damaged building microbes. **Eur Respir J** 2001; 18:951-8.
158. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. **J hepatol** 2007; 46:160-70.
159. Ranger-RS, Alain S, Denis F. Hepatitis viruses: mother to child transmission. **Pathol Biol (Paris)** 2002; 50:568-75.
160. Reimund JM, Scheer O, Muller CD, Pinna G, Duclos B, Baumann R. In vitro modulation of inflammatory cytokine production by three lipid emulsions with different fatty acid compositions. **Clin Nutr** 2005; 24:164-5.
161. Rivero Z, Maldonado A, Bracho Á, Gotera J, Atencio R, Leal M, Sánchez R, Silva C. Enteroparasites in indigenous individuals from the Japreira community, Zulia state, Venezuela. **Interciencia** 2007; 32: 270-3.
162. Robins CS, Bauer CM, Vujcic N, Gaschler GJ, Lichty BD, Brown EG, Stampfli MR. Cigarette smoke impacts immune inflammatory responses to influenza in mice. **Am J Respir Crit Care Med** 2006; 174:1342-51.
163. Robinson WS. The genome of hepatitis B virus. **Ann Rev Microbiol** 1977; 31: 357-77.
164. Rodríguez C, Castilla J, Romero J, Almudena Lillo, Puig ME, García S. Prevalencia de infección por el virus de la hepatitis B y necesidades de vacunación en colectivos de alto riesgo. **Med Clin (Barc)** 2003; 121: 697 -9
165. Rodríguez CA. Actualización sobre hepatitis viral: etiología, patogenia, diagnóstico microbiológico y prevención. **Rev Cubana Med Gen Integr** 2000; 16:574-85.
166. Ruiz A.O, Del Rosario SM. Hepatitis B. Una problemática mundial. **Rev Cubana Méd** 2003; 42:4.
167. Russi JC, Serra M, Vinales J, Pérez MT, Ruchansky D, Alonso G, et al. Sexual transmission of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1 infection among male transvestite commercial sex workers in Montevideo, Uruguay. **Am J Trop Med Hyg** 2003; 68:716-20.
168. Salaman MH, Willian DL, King AJ, Nico CS. Prevention of jaundice resulting from anti S y philitic treatment. **Lancet** 1944; 2: 7-8.

169. Salleras L, Bruguera M, Taberner JL, Dominguez A, Batalla J, Buti M, Plans P, Navas E, Costa J, Vidal J, Prats R, Esteban R. Effectiveness of the mass antihepatitis B program in preadolescents in Catalonia. *Med Clin (Barc)* 2003;121: 79-82
170. Salleras L, Bruguera M, Vidal J, Taberner JL, Plans P, Bayas JM, Fumarola T, Jiménez de Anta MT, rodés J. Prevalence of hepatitis B markers in the population of Catalonia (Spain). Rationale for universal vaccination of adolescents. *Eur J Epidemiol* 1992; 8:640-4.
171. Salleras L, Dominguez A, Bruguera M, Cardeñosa N, Batalla J, Carmona G, Navas E, Taberner JL. Dramatic decline in acute hepatitis B infection and disease incidence rates among adolescents and young people after 12 years of a mass hepatitis B vaccination programme of pre-adolescents in the schools of Catalonia (Spain). *Vaccine* 2005; 23:2181-4.
172. Salzano FM, Callegari-Jacques SM. *South American Indians: a Case Study in Evolution*, Oxford University Press, New York, 1988. pp 242.
173. Sangfelt P, Von Sydow M, Uhnöo I, Weiland O, Lindh G, Fischler B. Serum ALT levels as a surrogate marker for serum HBV DNA levels in HBeAg-negative pregnant women. *Scand J Infect Dis* 2004; 36:182-5.
174. Shapatava E, Nelson KE, Tsertsvadze TC. Risk behaviors and HIV, hepatitis B, and hepatitis C Seroprevalence among injection drug users in Georgia. *Drug Alcohol Depend* 2006; 82:S35-8.
175. Sharma M, Vohra H, Bhasin D. Enhanced pro-inflammatory chemokine/ cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitol* 2005; 131(Pt 6):783-96.
176. Silveira TR, da Fonseca JC, Rivera I, H. Fay O, Tapia R, Santos JI Urdaneta M, Clemens SA. Hepatitis B Seroprevalence in Latin America. *Rev Panam public health* 1999; 6: 378-82.
177. Smellie MK, Carman WF, Elder S, Walker D, Lobidel D, Hardie R, Downie G, McMenemy J, Cameron S, Morrison D, Armstrong J, Goldberg D. Hospital transmission of hepatitis B virus in the absence of exposure prone procedures. *Epidemiol Infect* 2006; 134:259-63.
178. Smith PL, Lombardi G, Foster GR. Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* 2005, 42:869-77.
179. Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M. Hepatitis B virus DNA during pregnancy and post partum: aspects on vertical transmission. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:814-9.
180. Song le H, Binh VQ, Duy DN, Kun JF, Bock TC, Kreamsner PG, Luty AJ. Serum cytokine profiles associated with clinical presentation in Vietnamese infected with hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2003; 28:93-103.
181. Stelmach I, Jerzyńska J, Bobrowska M, Brzozowska A, Majak P, Kuna P. IL-10 serum levels in children with moderate asthma. *Pneumonol Alergol Pol* 2002; 70: 25-33.
182. Steninbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk HA. CD4+ and CD8+ Anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002; 99:2468-76.
183. Stephen Gislason Immune Mediators Chemical Communication in Immune Networks. Book. Immunology notes. Disponible en: <http://www.nutramed.com/immunology>. (citado en Ag 20 de 2002)

184. Sterneck M, Kalinina T, Otto S, Gunther S, Fischer L, Burdelski M, Greten H, Broelsch CE, Will H. Neonatal fulminant hepatitis B: structural and functional analysis of complete hepatitis B virus genomes from mother and infant. *J Infect Dis* 1998; 177:1378-81.
185. Stites DP, Abbas AK, Parslow TG. Inmunidad innata: neutrófilos, macrófagos y célula natural killer. En: Inmunología básica y Clínica. Editorial El Manual Moderno México. 9º Ed. Santa fé de Bogota. 1999. Pp 51-91.
186. Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of inflammations and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol* 2001; 47:661-73.
187. Sucupira MV, Mello FC, Santos EA, Niel C, Rolla VC, Árabe J, Gómez SA. Patterns of hepatitis B virus infection in Brazilian human immunodeficiency virus infected patients: high prevalence of occult infection and low frequency of lamivudine resistant mutations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:655-60.
188. Sugamura KH, Asao MK, Tanaka N, Ishii KO, Nakamura M, Takeshita T. The interleukine-2 receptor γ Caín: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 179-205.
189. Sun Y, Chen HY, Xin SJ. Effect of IL-18 on peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B and hepatitis B virus DNA released by HepG2.2.15 cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3:230-4.
190. Szkaradkiewicz A, Jopek A, Wysocki J, Grzymislawski M, Malecka I, Wozniak A. HBcAg-specific cytokine production by CD4 T lymphocytes of children with acute and chronic hepatitis B. *Virus Res* 2003;97:127-33.
191. Szkaradkiewicz A, Jopek A, Wysocki J. Effects of IL-12 on HBcAg-specific cytokine production by CD4 T lymphocytes of children with acute and chronic hepatitis B. *Antiviral Res* 2005; 66: 23-7.
192. Tanaka. Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine* 2000; 18:S17-9.
193. Tangkijvanich P, Vimolket T, Theamboonlers A, Kullavanijaya P, suwangool P, Poovorawan Y. Serum interleukin-6 and interferon-gamma levels in patients with hepatitis B-associated chronic liver disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2000; 18:109-14.
194. Tapias J.M. Virus de la Hepatitis. *Enf Infec Microbiol Clin* 1995; 13: 5-8.
195. Tarantola A, Abiteboul D, Rachline A. Infection risks following accidental exposure to blood or body fluids in health care workers: a review of pathogens transmitted in published cases. *Am J Infect Control* 2006; 34:367-75.
196. Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006; 26:1029-39.
197. Torbenson M and Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-86.
198. Torres JR, Mondolfi A. Protracted outbreak of severe delta hepatitis: experience in an isolated Amerindian population of the Upper Orinoco basin. *Rev Infect Dis* 1991; 13:52-5.
199. Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr Op Immunol* 1997; 9: 17-23.
200. Trinchieri G. Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 251-76.

201. Tulek N, Saglam SK, Saglam M, Turkyilmaz R, Yildiz M. Soluble interleukin-2 receptor and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis B infection. **Hepatogastroenterology** 2000; 47:828-31.
202. Ugwu BT, Thacher TD, Imade GE, Sagay AS, Isamade EI, Ford RW. HIV and hepatitis B Seroprevalence in trauma patients in North Central Nigeria. **West Afr J Med** 2006; 25:6-9.
203. Urban JF Jr, Fayer R, Sullivan C, Goldhill J, Shea-Donohue T, Madden K, Morris SC, Katona I, Gause W, Ruff M, Mansfield LS, Finkelman FD. Local Th1 and Th2 responses to parasitic infection in the intestine: Regulation by IFN-gamma and IL-4. **Vet Immunol Immunopathol.** 1996; 54:337-44.
204. Vassilev ZP, Hagan H, Lyubenova A, Tomov N, Vasilev G, Krasteva D, Des Jarlais DC. Needle exchange use, sexual risk behavior, and the prevalence of HIV, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections among Bulgarian injection drug users. **Int J STD AIDS** 2006; 17:621-6.
205. Velázquez BL, Segura DL, Barbosa DE, Vázquez MI, Tapia JG, Altamirano SC, Feria AJ. Determination of interleukins and IgG4 in patients with allergic rhinitis with and without immunotherapy. **Rev Alerg Mex** 2004; 51: 139-44.
206. Vetencourt R, Vetencourt M. Epidemiología de las hepatitis virales en Venezuela. **Gen** 1997; 51: 135-40.
207. Vildozola H, Bazul V, Cambillo E, Torres J, Flores ME, Ramos E. Prevalence of Hepatitis B infection and risk factors in two groups of pregnant adolescents related to the number of sexual partners. **Rev Gastroenterol Peru** 2006; 26:242-58.
208. Vingerhoets J, Michielsen P, Vanhan G, Bosmans E, Paulij W, Ramon A, Pelckmans P, Destens L, Leroux RG, Johan, V. Peter, M. Guido, V. Eugene, B. Wilma, P. Albert, R. Paul, P. Luc, K. Geert, L. HBV- specific lymphoproliferative and cytokine responses in patients with chronic hepatitis B. **J Hepatol** 1998; 28: 8-16.
209. Wang J, Ni H, Chen L, Song WQ. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with hepatitis B virus infection or hepatocellular carcinoma in Chinese Han ethnic population. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int** 2006; 5:60-4.
210. Wang JS, Chen H, Zhu QR. Transformation of hepatitis B serologic markers in babies born to hepatitis B surface antigen positive mothers. **World J Gastroenterol** 2005; 11:3582-5.
211. Wang Z, Zhang J, Yang H, Li X, Wen S, Guo Y. Quantitative analysis of HBV DNA level and HBeAg titer in hepatitis B surface antigen positive mothers and their babies: HBeAg passage through the placenta and the rate of decay in babies. **J Med Virol** 2003; 71:360-6.
212. Williams R. Global challenges in liver disease. **Hepatology** 2006; 44:521-6.
213. Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection. **Am J Gastroenterol** 2006; 101:S1-6.
214. Yeom JS, Park Sh, Ryu Sh, Park HK, Woo SY, Ha EH, Lee BE, Yoo K, Lee JH, Kim KH, Kim S, Kim YA, Ahn SY, Oh S, Park HJ, Min GS, Seoh JY, Park JW. Serum cytokine profiles in patients with Plasmodium vivax malaria: a comparison between those who presented with and without hepatic dysfunction. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2003; 97: 687-91.

215. You J, Zhuang L, Ma Y, Tang B. Research advances in the imbalance of helper T lymphocyte subpopulations and cytokine network in patients with chronic hepatitis B. **World Chin J Digestol** 2007; 15: 791-9.
216. Yuan, J, Zhou B, Tanaka Y, Kurbanov F, Orito E, Gong Z, Xu L, Lu J, Jiang X, Lai W, Mizokami M. Hepatitis B virus (HBV) genotypes/subgenotypes in China: Mutations in core promoter and precore/core and their clinical implications. **J Clin Virol** 2007; 39:87-93.
217. Yuen M-F, Sablon E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Doutreloigne J, Yuan H-J, Wong, D, Sum S-M, Lai C-L. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. **J Hepatol** 2004; 41:119-25.
218. Zhang W, Yue B, Wang GQ, Lu SL. Serum and ascites levels of macrophage migration inhibitory factor, TNF-alpha and IL-6 in patients with chronic virus hepatitis B and hepatitis cirrhosis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int** 2002; 1:577-80.
219. ^aZhang QG, Zheng DS, Yao YT, Zhang XH, Yu HL, Liang DP. Relationship between levels of intercellular adhesion molecule-1, interleukin-6 and airway hyperreponsiveness in patients with allergic rhinitis. **Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi** 2004; 39: 617-20.
220. ^bZhang Q, Li W, Zheng D, Ji G. The expression of intercellular adhesion molecule-1, interleukin-6 in nasal and bronchial mocosa in allergic rhinitis. **Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi** 2004; 18: 261-3.
221. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. Dietary α -linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. **Am J Clin Nutr** 2007; 85:385-91.
222. Zheng Y, Liu D, Feng D, Tang H, Li Y, You X. An animal study on transmission of hepatitis B virus through mosquitoes. **Chin Med J (Engl)** 1995; 108:895-7.

VIII.ANEXO

